

UNIVERZITET U BEOGRADU  
BIOLOŠKI FAKULTET

Ivana Z. Kolić

Studija asocijacije varijanti i nivoa transkripcije gena leptinskog signalnog puta (*LEP*, *LEPR* i *PGC1A*), antioksidativne zaštite (*SOD2*) i inflamacije (*TNF- $\alpha$* ) sa rizikom za nastanak i kliničkim tokom multiple skleroze

doktorska disertacija

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF BIOLOGY

Ivana Z. Kolić

Association study of the variants and transcription levels of genes of the leptin signaling pathway (*LEP*, *LEPR* and *PGC1A*), antioxidant protection (*SOD2*) and inflammation (*TNF- $\alpha$* ) with the onset risk and clinical course of multiple sclerosis

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2021.

Mentori:

dr Ljiljana Stojković, naučni saradnik  
Institut za nuklearne nauke "Vinča" - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

**Članovi komisije:**

dr Ljiljana Stojković, naučni saradnik  
Institut za nuklearne nauke "Vinča" - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

dr Dušanka Savić-Pavićević, redovni profesor  
Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Maja Živković, naučni savetnik  
Institut za nuklearne nauke "Vinča" - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,  
Univerzitet u Beogradu

Datum odbrane: \_\_\_\_\_

## ZAHVALNICA

*Ova doktorska disertacija je osmišljena i urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“- Instituta od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu u okviru teme „Genetska osnova hronične inflamacije“, br. 0802102, čiji je koordinator dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik, kojoj se iskreno zahvaljujem što je prepoznala u meni želju za istraživačkim radom još od srednjoškolskih dana i pružila mi priliku da budem deo njenog perspektivnog naučno-istraživačkog tima. Hvala na svim korisnim savetima i sugestijama tokom izrade doktorske teze.*

*Zahvaljujem se saradnicima Vojnomedicinske akademije u Beogradu, Klinike za neurologiju, posebno dr Evici Dinčić, na saradnji u prikupljanju i kliničkoj karakterizaciji uzoraka analiziranih u okviru ove doktorske disertacije.*

*Posebnu zahvalnost iskazujem glavnom mentoru ove doktorske disertacije dr Ljiljani Stojković, naučnom saradniku, koja je uvek imala vremena za konsultacije, nesebično pružajući pomoć uz strpljenje i posvećenost u svim fazama izrade ove disertacije kao i u uobličavanju naučnih radova iz teme disertacije.*

*Mentoru, dr Dušanki Savić-Pavićević, redovnom profesoru Biološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, se zahvaljujem na stručnim savetima, pregledu i oceni doktorske disertacije.*

*dr Maji Živković, naučnom savetniku INN „Vinča“, se zahvaljujem na pregledu i oceni rada. Uz to želim da se posebno zahvalim na korisnim sugestijama, stručnim savetima, pomoći u analizi rezultata koji su dodatno poboljšali kvalitet ove teze, i naučnih radova, ali i svim trenucima zabave u kojima smo se kao tim još više zblížili posebno kroz team building dogodovštine.*

*dr Tamari Đurić-Delić, naučnom savetniku, hvala na stručnim savetima koji su doprineli mom sazrevanju kao mladog istraživača.*

*Veliko hvala dr Draganu Alavantiću, naučnom savetniku, koji je uspostavio kredibilitet Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku, čime se ističe kao brend Srbije, i bez koje eksperimentalni deo ove disertacije ne bi bio moguć, kao ni moje stručno sazrevanje i usavršavanje.*

*Svojim dragim kolegama, ekipi 080 (Ani Kolaković, Ani Đorđević, Ivanu Jovanoviću, Ivanu Životiću, Jovani Kuveljić, Kristini Mitrović, Maji Bubić, Magdalen Anđeleviski, Milanu Stefanoviću i Nataši Mačak) posvećujem stihove jer je rad sa njima uvek bio, nadasve, prepun zabave, podrške u prelomnim trenucima i uzajamne podele iskustava i znanja kojim su umnogome olakšali i osmehom začinili moj laboratorijski život:*

*„Svako ko je ovde deo 080 tima,  
Neizostavno biće mog je Životnog putešestvija.  
Ko iz ekipe, dosad, svoj lični stih ne imade,  
Zapis mu u doktoratu Zokijeve male pade.  
Imena se nižu, kao perle sjaje  
Svako svojim doprinosom ovom delu težinu daje!  
I zato kada budem, kroz vreme, ovo delo držala  
Svaki put će zvoniti: Svima veliko HVALA!“*

*Hvala tati i mami do neba i još dalje, na podršci, ljubavi, žvncima i svakom koraku za me. Hvala Bibo!  
Hvala Vikici i Dakici što su mi svojim postojanjem učinile život potpunim i još lepšim! Volim vas sve mnogo!*

*Posle diplomskog i drugi tom mog rada posvećujem tebi Gago, znam da bi bio ponosan!*

## **Studija asocijacije varijanti i nivoa transkripcije gena leptinskog signalnog puta (*LEP*, *LEPR* i *PGC1A*), antioksidativne zaštite (*SOD2*) i inflamacije (*TNF- $\alpha$* ) sa rizikom za nastanak i kliničkim tokom multiple skleroze**

### **Sažetak**

Hormon i adipocitokin leptin (*LEP*) može učestvovati u patogenezi multiple skleroze (MS) delovanjem na produkciju potentnog proinflamatornog citokina, *TNF- $\alpha$* , aktivnost transkripcionog koaktivatora *PGC1A* i produkciju ključnog enzima antioksidativne zaštite, *SOD2*. Predmet studije je genetičko-epidemiološka analiza asocijacije varijanti *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 i nivoa transkripcije gena *LEP* signalnog puta (*LEP*, *LEPR* i *PGC1A*), antioksidativne zaštite (*SOD2*) i inflamacije (*TNF- $\alpha$* ) sa nastankom i kliničkim tokom (relapsno-remitentna, RR i sekundarno progresivna, SP) MS. Genotipizacija varijanti i određivanje relativnih nivoa ciljnih iRNK u perifernim mononuklearnim leukocitima urađeni su metodom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR) uz primenu TaqMan® eseja. Analizom tri ispitivane varijante u multiploj logističkoj regresiji, po dominantnom modelu nasleđivanja, utvrđen je povišen rizik za nastanak MS kod nosilaca ređeg alela, A, varijante u *PGC1A*. Kod muškaraca sa MS, ustanovljena je asocijacija ređeg alela, G, varijante u *LEPR* sa značajno povišenim vrednostima kliničkog parametra MSSS, u odnosu na muškarce sa genotipom AA, što sugeriše na potencijalni polno-zavisni uticaj varijante na težinu bolesti. Nivo *LEP* iRNK je značajno povišen, a nivoi *LEPR* i *PGC1A* iRNK značajno sniženi kod pacijenata sa RR MS, u odnosu na kontrole, što ukazuje na povezanost promena transkripcije ovih gena sa nastankom RR MS. Utvrđenom porastu nivoa *LEP* iRNK kod pacijenata može doprineti ređi alel, A, varijante u *LEP*. Aktivnost gena može biti povezana sa težinom bolesti, pošto je pokazano da *LEPR* iRNK i MSSS pozitivno korelišu. Rezultati studije ukazuju da varijante i promene nivoa iRNK gena *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* mogu da utiču na nastanak i težinu kliničke slike MS.

**Ključne reči:** multipla skleroza, gen, varijanta, transkripcija, *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2*, *TNF- $\alpha$*

**Naučna oblast:** Molekularna biomedicina

**Uža naučna oblast:** Molekularna genetika multiple skleroze

# Association study of the variants and transcription levels of genes of the leptin signaling pathway (*LEP*, *LEPR* and *PGC1A*), antioxidant protection (*SOD2*) and inflammation (*TNF- $\alpha$* ) with the onset risk and clinical course of multiple sclerosis

## Abstract

Hormone and adipocytokine leptin (*LEP*) may participate in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) by affecting the production of a potent proinflammatory cytokine, *TNF- $\alpha$* , activity of transcription coactivator *PGC1A* and production of a key antioxidant enzyme, *SOD2*. The objective of the study was genetic epidemiological analysis of association of *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 and *PGC1A* rs8192678 variants and transcription levels of genes of *LEP* signaling pathway (*LEP*, *LEPR* and *PGC1A*), antioxidant protection (*SOD2*) and inflammation (*TNF- $\alpha$* ), with the onset risk and clinical course (relapsing-remitting, RR and secondary progressive, SP) of MS. Genotyping of variants and determination of relative levels of target mRNAs in peripheral mononuclear leukocytes were performed by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) using TaqMan® assays. Multiple logistic regression of three examined variants, by dominant model of inheritance, revealed an increased risk of MS in carriers of minor, A, allele of *PGC1A* variant. In men with MS, *LEPR* minor, G, allele was associated with higher values of the clinical parameter MSSS, compared to men with genotype AA, suggesting a potential sex-dependent effect of *LEPR* variant on disease severity. *LEP* mRNA was increased, while *LEPR* and *PGC1A* mRNA levels were decreased in patients with RR MS, compared to controls, indicating the association of transcription changes of these genes with the development of RR MS. *LEP* minor, A, allele may contribute to the determined increase in *LEP* mRNA levels in patients. Gene activity may be linked with disease severity, as *LEPR* mRNA and MSSS were shown to correlate. The results indicate that variants and changes in transcription levels of *LEP*, *LEPR* and *PGC1A* genes may affect the onset and severity of MS.

**Key words:** multiple sclerosis, gene, variant, transcription, *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2*, *TNF- $\alpha$*

**Scientific field:** Molecular biomedicine

**Scientific subfield:** Molecular genetics of multiple sclerosis

## SKRAĆENICE

- Abz** - abzim, antitelo koje imaju funkciju enzima (engl. *Abzyme*)
- BMI** - indeks telesne mase
- cDNK** - komplementarna dezoksiribonukleinska kiselina
- CIS** - klinički izolovani sindrom (engl. *Clinically Isolated Syndrome*)
- CNS** - centralni nervni sistem
- Ct** - broj ciklusa lančane reakcije polimeraze na kom se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag (engl. *Threshold cycle*)
- EAE** - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (engl. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*)
- EBV** - Epstein-Barr virus
- EDSS** - klinički parametar stepena invaliditeta u multiploj sklerozi (engl. *Expanded Disability Status Scale*)
- EDTA** - etilendiamintetrasirćetna kiselina (engl. *Ethylenediaminetetraacetic Acid*)
- ELAVL1** - ELAV-sličan protein 1 (engl. *ELAV-like protein 1*)
- ELISA** - enzimski imunosorbentni test (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*)
- FC** - stepen promene (engl. *Fold Change*)
- Gln223Arg** - supstitucija aminokiseline glutamina argininom na poziciji 223 polipeptidnog lanca
- Gly482Ser** - supstitucija aminokiseline glicina serinom na poziciji 482 polipeptidnog lanca
- GWAS** - asocijaciona studija na nivou genoma (engl. *Genome Wide Association Study*)
- HLA** - humani leukocitni antigen (engl. *Human Leukocyte Antigen*)
- IgG** - imunoglobulin G
- IL-1** - interleukin 1
- IL-6** - interleukin-6
- IMSGC** - internacionalni genetički konzorcijum za multiplu sklerozu (engl. *International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*)
- iRNK** - informaciona ribonukleinska kiselina
- JAK** - Janus kinaze (engl. *Janus kinases*)
- JAK2/STAT3** - Janus kinaza 2/Signalni trasduktor i aktivator transkripcije 3 (engl. *Janus kinase 2/Signal Transducer And Activator Of Transcription 3*)
- KMB** - krvno-moždana barijera
- LEP** - leptin
- LEPR** - leptinski receptor
- LEPR-b** - duga izoforma leptinskog receptora
- MHC** - glavni kompleks histokompatibilnosti (engl. *Main Histocompatibility Complex*)
- MRI** - magnetna rezonantna tomografija (engl. *Magnetic Resonance Imaging*)
- MS** - multipla skleroza
- MSSS** - klinički parametar stepena progresije multiple skleroze (engl. *Multiple Sclerosis Severity Score*)
- n** - broj
- NCBI database projekat ALFA** - projekat agregacije frekvencije alela u okviru NCBI javno dostupne baze podataka (engl. *National Center for Biotechnology Information database, Allele Frequency Aggregator*)
- NF-κB** - nuklearni faktor kapa B (engl. *Nuclear Factor Kappa Light Chain Enhancer of Activated B Cells*)

**NMSS** - Nacionalno društvo za multiplu sklerozu (engl. *National Multiple Sclerosis Society*)  
**OR** - odnos šansi (engl. *Odds ratio*)  
**P** - vjerojatnoća (engl. *Probability*)  
**P<sub>adj</sub>** - vrednost vjerojatnoće korigovana na višestruko testiranje (engl. *Adjusted Probability*)  
**PGC1A** - koaktivator 1 alfa receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma (engl. *Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma Coactivator 1-Alpha*)  
**pLEP** - leptin u plazmi  
**PML** - periferni mononuklearni leukociti  
**PP MS** - primarno-progresivni tok multiple skleroze  
**PPIA** - peptidilprolilna izomeraza A (engl. *Peptidylprolyl Isomerase A*)  
**qPCR** - kvantitativna lančana reakcija polimeraze  
**r** - koeficijent korelacije  
**RIS** - radiološki izolovani sindrom (engl. *Radiologically Isolated Syndrome*)  
**ROS** - reaktivne kiseonične vrste (engl. *Reactive Oxygen Species*)  
**RR MS** - relapsno-remitentni tok multiple skleroze  
**RT** - reverzna transkripcija  
**RT-qPCR** - reverzna transkripcija-kvantitativna lančana reakcija polimeraze  
**SD** - standardna devijacija  
**SNV** - varijanta pojedinačnog nukleotida (engl. *Single Nucleotide Variant*)  
**SOD1 (Cu/Zn SOD)** - superoksid dismutaza 1, bakar/cink superoksid dismutaza  
**SOD2 (Mn/Fe SOD)** - superoksid-dismutaza 2, mangan/gvožđe superoksid dismutaza  
**SOD3 (Ni SOD)** - superoksid dismutaza 3, nikel superoksid dismutaza  
**SP MS** - sekundarno-progresivni tok multiple skleroze  
**STAT** - signalni transduktori i aktivatori transkripcije (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*)  
**TNF- $\alpha$**  - faktor nekroze tumora alfa (engl. *Tumor Necrosis Factor alpha*)  
**TNFR1** - receptor 1 za faktor nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor 1*)  
**TNFR2** - receptor 2 za faktor nekroze tumora (engl. *Tumor Necrosis Factor Receptor 2*)



# SADRŽAJ

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
1.1. Epidemiologija i klinički tok multiple skleroze .....	1
1.2. Patogeneza MS.....	2
1.3. Faktori rizika za nastanak MS .....	4
1.4. Ciljne komponente leptinskog signalnog puta, antioksidativne zaštite i inflamacije u MS 5	
1.4.1. Leptin (LEP).....	6
1.4.1.1. LEP: struktura i regulacija transkripcije gena .....	7
1.4.1.2. Varijanta rs7799039 u genu LEP.....	7
1.4.2. Leptinski receptor (LEPR) .....	8
1.4.2.1. LEPR: struktura i regulacija transkripcije gena .....	10
1.4.2.2. Varijanta rs1137101 u genu LEPR.....	11
1.4.3. Koaktivator 1 alfa receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PGC1A) .....	12
1.4.3.1 . PGC1A: struktura i regulacija transkripcije gena.....	13
1.4.3.2. Varijanta rs8192678 u genu PGC1A .....	13
1.4.4. Superoksid dismutaza 2 (SOD2).....	14
1.4.4.1. SOD2: struktura i regulacija transkripcije gena.....	15
1.4.5. Faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ) .....	15
1.4.5.1. TNF- $\alpha$ : struktura i regulacija transkripcije gena .....	16
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI</b> .....	<b>17</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>18</b>
3.1. Materijal.....	18
3.2. Metode .....	19
3.2.1. Ekstrakcija jedarne DNK iz leukocita pune krvi.....	21
3.2.2. Kvantitativna i kvalitativna provera ekstrahovane DNK.....	22
3.2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR) za detektovanje genskih varijanti <i>LEP</i> rs7799039, <i>LEPR</i> rs1137101 i <i>PGC1A</i> rs8192678 primenom TaqMan® eseja za diskriminaciju alela .....	22
3.2.4. Izdvajanje PML iz pune krvi .....	23
3.2.5. Ekstrakcija ukupne RNK iz PML.....	24
3.2.6. Kvantitativna i kvalitativna provera ekstrahovane RNK .....	24
3.2.7. Tretman ekstrahovane RNK dezoksiribonukleazom I.....	24
3.2.8. Reverzna transkripcija uzoraka RNK .....	25

3.2.9. Određivanje relativnih nivoa <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> , <i>PGC1A</i> , <i>SOD2</i> i <i>TNF-α</i> iRNK u PML metodom qPCR.....	25
3.2.10. Izdvajanje plazme iz periferne krvi.....	27
3.2.11. Kvantifikacija nivoa <i>LEP</i> u plazmi metodom ELISA .....	28
3.2.12. Statistička obrada podataka .....	28
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>30</b>
4.1. Karakteristike ispitivanih grupa uključenih u analizu asocijacije varijanti u genima <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> i <i>PGC1A</i> sa nastankom i kliničkim tokom MS .....	30
4.2. Asocijacija varijanti u genima <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> i <i>PGC1A</i> sa nastankom i kliničkim tokom MS.....	30
4.3. Asocijacija varijanti u genima <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> i <i>PGC1A</i> sa kliničkim pokazateljem progresije MS .....	31
4.4. Analiza relativnih nivoa <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> , <i>PGC1A</i> , <i>SOD2</i> i <i>TNF-α</i> iRNK u PML i nivoa p <i>LEP</i> , u kontrolnoj i grupi pacijenata sa RR tokom MS .....	38
4.5. Korelacije p <i>LEP</i> , antropometrijskih i kliničkih parametara sa relativnim nivoima <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> , <i>PGC1A</i> , <i>SOD2</i> i <i>TNF-α</i> iRNK u PML.....	42
4.6. Međusobne korelacije relativnih nivoa <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> , <i>PGC1A</i> , <i>SOD2</i> i <i>TNF-α</i> iRNK u PML kod pacijenata sa RR MS i kontrola.....	44
4.7. Asocijacija varijanti rs7799039, rs1137101 i rs8192678 sa relativnim nivoima transkripcije (iRNK) <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> i <i>PGC1A</i> u PML i sa nivoima p <i>LEP</i> .....	45
<b>5. DISKUSIJA.....</b>	<b>49</b>
5.1. Asocijacija genskih varijanti <i>LEP</i> rs7799039, <i>LEPR</i> rs1137101 i <i>PGC1A</i> rs8192678 sa nastankom i kliničkim tokom MS .....	50
5.2. Asocijacija genskih varijanti sa vrednostima kliničkog parametra progresije MS	51
5.3. Relativni nivoi transkripcije (iRNK) gena <i>LEP</i> , <i>LEPR</i> , <i>PGC1A</i> , <i>SOD2</i> i <i>TNF-α</i> u MS	51
5.4. Efekti genskih varijanti <i>LEP</i> rs7799039, <i>LEPR</i> rs1137101 i <i>PGC1A</i> rs8192678 na nivoe ciljnih iRNK u PML.....	53
5.5. Cirkulišući <i>LEP</i> u MS.....	54
5.6. Ograničenja i potencijalna klinička primena rezultata studije .....	56
<b>6. ZAKLJUČCI.....</b>	<b>57</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>58</b>



# 1. UVOD

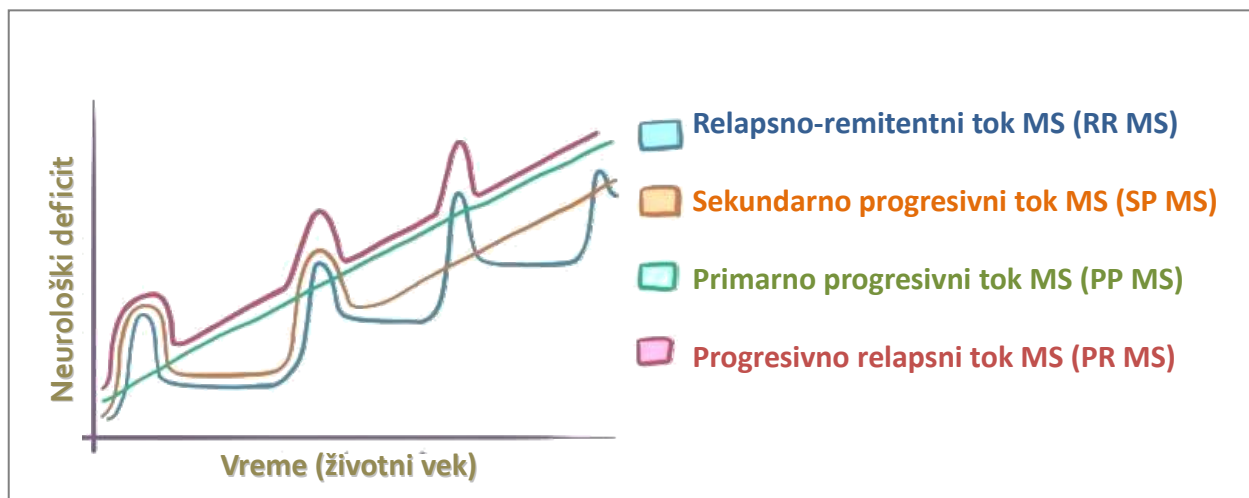
## 1.1. Epidemiologija i klinički tok multiple skleroze

Multipla skleroza (MS) je kompleksna, autoimunska i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) (Dobson i Giovannoni, 2019). Godine 1996-e Savetodavni komitet američkog Nacionalnog društva za multiplu sklerozu (NMSS) definisao je kliničke podtipove MS (Lublin i Reingold, 1996). Usledila je opsežna analiza fenotipova MS na osnovu rezultata istraživanja kliničke slike, snimaka magnetne rezonantne tomografije (engl. *Magnetic Resonance Imaging, MRI*), biomarkera i dotadašnjih literaturnih podataka, što je rezultovalo definisanjem osnovnih kliničkih tokova MS: relapsno-remitentnog (RR), sekundarno-progresivnog (SP) i primarno-progresivnog (PP) (Lublin i sar., 2014), **Slika U1**.

Na MS se sumnja kada se kod osobe javi klinički izolovani sindrom (engl. *Clinically Isolated Syndrome, CIS*). CIS je prepoznat kao prva klinička prezentacija koja pokazuje karakteristike inflamatorne demijelinizacije koja bi mogla biti početak MS, ali da bi se definitivno dijagnostikovala MS neophodan je dokaz o postojanju i širenju lezija u CNS. Radiološki izolovani sindrom (engl. *Radiologically Isolated Syndrome, RIS*), gde slučajni nalaz MRI ukazuje na inflamatornu demijelinizaciju, ali bez kliničkih znakova ili simptoma, sugeriše na moguću dijagnozu MS zavisno od zapažene morfologije i lokalizacije lezije zabeležene na MRI snimku (Lublin i sar., 2014). U RR toku MS, relaps ili faza pogoršanja bolesti se javlja najčešće subakutno u vremenskom trajanju od nekoliko sati do nekoliko dana, dostižući zatim plato koji traje nekoliko nedelja, nakon čega dolazi do postepenog oporavka, u fazi remisije. Klinički oporavak od faze relapsa je najčešće potpun u početnim stadijumima bolesti, međutim, kako vreme odmiče većina relapsa ostavlja iza sebe neurološki deficit koji je uzrok trajnog invaliditeta kod osoba sa MS (Dobson i Giovannoni, 2019). Osnovni klinički parametri koji definišu stepen invaliditeta i progresije MS su EDSS (engl. *Expanded Disability Status Scale*) (Kurtzke J.F., 1983) i MSSS (engl. *Multiple Sclerosis Severity Score*) (Roxburgh i sar., 2005). Vrednost EDSS definiše stepen invaliditeta preko kvantifikovanja neurološkog deficita u 7 funkcionalnih sistema CNS: piramidalnom, cerebelarnom, senzornom, sistemu moždanog stabla, sistemu inervacije creva i bešike, vizuelnom i cerebralnom. Vrednost EDSS parametra kreće se u rasponu od 0,0 do 10,0 (Kurtzke J.F., 1983), a korelisanje ovog parametra sa vremenom trajanja bolesti definiše parametar težine bolesti, MSSS, sa vrednostima prikazanim u referentnoj tabeli u rasponu od 0,01 do 9,99 (Roxburgh i sar., 2005).

Simptomi i znaci MS rezultuju iz kombinacije lokalizacije i veličine MRI lezija, npr. jedna mala lezija u elokventnom području će verovatno izazvati vidljive simptome, dok se pri svakom kliničkom napadu na MRI zabeleži približno deset „asimptomatskih“ lezija. MS obično počinje kao RR forma bolesti (RR MS), kod oko 85% pacijenata, koju karakteriše stalna smena relapsa - faze pogoršanja bolesti, sa preovlađujućom neuroinflamacijom, i remisije - faze kliničkog oporavka (Dobson i Giovannoni, 2019). Oko 50% pacijenata sa RR tokom MS ulazi u SP fazu nakon prosečno 10 godina od početka bolesti. SP faza najčešće započinje kada EDSS dostigne vrednost oko 5, a definisana je kao postepeno kontinuirano

ireverzibilno pogoršanje neurološkog deficita nakon prethodne faze remisije. Oko 15% od ukupnog broja pacijenata ima PP tok bolesti, koji se odlikuje kontinuiranom progresijom neurološkog deficita od početka bolesti, a tokom koje se mogu javljati relapsi i tada se radi o progresivno-relapsnoj MS (Lublin i sar., 2014), **Slika U1**.



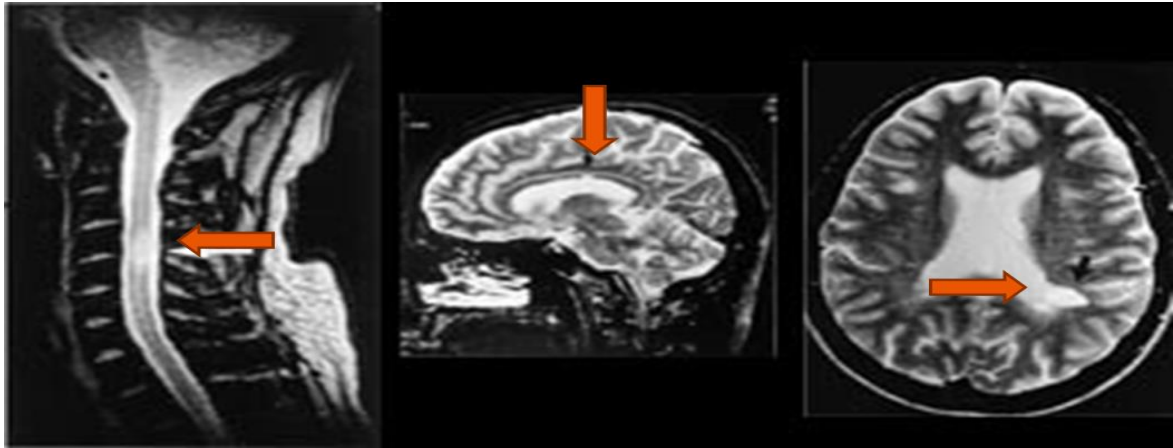
**Slika U1. Klinički tok MS.**

Prevalenca bolesti u svetu znatno varira, od visoke u severnoj Americi i Evropi (>100/100.000 stanovnika) do niske u istočnoj Aziji i subsaharskoj Africi (2/100.000 stanovnika). U multicentričnoj opservacionoj studiji koja je uključila veliku kohortu ispitanika iz Francuske populacije, sa 27 603 pacijenata, utvrđeno je da je prosečno trajanje života smanjeno za 6-7 godina kod pacijenata sa MS, u odnosu na kontrole (Leray i sar., 2015). Geografska distribucija bolesti, podaci o stopi mortaliteta, kao i izučavanje prirode bolesti, omogućavaju nam razumevanje sadejstva endogenih i egzogenih činilaca na nastanak i patologiju MS (Leray i sar., 2016).

## 1.2. Patogeneza MS

Karakteristični patološki znak MS su perivaskularne inflamatorne lezije (plakovi) u tkivu CNS, **Slika U2**, koje je prvi put opisao francuski neurolog J. Charcot 1868. godine, a u kojima započinje proces demijelinizacije (Charcot 1868; Kuhlmann i sar., 2017). Formiranje lezija predstavlja dinamični proces. Pregledni rad iz 2012. godine ažurira dotadašnje kriterijume koji MS definišu kao autoimunska bolest u osnovi, pri čemu je osnovni kriterijum prisustvo specifičnog autoantigena kod svih pacijenata bez izuzetka (Wootla i sar., 2012). Novije studije ukazuju da je prisustvo antitela koja imaju funkciju enzima, tzv. abzima (engl. *Abzyme*, *Abz*), i to Abz koji hidrolizuju DNK, RNK i mijelin-bazni protein, merljivo na početku autoimunskih bolesti tj. MS, kada koncentracija specifičnih antitela na autoantigene još nije značajno povišena i odgovara nivou kod zdravih osoba (Baranova i sar., 2019; Aulova i sar., 2020; Nevinsky G., 2016). U aktivnim, inflamatornim, lezijama CNS inflamatorni proces je povezan sa poremećajem funkcije krvno-moždane barijere (KMB) (Hochmeister i sar., 2006), a odlikuje se infiltracijom T-

limfocita (CD4+ i CD8+), B-limfocita i makrofaga, aktivacijom mikroglije (Frischer i sar., 2009; van Langelaar i sar., 2020), kao i lokalnom ekspresijom proinflamatornih citokina i hemokina i njihovih receptora (Cui i sar., 2020). Inflamatorni proces vodi ka demijelinizaciji i oštećenju oligodendrocita. Aksoni su relativno očuvani u ranim stadijumima bolesti, međutim, kako bolest napreduje, razvijaju se nepovratna oštećenja aksona tj. dolazi do neurodegeneracije (Trapp i sar., 1998).

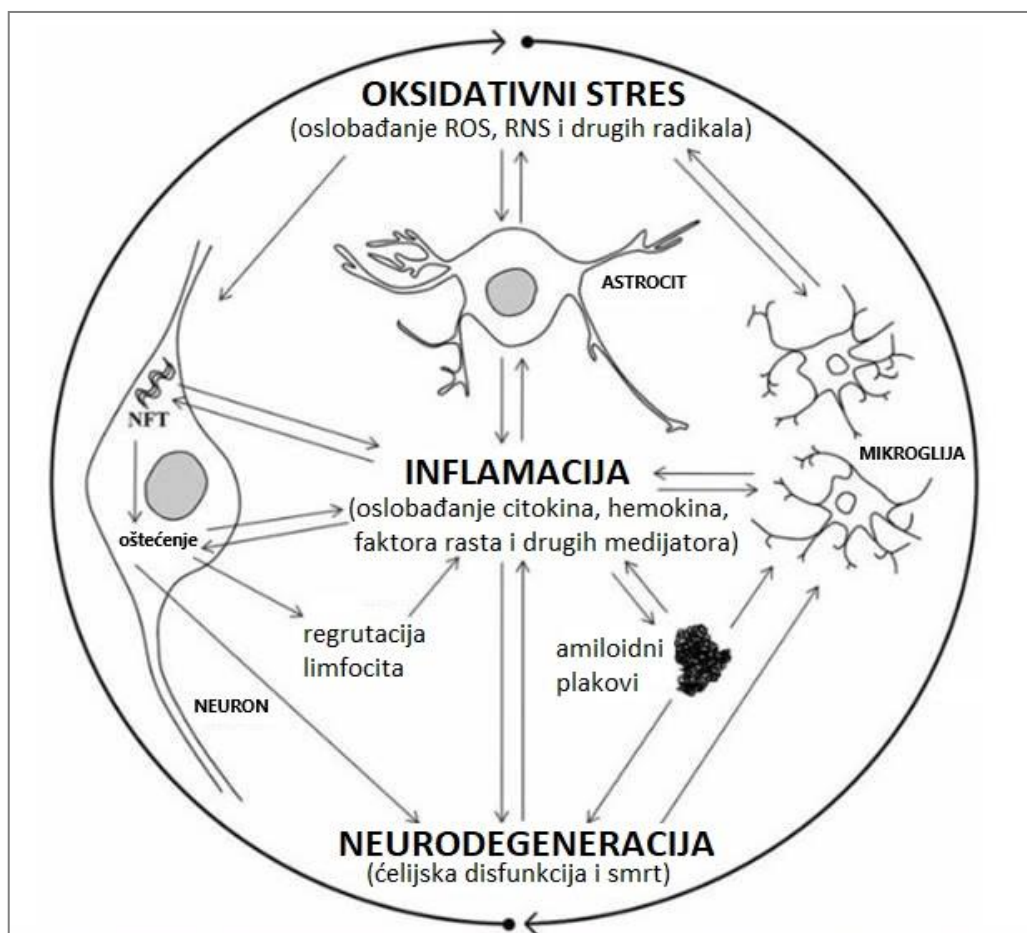


**Slika U2. Patološke promene u CNS kod obolelih od MS. (Slika preuzeta sa URL: <https://mspacijent.wordpress.com/tag/ms/page/3/>)**

Diseminovane fokalne demijelinizovane lezije – plakovi (označeni strelicama), u beloj i sivoj masi CNS, predstavljaju karakteristični patološki znak MS.

Pored navedenog stanovišta da je MS primarno inflamatorna bolest u kojoj su demijelinizacija i oštećenje nervnog tkiva pokrenuti imunološki-posredovanim mehanizmima (Hohlfeld i sar., 2016), postoji i stanovište da MS može biti primarno neurodegenerativna bolest, na čiju progresiju utiče inflamacija koja se javlja u ranoj fazi bolesti (Trapp i Nave, 2008). Osnova ovog drugog stanovišta je podržana rezultatima studija izvedenim na životinjskim eksperimentalnim modelima (Kassmann i sar., 2007; Kroner i sar., 2009). Takođe, *in vitro* studije su pokazale da inflamatorni citokini, TNF- $\alpha$  i IL-1, mogu prouzrokovati neuronsku smrt direktnim efektima na neurone ili delujući indirektno, putem stimulisanja produkcije neurotoksičnih supstanci u glijalnim ćelijama (Probert L., 2015; Neniskyte i sar., 2014; Thornton i sar., 2006).

Kod pacijenata sa MS pokazan je značajan porast nivoa markera oksidativnog stresa (Padureanu i sar., 2019). Podaci iz studija izvedenih na humanim *post mortem* moždanim lezijama, sugerišu da oksidativno oštećenje mitohondrija ima važnu ulogu u neurodegeneraciji u MS (Mahad i sar., 2008; Nijland i sar., 2014; Witte i sar., 2013). Na **Slici U3** prikazana je međuzavisnost oksidativnog stresa, inflamacije i degeneracije u nervnom tkivu. Zahvaljujući primeni novih eksperimentalnih tehnologija sa velikim protokom podataka, kao i sve širem spektru gena uključenih u funkcionalne i asocijacione studije gena kandidata, sada smo u mogućnosti da definišemo veliki broj gena i molekularnih puteva koji učestvuju u patogenezi MS. Ove informacije će doprineti rasvetljavanju preciznih mehanizama patogeneze, kao i razvoju novih strategija u lečenju ove bolesti.



**Slika U3. Međuzavisnost oksidativnog stresa, inflamacije i neurodegeneracije. Šema preuzeta i izmenjena iz Gamba i sar., 2015.**

Tokom patogeneze neurodegenerativne bolesti, u nervnom tkivu medijatori inflamacije podstiču oksidativni stres i neurodegeneraciju, a pojačana produkcija slobodnih radikala i ćelijska smrt povratno stimulišu inflamatorni odgovor.

### 1.3. Faktori rizika za nastanak MS

Otkrivanje faktora rizika, kako genetičkih tako i sredinskih, je od velikog značaja za razumevanje mehanizama patogeneze MS. Belbasis i sar., autori preglednog rada tipa "umbrella" (<https://guides.mclibrary.duke.edu/sysreview/types>), uradili su rigoroznu i sistematsku analizu prethodno objavljenih preglednih radova i meta-analiza, objavljenih do 2014. godine i dostupnih u bazi PubMed (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>), obrađujući rezultate decenija istraživanja brojnih faktora rizika, izuzev genetičkih, za nastanak MS. Od 44 faktora uključena u njihovu analizu, samo tri su pokazala snažne, dosledne dokaze o povezanosti sa MS i to: seropozitivnost na imunoglobulin G (IgG), seropozitivnost na nuklearni antigen Epstein-Barr virusa (EBV) (tj. infektivna mononukleoza) i pušenje (Bebasis i sar., 2015). Pored navedenih faktora, deficijencija serumskog vitamina D je, takođe, prepoznata kao činilac koji povećava rizik za nastanak i progresiju MS (Sintzel i sar., 2018).

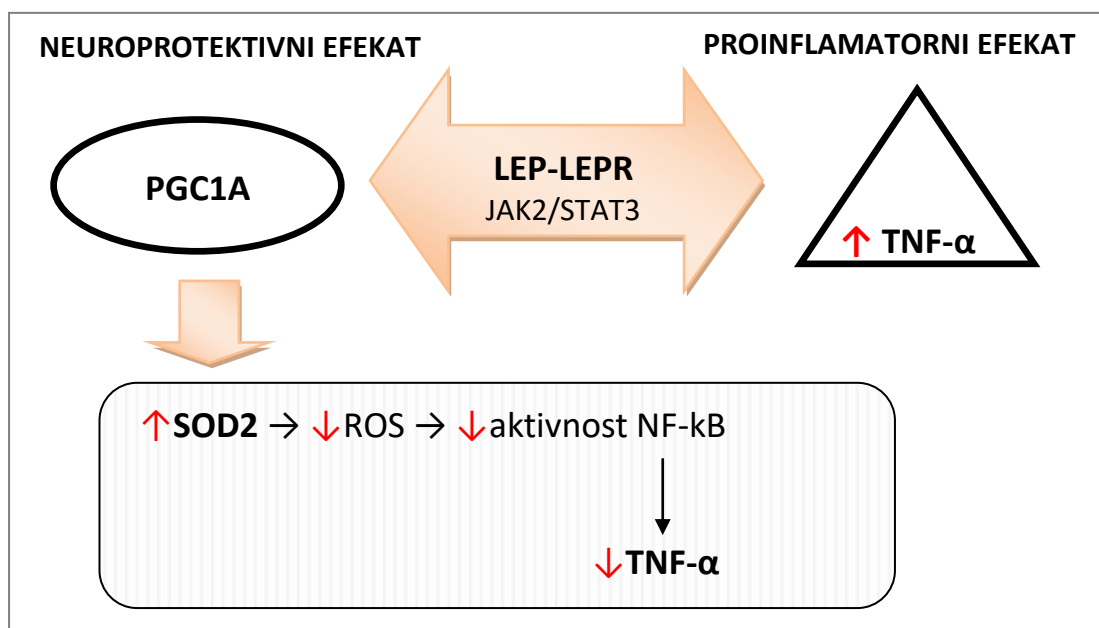
Iz do sada nepoznatih razloga, približno tri četvrtine osoba koje obole od MS su žene, što je očekivano za bolesti koje se smatraju autoimunskim (Reich i sar., 2019). Novodefinisani MS lokus na hromozomu X predstavlja prvi korak ka razumevanju uticaja genetičke komponente u izraženoj seksualnoj dimorfnosti koja karakteriše MS (Patsopoulos i sar., IMSSGC, 2019). U kontekstu nasledne komponente, poznato je da osobe sa obolelim rođakom prvog stepena dele 2 do 4% rizika za nastanak MS (u poređenju sa približno 0,1% rizika u opštoj populaciji), dok je za monozigotne blizance taj rizik 30 do 50% (Reich i sar., 2018).

Savremene asocijacione studije na nivou genoma (engl. *Genome Wide Association Study*, GWAS) do sada su definisale: 32 varijante u lokusu za humane leukocitne antigene (HLA) tj. proteine glavnog kompleksa histokompatibilnosti (engl. *Main Histocompatibility Complex*, MHC) (za najznačajniji haplotip, koji sadrži alel DRB1\*1501, odnos šansi (engl. *Odds Ratio*, OR) je približno 3), 200 varijanti u autozomalnim genima van HLA lokusa i 1 varijantu na polnom hromozomu X, kao faktore rizika za nastanak MS (Patsopoulos i sar., IMSSGC, 2019). Pritom, većina alela definisanih kao genetički markeri koji nose povišen rizik za nastanak MS je locirana u genima imunskog odgovora (Patsopoulos i sar., IMSSGC, 2019), što je u skladu sa shvatanjem da su autoimunske mehanizmi najvažniji u nastanku i progresiji MS. Nije potvrđen ni jedan genetički faktor koji kao pojedinačan snažno utiče na rizik za nastanak ili klinički tok bolesti (Cotsapas i sar., 2018; Patsopoulos i sar., IMSSGC, 2019). Ova činjenica odražava potrebu za daljim istraživanjem genetičkih faktora rizika, kako radi razumevanja patogeneze tako i u cilju razvijanja pristupa u personalizovanoj terapiji MS kao poligenске bolesti (Tsareva i sar., 2019).

#### 1.4. Ciljne komponente leptinskog signalnog puta, antioksidativne zaštite i inflamacije u MS

U narušavanju KMB učestvuju proinflamatorni citokini koji regrutuju imunske ćelije sa periferije, pojačavaju inflamatornu kaskadu i aktiviraju mikrogliju. Oksidativni stres povezan sa inflamacijom u aktiviranim glijalnim ćelijama i makrofagima ima važnu ulogu u demijelinizaciji i oštećenju nervnog tkiva posredovanim slobodnim radikalima, u patogenezi MS (Ortiz i sar., 2013). La Cava i sar., koji su analizirali efekte leptina u inflamatornim stanjima uključujući i autoimunske bolesti, ukazuju na to da on ima ulogu pojačivača inflamatornog odgovora (La Cava A., 2017). Utiče na proliferaciju i aktivaciju humanih perifernih mononuklearnih leukocita (PML) i u njima stimuliše produkciju proinflamatornih citokina, kao što su faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ ) i interleukin-6 (IL-6) (Sánchez-Margalet i sar., 2003), **Slika U4**. Sa druge strane, pokazano je da leptin može i da indukuje ekspresiju mitohondrijalnog enzima antioksidativne zaštite, superoksid-dismutaze 2 (SOD2), u neuronima (Guo i sar., 2008), a moguće je da se ova indukcija ostvaruje preko koaktivatora 1 alfa receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PGC1A), jer i njegovu aktivnost reguliše leptin (García-Carrizo i sar., 2016), **Slika U4**. Na osnovu navedenih rezultata dosadašnjih studija proizilazi da aktivacija leptinskog signalnog puta, koja prožima efekte leptina u mehanizmima inflamatornog odgovora i odgovora na oksidativni stres, predstavlja moguću veoma značajnu komponentu u patogenezi MS i, kao takvu, vrlo intrigantnu za buduća istraživanja.





**Slika U4. Leptinski signalni put u oksidativnom metabolizmu i inflamaciji u MS.**

Na osnovu dosadašnjih istraživanja, predloženo je da leptin (LEP) u patogenezi MS može imati proinflamatornu ulogu, ali takođe i neuroprotektivnu ulogu, kroz ostvarivanje antioksidativnih i antiinflamatornih efekata.

#### 1.4.1. Leptin (LEP)

Otkriće LEP (od grč. λεπτός, leptos, "mršav") kao hormona adipoznog tkiva, donelo je 2010. godine naučnicima D. Coleman-u i J. Friedman-u prestižnu Laskerovu nagradu za klinička istraživanja u medicini. Otkriće ovog hormona bilo je značajan događaj u oblasti fiziologije (Li MD., 2011). Ono što je zanimljivo je da je fiziološka uloga LEP izučavana i mnogo pre njegovog otkrića, tako što je spontana mutacija koja je povezana sa gojaznošću i dijabetesom kod miševa (Ingalls i sar., 1950; Hummel i sar., 1966) dekadama kasnije definisana kao uzrok deficijencije za hormon LEP i njegov receptor. Iako LEP kao hormon adipocita primarno učestvuje u regulaciji energetskog balansa kroz praćenje depoa masnog tkiva, danas je poznato da on ima plejotropne efekte koje ostvaruje kroz regulaciju neuroendokrine i imunske funkcije, kao i razvića i organogeneze (La Cava i Matarese, 2004; Matarese i sar., 2010; Ahima i Flier, 2000; Briffa i sar. 2015; La Cava A., 2017). Ove efekte LEP ostvaruje vezujući se za dugu izoformu svog receptora (Ramos-Lobo i Donato, 2017), koji je eksprimiran u različitim tipovima ćelija, kao što su glatke i poprečno-prugaste mišićne ćelije, endotelne ćelije i leukociti (Peelman i sar., 2004), a predominantno u hipotalamusu (White i Tartaglia, 1996).

U patogenezi MS, utvrđeno je da aktivirani T limfociti luče LEP u aktivnim moždanim lezijama miševa sa eksperimentalnim autoimunskim encefalomijelitisom (EAE), koji predstavlja eksperimentalni model MS, dok indukcija EAE izostaje kod miševa deficijentnih za LEP (Sanna i sar., 2003). Pokazano je i da LEP stimuliše produkciju

proinflatornih citokina TNF- $\alpha$  i IL-6, *in vitro*, u PML dobijenim od pacijenata sa MS u toku aktivne faze bolesti (Batocchi i sar., 2003). U nekoliko studija su detektovani približno isti nivoi serumskog LEP kod obolelih od RR MS i zdravih osoba (Batocchi i sar., 2003; Chatzantoni i sar., 2004; Rotondi i sar., 2013), dok su druge studije pokazale da su nivoi LEP značajno povišeni u serumu i cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata sa RR MS, u odnosu na zdrave osobe (Frisullo i sar., 2007; Matarese i sar., 2005, Matarese i sar., 2008), što sugeriše da LEP može biti molekularni marker MS.

#### 1.4.1.1. *LEP*: struktura i regulacija transkripcije gena

Humani gen za LEP (NCBI identifikacioni broj gena: 3952) se nalazi na hromozomu 7, lociran na poziciji q32.1. Dužine je 16 429 baznih parova (bp) i sastoji se od 3 egzona i 2 introna (*Homo sapiens* ažurirana baza 109.20200522, GRCh38.p13). Genski transkript (iRNK) sadrži 3 427 nukleotida (NCBI referentna sekvenca: NM\_000230.3) i kodira polipeptidni lanac LEP od 167 aminokiselina (ak), mase 18 641 Da (NCBI referentna sekvenca: NP\_000221.1).

U radu autora Considine R. sumirani su efekti različitih regulatora transkripcije *LEP*. Među pozitivnim regulatorima su veličina adipocita, estrogini hormoni, insulin/glukoza/heksozamini, glukokortikoidi, akutno delovanje citokina, dok uticaj na supresiju transkripcije imaju androgeni hormoni, simpatički nervni sistem, agonist receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma i hronično delovanje citokina (Considine R.V., 2001). Mason i sar. su izvršili karakterizaciju promotorskog regiona gena za mišji i humani LEP. Promotor humanog *LEP* obuhvata region od -2931 do +1, sadreći vezivna mesta za regulatore transkripcije (Bartella i sar., 2008; Mason i sar., 1998). Region koji obuhvata sekvencu od TATA bloka do mesta početka transkripcije (pozicija od -30 do +1) je izuzetno konzervativan. Utvrđeno je da, pored TATA bloka, u promotorskom regionu postoji još nekoliko proksimalnih vezujućih sekvenci pojačivača (engl. *enhancer*), za koje se vezuju transkripcioni aktivatori, kao što su: C/EBP (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein beta*), LP1 (engl. *Non-specific lipid-transfer protein 1*), Sp-1 (engl. *Specificity protein 1*), GR (engl. *Glucocorticoid receptor*), C/EBP $\alpha$  (engl. *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*) i trans-delujući protein SREBP1c (engl. *isoform C of Sterol regulatory element-binding protein 1*) (Mason i sar., 1998; Wrann i Rosen, 2012). Kao supresor transkripcije *LEP* definisan je aktivatorni protein-2 $\beta$  (AP-2 $\beta$ ) (Fuke i sar., 2010). Pored direktnog uticaja aktivatora i supresora na nivo transkripcije gena, varijante pojedinačnog nukleotida (engl. *single nucleotide variant, SNV*) kao i epigenetičke promene (demetilacija citozina CpG ostrvaca, koja se dešava tokom adipogeneze) mogu takođe uticati na ekspresiju *LEP* (Kuroda i sar., 2016; Stachowiak i sar., 2007).

#### 1.4.1.2. Varijanta rs7799039 u genu *LEP*

Varijanta rs7799039, na poziciji 2548 uzvodno od mesta početka transkripcije gena za LEP (-2548 G/A), prvi put je opisana 1998. godine. Alel -2548A je asociran sa značajno povišenim LEP u plazmi, nezavisno od indeksa telesne mase (BMI), kod gojaznih

ispitanika iz francuske populacije (Mammès i sar., 2000; Mammès i sar., 1998). Novija istraživanja potvrđuju da ova varijanta može uticati na regulaciju sinteze LEP. Grupa Bartella i sar., ispitujući mehanizam regulacije ekspresije LEP, utvrdili su da promotor *LEP* sadrži više vezujućih regiona za transkripcione aktivatore, među kojima je i Sp-1. Region za vezivanje ovog aktivatora se nalazi na poziciji od -2540 do -2510 (Bartella i sar., 2008), u čijoj je neposrednoj blizini varijanta rs7799039. Upotrebom metode EMSA (engl. *Electrophoretic Mobility Shift Assay*) utvrđeno je da se nuklearni faktori izolovani iz U937 monocitne ćelijske linije i subkutanih adipocita vezuju za DNK region koji obuhvata rs7799039, i to sa visokim afinitetom za alel A na poziciji -2548 (Hoffsted i sar., 2002). Pokazano je da alel G ove varijante ima efekta na vrednosti markera renalne bolesti kod normotenzivnih i hipertenzivnih pacijenata, u haplotipskom bloku sa još 3 ispitivane SNV (Okpechi i sar., 2010). U meta-analizi koja je ispitala vezu rs7799039 sa nastankom kancera (više tipova), utvrđena je asocijacija genotipa AA sa povišenim rizikom za nastanak karcinoma prostate (He i sar., 2013). Sugerisana je protektivna uloga genotipa rs7799039 GG u patogenezi kardiovaskularnih bolesti, kroz koefekte genotipa i konzumiranja vlakana iz semena indijske bokvice (lat. *Plantago ovata*) na snižavanje nivoa ukupnog holesterola u krvi (Crescenti i sar., 2013).

Do danas je izveden mali broj studija koje su ispitale asocijaciju ove varijante sa nastankom MS, nivoom LEP u serumu/plazmi i nivoom transkripcije (iRNK) *LEP* kod pacijenata sa MS. Najobimnija studija, Rey i sar., koja je izvedena na populaciji iz Nemačke nije utvrdila asocijaciju varijante rs7799039 sa nastankom MS (Rey i sar., 2011). Međutim, ustanovljena je asocijacija rs7799039 alela G sa povišenim vrednostima LEP u serumu u grupi pacijenata sa MS i sa povišenim rizikom za nastanak MS (Farrokhi i sar., 2016), ali i asocijacija genotipa AA sa nastankom bolesti u drugoj studiji (Dashti i sar., 2019). Ovi rezultati su okarakterisali varijantu rs7799039 kao mogući prediktorski genetički marker nivoa cirkulišućeg LEP i genetički faktor rizika za nastanak MS. Nekonzistentnost predstavljenih rezultata zahteva dodatna istraživanja.

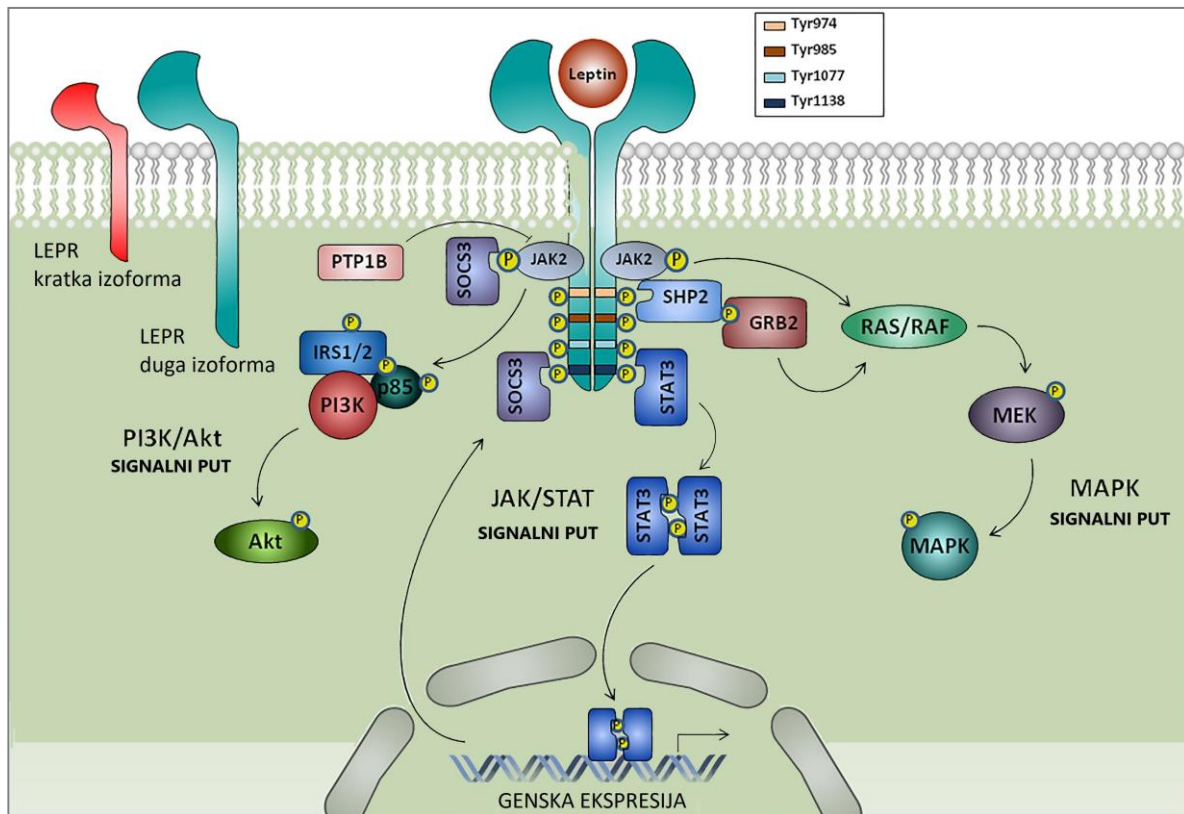
#### 1.4.2. Leptinski receptor (LEPR)

LEPR je transmembranski protein koji pripada klasi I receptora za citokine (La Cava i Matarese, 2004). Identifikovan je u eksperimentu ekspresionog kloniranja, koji su izveli Tartaglia i sar. (Tartaglia i sar., 1995). Receptori ove klase aktiviraju se homo- ili heterodimerizacijom indukovanom ligandom i u mnogim slučajevima zahtevaju aktivaciju kinaza iz familije Janus (engl. *Janus kinases, JAK*), koje su povezane sa receptorima (Ghilardi i sar., 1996). Ligand-zavisna aktivacija receptora uzrokuje vezivanje JAK za proksimalni unutarćelijski domen receptora, nastavljajući prenos signala angažovanjem nizvodnih ciljnih proteina, članova familije STAT (engl. *Signal Transducers and Activators of Transcription*) (Ihle i sar., 1994). STAT su DNK-vezujući transkripcioni aktivatori koji sadrže Src-homologe domene (SH2) kojima komuniciraju sa molekularnim komponentama uključenim u transdukciju signala, preko fosforilisanih rezidua tirozina. STAT proteini se aktiviraju fosforilacijom tirozina, formiraju hetero- ili homo-dimere, translociraju se u nukleus i modulišu transkripciju ciljnih gena. Šematski prikaz aktivacije LEPR i mehanizma unutarćelijske signalne transdukcije dat je na **Slici U5**.

Postoji šest izoformi LEPR koje nastaju kao produkti alternativnog splajsovanja LEPR iRNK. Na osnovu strukturnih razlika, izoforme su podeljene u tri kategorije: duga, kratka i solubilna izoforma (Tartaglia L., 1997). Svih šest izoformi su identične po vanćelijskom domenu dugom 816 ak i transmembranskom domenu dugom 23 ak, izuzev solubilne koja sadrži samo vanćelijski domen receptora. Unutarćelijski domen, dužine 30–303 ak, deli identičnu sekvencu od prvih 29 ak među svim transmembranskim izoformama LEPR (Alti i sar., 2018; Huang i sar., 2001; Tartaglia, 1997). Vanćelijski domen sadrži dva domena homologa citokinskom receptoru (CRH1 i CRH2), imunoglobulinu sličan (engl. *Ig-like*) motiv koji spaja CRH1 i CRH2 domene i dva fibronektin tip III (FNIII) domena (Moharana i sar., 2014). CRH2 domen je neophodan i dovoljan za vezivanje liganda, dok su *Ig-like* motiv, FNIII i CRH1 domen uključeni u aktivaciju receptora (Moharana i sar., 2014). Pokazano je da LEP interaguje sa LEPR u kvaternom 2:2 stehiometrijskom kompleksu. Nakon što su formirani homodimeri, dolazi do aktivacije receptora i transdukcije signala (White i Tartaglia, 1996). Pritom, na ćelijskoj membrani mogu se formirati i 4:4 stehiometrijski kompleksi ligand-receptor (Biener i sar., 2005; Moharana i sar., 2014), uz potencijalno širenje spektra fizioloških uloga LEP (Bacart i sar., 2010).

Duga izoforma receptora, LEPRb, sa 1 162 ak i 130 kDa ([https://www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html)), je potpuno aktivna i zadužena za prenos signala u ćeliju, od membrane do nukleusa. Ova izoforma receptora se eksprimira tipično u hipotalamusu, gde učestvuje u održavanju energetske homeostaze i regulaciji aktivnosti endokrinih organa (Gorska i sar., 2010; Lee i sar., 1996). LEPRb je prisutna i na površini imunskih ćelija urođenog i adaptivnog imunskog odgovora (Alti i sar., 2018; Walduck i Becher, 2012). Vezivanjem LEP za LEPR, unakrsnom fosforilacijom aktivira se Janus kinaza 2 (JAK2) koja dalje fosforiliše tri konzervativne tirozinske rezidue na pozicijama 985, 1077 i 1138 citoplazmatičnog domena receptora ('Box1', 'Box 2' i 'Box3' motivi). Na ovaj način obezbeđuju se mesta za pristajanje signalnih molekula i pokretanje nizvodne signalizacije, tj. adekvatno funkcionisanje LEPR preko JAK/STAT, MAPK (mitogenom aktivirana protein kinaza) ili PI3K (fosfatidilinozitol 3-kinaza) - najvažnijih puteva transdukcije signala (Myers M., 2008; Zabeau i sar., 2016), preko kojih se ostvaruju plejotropni efekti aktivacije ovog receptora (Hekerman i sar., 2005) (**Slika U5**).

Kratke transmembranske izoforme receptora (LEPRa, LEPRc, LEPRd i LEPRf), 896–958 ak (102,5–109,4 kDa) (<https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116678-LEPR>), koje sadrže samo 'Box 1' motiv kao mesto vezivanja JAK kinaze, su sposobne da aktiviraju neke od kaskada signalne transdukcije. LEPRa, LEPRc i LEPRf imaju ulogu u transportu LEP kroz KMB (Alti i sar., 2018; Dam i Jockers, 2013). Solubilna izoforma (LEPRe, dužine 896 ak i molekulske mase 102,5 kDa), jedina bez 'Box' motiva, reguliše koncentraciju cirkulišućeg LEP, ima ulogu u dostavljanju LEP do njegovog membranskog receptora i na taj način služi kao regulator biološke dostupnosti cirkulišućeg LEP (Huang i sar., 2001). U fiziološkim uslovima, samo 5-25% svih transmembranskih izoformi LEPR je prezentovano na površini ćelije, dok je ostali deo lokalizovan unutar ćelije. Nakon vezivanja liganda i aktiviranja receptora, receptor se internalizuje i sledi unutarćelijska degradacija ili njegovo recikliranje tj. ponovni transport receptora do ćelijske membrane. Ovaj proces je naročito važan za LEPRa i LEPRb izoforme (Uotani i sar., 1999).



**Slika U5. Aktivacija duge izoforme LEPR i unutarćelijska signalna transdukcija.** Slika preuzeta i izmenjena iz Francisco i sar., 2018. Vezivanje LEP za dugu izoformu LEPR rezultuje dimerizacijom receptora i podstiče autofosforilaciju JAK2 koja zatim fosforiliše citoplazmatični domen LEPR na reziduama tirozina (Tyr974, Tyr985, Tyr1077, Tyr1138), od kojih svaka funkcioniše kao mesto pristajanja za ciljne citoplazmatične proteine. LEPR-fosforilisani Tyr1138 posreduje u interakciji sa signalnim transduktorom i aktivatorom transkripcije 3 (STAT3), koji se dimerizuje i premešta u nukleus kako bi aktivirao transkripciju ciljnih gena, među kojima je i supresor signalizacije citokina 3 (SOCS3) koji deluje kao negativna povratna sprega transdukcije signala. Pored toga, LEP indukuje aktivaciju SHP2 (engl. *Src homology region 2 domain-containing phosphatase-2*) koja zatim regrutuje adaptorski protein GRB2, što dalje podstiče aktivaciju RAS/RAF/MAPK signalne kaskade. Takođe, LEP pokreće fosfatidilinozitol-3-kinazni (PI3K)/Akt signalni put, preko supstrata insulinskog receptora 1/2 (IRS1/2) i pritom deluje preko protein-tirozin fosfataze 1B (PTP1B) i kao negativni regulator signalizacije putem defosforilacije JAK2.

#### 1.4.2.1. LEPR: struktura i regulacija transkripcije gena

Humani gen za LEPR (NCBI identifikacioni broj gena: 3953) lociran je na hromozomu 1, pozicija p31.3, dužine je 220 892 bp i sastoji se od 24 egzona (Homo sapiens ažurirana baza 109.20200815, GRCh38.p13, NCBI referentna sekvenca: NC\_000001.11). Kodira šest alternativno splajsovanih genskih transkripata (iRNK). Usled alternativnog iskrajanja proksimalnog dela 18. i distalnog dela 19. egzona dolazi do formiranja transkripata duge i kratkih transmembranskih izoformi receptora, dok solubilna izoforma LEPR sadrži prvih 14 kodirajućih egzona, čime izostaju transmembranski i unutarćelijski domen receptora

(Chua i sar., 1997; Li i sar., 2013). Genski transkript (iRNK) duge izoforme LEPR, LEPRb, sadrži otvoreni okvir čitanja dužine 16 324 nukleotida, od 20 egzona (NCBI referentna sekvenca: NM\_002303.6).

Pokazano je da genske varijante mogu uticati na metilacioni status *LEPR* promotora što, u sinergiji sa određenim sredinskim faktorima, dovodi do promene njegove transkripcione aktivnosti (Yousefi i sar., 2013). Utvrđeno je da promotor gena *LEPR* može da učestvuje u regulaciji ekspresije drugih gena, putem inicijacije transkripcije na ATG kodonu sa preklapajućeg okvira čitanja (Bailleul i sar., 1997). Humani i svinjski promotor *LEPR* imaju visok stepen homologije, a analizom sekvence je identifikovano ukupno 16 varijanti, od kojih je 14 locirano unutar predviđenih mesta vezivanja sa transkripcionim regulatorima (Pérez-Montarelo i sar., 2013). Satoh i sar. sugerišu da postoje najmanje dva promotorska regiona koja učestvuju u regulaciji prostorno i vremenski specifične transkripcije humanih *LEPR* izoformi, od kojih jedan funkcioniše preferencijalno u neuronima (Satoh i sar., 2009). *The Human Gene Database* navodi znatan broj mesta vezivanja transkripcionih regulatora u okviru humanog promotorskog regiona, veličine ~1,5 kb (Kyong i sar., 2006), kao što su mesta za: Egr1 (engl. *Early Growth Response 1*), SP1, Gabp (engl. *GA-binding protein*), ELF1 (engl. *E74 Like ETS Transcription Factor 1*), USF1 (engl. *Upstream Stimulatory Factor 1*), TEAD4 (engl. *TEA Domain transcription factor 4*) i dr. (<https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEPR>). Analizom metilacionog statusa promotorskog regiona humanog *LEPR* pokazano je da on može uticati na diferencijalnu aktivnost gena, kao i da koreliše sa nivoom LEP u serumu (Kyong i sar., 2006; Wilhelm i sar., 2021).

Na značaj adekvatne ekspresije *LEPR* ukazuje nalaz da kongenitalna deficijencija *LEPR* uzrokuje hiperfagiju i hipogonadotropni hipogonadizam (Farooqi i sar. 2007). Takođe, Ramos-Lobo i sar., u eksperimentu na genetički modifikovanim miševima, su utvrdili da neaktivni *LEPR* u ranom životnom dobu dovodi do trajne gojaznosti usled supresije trošenja energije, uz kompromitovan reproduktivni uspeh ovih jedinki i neadekvatno razviće mozga, pri čemu su uočene i promene u aktivnosti određenih gena u mozgu. Reaktivacija *LEPR* kod ovih jedinki u odrasloj dobi je prouzrokovala konstantno sniženje nivoa transkripcije *POMC*, *CARTPT* i *PRLH* u hipotalamusu, uz nemogućnost otklanjanja prethodno nastalih defekata u reproduktivnom sistemu i CNS (Ramos-Lobo i sar., 2019). Pokazano je da su pacijenti sa RR MS u fazi relapsa imali značajno povišenu ekspresiju *LEPR* u PML, u odnosu na pacijente u remisiji i zdrave ispitanike (Frisullo i sar., 2007). Takođe, *in vitro* je utvrđeno da smeša proinflamatornih citokina koja sadrži interferon-gama kao preovlađujući Th1 citokin, čija je uloga bitna u patogenezi MS, utiče na ekspresiju iRNK i proteina *LEPR* u glijalnim ćelijama CNS (Rose i sar., 2009).

#### 1.4.2.2. Varijanta rs1137101 u genu *LEPR*

Jedan od glavnih načina putem kojih SNV utiču na strukturu i funkciju proteina je uzrokovanje promene aminokiselinskog sastava. Nukleotidna zamena tipa tranzicije u egzonu 6 gena za *LEPR* (rs1137101, c.668A>G, p.Gln223Arg) je najčešće analizirana varijanta ovog gena (Yang i Niu, 2018). Posledično dovodi do promene kodona CAG u CGG, što rezultuje supstitucijom glutamina argininom na poziciji 223, u vanćelijskom domenu *LEPRb*. Frekvencije prijavljene u *NCBI database* projektu *ALFA* su za alel A 55% i

za alel G 45%, međutim, zabeležene su i drugačije frekvencije kod različitih populacija i etničkih grupa ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1137101#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1137101#frequency_tab)). Varijanta rs1137101 ne utiče samo na fleksibilnost lokalnog proteinskog regiona, već ima globalni uticaj na strukturu receptora. Ova promena ne utiče na afinitet vezivanja liganda za LEPR. Međutim, moguće je da se konformacione promene u LEPR nakon vezivanja LEP, koje su neophodne za aktivaciju JAK2, neće odvijati normalno, što dovodi do rezistencije na LEP usled njegovog umanjenog biološkog efekta uzrokovanog neadekvatnom transdukcijom signala u ćeliji (Daghestani i sar., 2019).

Pokazano je da je varijanta rs1137101 povezana sa promenama BMI, depoa masti u organizmu i nivoa LEP u serumu (Quinton i sar., 2001), kao i nivoa solubilnog LEPR u plazmi (Sun i sar., 2010). Takođe, ova varijanta je asocirana sa gojaznošću (Illangasekera i sar., 2020), kardiovaskularnim oboljenjima (Wu i Sun, 2017), rizikom za nastanak kancera (Rong i sar., 2019), ostreoartritisom (Yang i sar., 2016) i hiperparatireoidizmom (Hoang i sar., 2014). Uspostavljena je asocijacija varijante rs1137101 sa koncentracijom LEP u serumu kod pacijenata sa MS (Farrokhi i sar., 2016), i sa rizikom za nastanak MS uz nekonzistentnost dobijenih rezultata u nekoliko do sada ispitanih populacija (Dashti i sar., 2019; Farrokhi i sar., 2016; Yousefian i sar., 2018), što sugeriše na značaj daljeg ispitivanja rs1137101 u asocijaciji sa MS.

#### **1.4.3. Koaktivator 1 alfa receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PGC1A)**

Familija transkripcionih koaktivatora receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PGC) je opisana kao centralni regulator metaboličkih procesa. PGC familiju čine regulatori aktivnosti transkripcionih faktora i nuklearnih receptora: 1-alfa i 1-beta koaktivatori receptora gama aktiviranog proliferatorom peroksizoma (PGC1A i PGC1B) i koaktivator povezan sa PGC (PRC) (Handschin i Spiegelman, 2006). PGC1B i PRC su otkriveni na osnovu homologije genskih sekvenci.

PGC1A je ključni regulator biogeneze i funkcionisanja mitohondrija, adaptivne termogeneze, glukoneogeneze i drugih metaboličkih procesa (Handschin i Spiegelman, 2006). Široko je eksprimiran, a njegova visoka ekspresija je detektovana u tkivima sa intenzivnim energetskeg metabolizmom: mrkom masnom tkivu, jetri, skeletnim mišićima, srcu, bubrezima i mozgu (Esterbauer i sar., 1999). Ekspresija PGC1A je stimulisana u različitim fiziološkim stanjima - pri pojačanoj fizičkoj aktivnosti, izlaganju infektivnim agensima i restrikciji u ishrani (Handschin i Spiegelman, 2006). Centralna uloga PGC1A, koja je usko povezana sa funkcionisanjem mitohondrija, jeste u uklanjanju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kao nusproizvoda oksidativnog metabolizma, na taj način što stimuliše ekspresiju enzima antioksidativne zaštite, među kojima su superoksid dismutaza 2 i glutation peroksidaza 1 (St-Pierre i sar., 2003). Na ovaj način, učestvujući u regulaciji oksidativnog metabolizma, PGC1A se dovodi u vezu i sa patogenezom MS, s obzirom da je poznato da oksidativni stres učestvuje u autoimunski posredovanom oštećenju tkiva CNS u MS (Solleiro-Villavicencio i Rivas-Arancibia, 2018).

### 1.4.3.1. *PGC1A*: struktura i regulacija transkripcije gena

Humani gen za *PGC1A* (NCBI identifikacioni broj gena: 10891) se nalazi na hromozomu 4, na poziciji p15.2, dužine je 680 885 bp i sastoji se od 24 egzona (Homo sapiens ažurirana baza 109.20200815, GRCh38.p13, NCBI referentna sekvenca: NC\_000004.12). Humana iRNK dužine 6 288 nukleotida (NCBI referentna sekvenca: NM\_013261.5) se prepisuje u protein *PGC1A* (NCBI referentna sekvenca: NP\_037393.1) dug 798 aa, molekularne mase 91,03 kDa (Liang i Ward 2006; <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UBK2>). *The Human Protein Atlas* broji 5 različitih transkripata *PGC1A* ([https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109819-PPARGC1A#gene\\_information](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109819-PPARGC1A#gene_information)).

Regulacija *PGC1A* postiže se aktivacijom proksimalnog i alternativnog promotora (Popov i sar., 2015). Proksimalni promotor sadrži dva konzervativna mesta vezivanja za regulatore MEF2 (engl. *Myocyte Enhancer Factor 2*) i CREB (engl. *CRE-binding site for the cAMP response element-Binding protein*) (Esterbauer i sar., 1999). Alternativni promotor lociran je ~14 kb uzvodno od pozicije proksimalnog promotora. Aktivacijom ovog promotora prepisuje se nekoliko transkripcionih varijanti *PGC1A* iRNK (Popov i sar., 2015). Mehanizmi regulacije transkripcije *PGC1A* delom imaju diferencijalni karakter u odnosu na različita tkiva i stimuluse, iako postoji zajednički osnovni obrazac regulacije (Liang i Ward, 2006; Popov i sar. 2015). Transkripcioni regulatori koji kontrolišu ekspresiju *PGC1A* na tkivno-zavistan način su ATF2 (engl. *Activating Transcription Factor 2*), FoxO1 (engl. *Forkhead Box O1*) i FoxO3A (engl. *Forkhead Box O3A*) (Rius-Pérez i sar., 2020). U regulaciji *PGC1A* učestvuje veći broj signalnih puteva, poput AMPK, PKA, Akt i p38 MAPK puteva, koji mogu delovati preko modulacije transkripcije i posttranslacionih modifikacija. Posttranslacione modifikacije, kao što su fosforilacija, acetilacija i ubikvitinacija, čine prvi, brzi odgovor na akutni stimulus, dok modulacija transkripcije *PGC1A* predstavlja sporiji, adaptivni odgovor na hronične stimuluse (Fernandez-Marcos i Auwerx, 2011).

U inflamatornim uslovima, opadanje nivoa *PGC1A* asocirano je sa pojačavanjem inflamatornog odgovora, kroz aktivaciju nuklearnog faktora-kB (NF-kB) (Matthews P., 2019; Rius-Pérez i sar., 2020). Pregledni rad Rius-Pérez i sar. navodi da citokini (TNF- $\alpha$ , IL1- $\beta$ ) i lipopolisaharidi imaju ključnu ulogu u regulaciji nivoa *PGC1A* u inflamatornim uslovima (Rius-Pérez i sar., 2020). Ovo je bitno za patogenezu MS, budući da rani događaj u nastajanju lezija u CNS predstavlja narušavanje KMB (Yarlagadda i sar., 2009), koje je praćeno pojavom perivenularnih infiltrata proinflatornih mononuklearnih leukocita (Frumento D., 2020). U dosadašnjim istraživanjima detektovane su promene ekspresije *PGC1A* na nivou iRNK i proteina u neuronima i glijalnim ćelijama lezija kod pacijenata sa MS, koje sugerišu na protektivnu ulogu *PGC1A* u patogenezi MS (Nijland i sar., 2014; Witte i sar., 2013).

### 1.4.3.2. Varijanta rs8192678 u genu *PGC1A*

Varijanta rs8192678 je zamena pojedinačnog nukleotida koja rezultuje zamenom aminokiseline (c.1444G>A, p.Gly482Ser), locirana u 8. egzonu gena *PGC1A*. Na osnovu podataka iz rSNPBase (<http://rsnp.psych.ac.cn/>), ova varijanta je okarakterisana kao



regulatorna, jer je locirana na poziciji vezivanja proteina ELAVL1 koji je uključen u posttranskripcionu regulaciju stabilnosti iRNK. Aminokiselinska zamena na poziciji 482 u proteinu PGC1A, kojom rezultuje rs8192678, povezana je sa izmenjenom aktivnošću ovog transkripcionog koaktivatora u regulaciji transkripcije nekoliko ciljnih gena u humanim hepatocitima *in vitro* (Chen i sar., 2013; Choi i sar., 2006). Pored toga, pokazano je da osobe homozigoti ređeg alela, A, varijante rs8192678 imaju značajno više nivoe molekularnog markera lipidne peroksidacije u plazmi, u poređenju sa nivoima istog kod homozigota češćeg alela, GG (Weng i sar., 2010). Do sada je samo jedna studija, tipa GWAS, pokazala vezu između varijante rs8192678 i MS, asocijativno ređeg alela sa bržom progresijom bolesti (Briggs i sar., IMSGC, 2011). Ovaj rezultat podržava buduća istraživanja uloge ove genske varijante kako u kliničkom toku i progresiji MS, tako i sa aspekta rizika za nastanak bolesti.

#### 1.4.4. Superoksid dismutaza 2 (SOD2)

Superoksid dismutaze (SOD) su enzimi aerobnih organizama, koji čine prvu liniju odbrane od reaktivnih slobodnih radikala. Oni katalizuju konverziju superoksid anjon radikala do molekularnog kiseonika i vodonik peroksida. Putem kontrolisanja nivoa ROS, SOD učestvuju u regulaciji širokog opsega ćelijskih procesa (Wang i sar., 2018). Otkriće ovih enzima desilo se pre pola veka (Mc Cord i Fridovich, 1969). Postoje tri klase SOD, u zavisnosti od katalitičkog metalnog jona: Cu/Zn SOD, Mn SOD/Fe SOD i Ni SOD (Fridovich I., 2013). U sisarskim ćelijama postoje tri enzima SOD: SOD1, SOD2 i SOD3. SOD1 (Cu/Zn SOD) enzim lokalizovan je predominantno u citoplazmi, ali je identifikovan i u nukleusu, lizozomima, peroksizomima i međumembranskom prostoru mitohondrija. Enzim SOD2 (Mn SOD) je lokalizovan u mitohondrijalnom matriksu, dok je SOD3 (Cu/Zn SOD) sekretovan u vanćelijski matriks. SOD1 i SOD2 su eksprimirani u svim tipovima ćelija, što ukazuje da su od vitalnog značaja (Wang i sar., 2018).

Aktivni enzim SOD2 je homotetramer (molekulske mase ~88 kDa), čija pojedinačna subjedinica se sastoji od 222 ak, ima molekulska masu ~23 kDa i sadrži jon mangana ( $Mn^{2+}/Mn^{3+}$ ) kao kofaktor (Zhu i sar., 2019). Kodiran je genom u nuklearnoj DNK, a posttranslaciono se translocira u mitohondrijalni matriks. Ugradnjom Mn u katalitičko mesto, SOD2 stiče dismutaznu aktivnost. Antioksidativna funkcija SOD2 u mitohondrijalnom matriksu ne može se zameniti prisustvom SOD1 u mitohondrijalnom međumembranskom prostoru i citosolu (Fridovich I., 2013). Pokazano je da su miševi sa izbačenim genom za SOD2 podložni neonatalnoj smrtnosti, čak i ako je SOD1 pojačano eksprimiran (Copin i sar., 2000).

Gubitak aktivnosti SOD2 prouzrokuje oksidativni stres i, stoga, može rezultirati brojnim patološkim fenotipovima, naročito u metabolički aktivnim tkivima kao što je nervno. Poremećena funkcija SOD2 rezultovala je smrtnim ishodom kod miševa, usled neurodegeneracije i oštećenja srca (Lebovitz i sar., 1996). Stanje inflamacije u demijelizacionim lezijama u MS dovodi do pojačanog stvaranja slobodnih radikala i proinflamatornih citokina, koji zajedno doprinose napredovanju bolesti (Gilgun-Sherki i sar., 2004). Medijatori inflamacije podstiču oksidativni stres i neurodegeneraciju, a pojačana produkcija slobodnih radikala i ćelijska smrt povratno stimulišu inflamatorni odgovor (Gamba i sar., 2015). Dakle, oksidativni stres i inflamacija su neodvojivi,

međusobno-održavajući mehanizmi u patogenezi MS. Pokazano je da SOD kroz odgovor na oksidativni stres učestvuju i u patogenezi MS i da, kao takve, mogu biti meta genske terapije (Ibitoye i sar., 2016).

#### 1.4.4.1. SOD2: struktura i regulacija transkripcije gena

Humani gen *SOD2* (NCBI identifikacioni broj gena: 6648) lociran je na hromozomu 6 na poziciji q25.3, dužine je 93 212 bp i sastoji se od 10 egzona (Homo sapiens ažurirana baza 109.20200815, GRCh38.p13, NCBI referentna sekvenca: NC\_000006.12). Usled prisustva alternativnih promotora i mehanizama obrade pre-iRNK, postoji veći broj transkripcionih varijanti *SOD2*, od kojih je identifikovano 9 refseq iRNK (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6648>). Najduža refseq iRNK (transkripciona varijanta 1) ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM\\_000636.4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/NM_000636.4)) ima 14 167 nukleotida i kodira kanoničku izoformu (A) monomera dužine 222 aa ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_000627.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000627.2)).

Proksimalni promotor humanog *SOD2* ne sadrži TATA ili CAAT sekvence, ali su GC-bogate sekvence prisutne, što je tipično za "housekeeping" gene. Višestruki vezujući motivi u promotorskom regionu *SOD2* sadrže više kopija konsenzus sekvenci za regulatore Sp-1 i AP-2 (Xu i sar., 2002). 3' region humanog *SOD2* sadrži regulatorni element za vezivanje NF- $\kappa$ B (Wan i sar., 1994). Pokazano je da transkripcioni koaktivator PGC1A aktivira transkripciju gena *SOD2* (Valle i sar., 2005), interagujući sa Nrf2 (engl. *NF-E2-related factor 2*) (Cherry i sar., 2014).

U studiji na miševima sa EAE utvrđeno je da supresija aktivnosti *SOD2* dovodi do akutne demijelinizacije, dok je indukcija ekspresije *SOD2* redukovala nastalo oštećenje tkiva, uz smanjenje stepena invaliditeta (Qi i sar., 2007). Kod pacijenata sa MS ustanovljena je značajno snižena ekspresija *SOD2* u kortikalnim neuronima, uporedo sa porastom nivoa ROS i gubitkom neurona, uz opadanje nivoa PGC1A (Witte i sar., 2013). U ćelijama CNS je pokazano da PGC1A koordiniše metaboličke odgovore sa odgovorom na oksidativni stres (Guo i sar., 2018) i da ima ulogu u indukciji *SOD2* (St-Pierre i sar., 2006).

#### 1.4.5. Faktor nekroze tumora-alfa (TNF- $\alpha$ )

Aktivnost koja je uzrokovala regresiju tumora primećena je i dovedena u vezu sa "faktorom nekroze tumora" (TNF) još 1960-ih godina, ali se identifikacija TNF dogodila tek 1984. godine, kada su Aggarwal i sar. izolovali dva citotoksična faktora: jedan iz makrofaga (molekulske mase 17 kDa) nazvan TNF, a drugi iz limfocita (20 kDa) nazvan limfotoksin (Aggarwal i sar., 1984).

TNF- $\alpha$  i ostali članovi superfamilije TNF, otkriveni kao antikancerogeni faktori, do sada su povezani sa nizom patofizioloških stanja, uključujući kancer, neurološke, kardiovaskularne, plućne, autoimunske i metaboličke bolesti (Aggarwal i sar., 2012). Pregledni rad Aggarwal i sar. opisuje 19 članova superfamilije TNF koji svoje efekte ostvaruju vezujući se za 29 različitih receptora, što implicira interakciju liganda sa više od

jednog receptora (Aggarwal i sar., 2012). TNF- $\alpha$  postoji u dve forme. Sintetiše se kao transmembranski protein (tmTNF- $\alpha$ ), nakon čega se oslobađa iz ćelija kao solubilni citokin (sTNF- $\alpha$ ) koji nastaje regulisanim proteolitičkim cepanjem tmTNF- $\alpha$  pri delovanju TNF- $\alpha$  konvertujuće metaloproteinaze (Moss i sar., 1997). Oba oblika TNF- $\alpha$  su biološki aktivna i interaguju sa dva receptora (TNF receptor 1 i 2, TNFR1 i TNFR2) različitim afinitetom (Aggarwal i sar., 1985). Solubilni TNF- $\alpha$  ima veći afinitet za TNFR1, sadrži domen "smrti" i posreduje u apoptozi i inflamaciji. Transmembranski TNF- $\alpha$  ima veći afinitet za TNFR2, aktivira gene važne za preživljavanje ćelija, razrešenje inflamacije, kao i mijelinizaciju (Brambilla i sar., 2011). TNFR1 se eksprimira u svim tipovima ćelija, dok se TNFR2 eksprimira pretežno u neuronima, imunskim ćelijama i endotelnim ćelijama (Probert L., 2015). Danas se TNF- $\alpha$  smatra verovatno najplejotropnijim od svih citokina opisanih kod sisara, sa funkcijama u okviru gotovo svih sistema, uključujući imunski i nervni (Sedger i McDermott, 2014).

#### 1.4.5.1. *TNF-a*: struktura i regulacija transkripcije gena

Humani gen za TNF- $\alpha$  (NCBI identifikacioni broj gena: 7124) lociran je na hromozomu 6 na poziciji p21.33, dužine je 2 772 bp i sastoji se od 4 egzona (Homo sapiens ažurirana baza 109.20200815, GRCh38.p13, NCBI referentna sekvenca: NC\_000006.12). Humana *TNF-a* iRNK (NCBI referentna sekvenca: NM\_000594.4) dužine je 1 678 nukleotida i kodira protein dužine 233 ak, molekulske mase 26 kDa (NCBI referentna sekvenca: NP\_000585.2).

TNF- $\alpha$  se predominantno eksprimira u aktiviranim monocitima/makrofagima (uključujući mikrogliju u CNS) i aktiviranim NK i T limfocitima (Almishri i sar., 2016; Falvo i sar., 2010). Transkripcija *TNF-a* regulisana je faktorima kao što su: NF- $\kappa$ B, c-Jun, aktivatorni protein-1 (AP1) i nuklearni faktor povezan sa aktiviranim T limfocitima (NFAT), koji se vezuju za regulatorna mesta u okviru promotorskog regiona (Falvo i sar., 2010; Rhoades i sar., 1992). Posttranskripciona regulacija *TNF-a* iRNK je pod kontrolom mikroRNK i RNK-vezujućih proteina (Anderson P., 2000).

Hofman i sar., nekoliko godina nakon otkrića ovog vrlo potentnog inflamatornog medijatora, objavljuju rezultat svog istraživanja na *post mortem* tkivima lezija mozga pacijenata sa MS, koji ukazuje na postojanje TNF- $\alpha$ -pozitivnih astrocita i makrofaga u lezijama (Hofman i sar., 1989). TNF- $\alpha$  je asociran sa aktivnošću i progresijom MS, o čemu govori utvrđeni povišeni nivo *TNF-a* iRNK u PML kod obolelih u relapsu u poređenju sa pacijentima u remisiji, kao i pozitivna korelacija nivoa ovog citokina u likvoru/serumu sa kliničkom progresijom MS (Bertolotto i sar., 1999; Sharief i sar., 1991; Simpson i sar., 2015). Pokazano je da nivoi TNF- $\alpha$  iRNK i proteina snažno pozitivno korelišu u PML pacijenata sa MS, koji su *in vitro* stimulisani fitohemaglutininom ili lipopolisaharidom (Rieckmann i sar., 1995). S druge strane, *in vitro* stimulacija luteolinom, flavonoidom sa antioksidantnom aktivnošću, pokazuje dozno-zavisnu redukciju proliferacije PML i nivoa TNF- $\alpha$  u PML, izolovanim iz krvi pacijenata sa MS (Sternberg i sar., 2009).

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI

Ova studija asocijacije po prvi put ispituje povezanost varijanti, uporedo sa nivoima transkripcije (iRNK), gena leptinskog signalnog puta (*LEP*, *LEPR* i *PGC1A*), antioksidativne zaštite (*SOD2*) i inflamacije (*TNF- $\alpha$* ) sa rizikom za nastanak i kliničkim tokom MS kod ispitanika iz populacije Srbije i bazira se na sledećoj hipotezi: ako je MS kompleksna bolest sa izraženim uticajem genetičke komponente u njenom nastanku i kliničkom toku, uključujući gene koji učestvuju u inflamaciji i oksidativnom stresu kao važnim mehanizmima patogeneze ove bolesti, onda će se frekvencije genotipova/alela navedenih ciljnih varijanti i nivoi ciljnih iRNK razlikovati između pacijenata sa MS i zdravih ispitanika, kao i između grupa pacijenata sa različitim tokom bolesti (RR MS i SP MS).

U skladu sa postavljenom hipotezom definisani su ciljevi studije.

1. Detektovanje genskih varijanti *LEP* rs7799039 G>A, *LEPR* rs1137101 A>G i *PGC1A* rs8192678 G>A u ciljnoj grupi pacijenata sa MS (RR MS i SP MS) i kontrolnoj grupi zdravih ispitanika.
2. Ispitivanje asocijacije varijanti rs7799039, rs1137101 i rs8192678 sa rizikom za nastanak MS, kliničkim parametrima i tokom bolesti.
3. Kvantifikovanje i upoređivanje relativnih nivoa iRNK za *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  u PML, i nivoa *LEP* u plazmi, između grupe pacijenata sa RR MS i kontrola, i između pacijenata sa RR MS koji su u različitim fazama bolesti (relaps/remisija).
4. Ispitivanje međusobnih korelacija nivoa *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  iRNK u PML, i njihovih korelacija sa nivoima *LEP* u plazmi i kliničkim parametrima MS.
5. Ispitivanje povezanosti genskih varijanti sa nivoima ciljnih iRNK u PML i nivoom *LEP* u plazmi, u grupama pacijenata sa RR MS i kontrola.

### 3. MATERIJAL I METODE

#### 3.1. Materijal

##### 3.1.1. Uzorak

Genetičko-epidemiološkom analizom asocijacije varijanti u genima za LEP, LEPR i PGC1A sa rizikom za nastanak i kliničkim tokom MS obuhvaćeno je 528 nesrodnih pacijenata sa dijagnozom MS iz populacije Srbije, koji su regrutovani na Klinici za neurologiju Vojnomedicinske akademije (VMA), Beograd, Srbija, u periodu od 2010. do 2018. godine. Svim pacijentima uključenim u ovu studiju postavljena je konačna dijagnoza MS prema revidiranim McDonald-ovim kriterijumima iz 2010. godine (Polman i sar. 2011), pri čemu je određen i tok bolesti na osnovu kliničkih podataka (Lublin i Reingold, 1996) i definisane su dve forme bolesti: RR (441 pacijent) i SP (87 pacijenata). Za definisanje težine kliničke slike bolesti korišćeni su klinički parametri EDSS (Kurtzke, 1983) i MSSS (Roxburgh i sar., 2005). Analiza relativne ekspresije *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  iRNK u PML i nivoa LEP u plazmi, kao i efekata genskih varijanti na nivoe iRNK ciljnih gena i cirkulišućeg LEP, obuhvatila je 64 pacijenta sa RR MS, koji nisu u srodstvu, od kojih je 14 bilo u fazi relapsa, a 50 u remisiji. Svi pacijenti koji su uključeni u studiju i bili u fazi remisije, primali su 0,25 mg Betaferona® (Bayer Pharma AG) - interferona beta-1b, svakog drugog dana tokom perioda od najmanje 12 meseci.

Grupu kontrolnih ispitanika čine zdravi dobrovoljci iz populacije Srbije koji nisu u srodstvu i koji su uključeni u studiju prilikom dolaska na kontrolni zdravstveni pregled na VMA, koji je obuhvatio standardne biohemijske analize krvi. Asocijacionom analizom genskih varijanti je obuhvaćeno 429, a analizom relativnih nivoa ciljnih iRNK i cirkulišućeg LEP 62 kontrolna ispitanika, bez postojanja MS ili druge autoimunske/neurodegenerativne bolesti CNS u porodičnoj anamnezi.

Od svakog učesnika u studiji (pacijenta i kontrolnog subjekta) prikupljen je po jedan uzorak pune krvi za ekstrakciju ćelijske jedarne DNK koja je korišćena u analizi genskih varijanti, dok su od učesnika u kvantitativnoj analizi ciljnih iRNK i LEP prikupljena još po dva dodatna uzorka pune krvi: jedan je upotrebljen za izdvajanje PML iz kojih je zatim ekstrahovana ukupna RNK za analizu relativne ekspresije ciljnih iRNK, a drugi za izdvajanje krvne plazme za analizu koncentracije LEP.

Etički komitet VMA odobrio je realizaciju studije. Svaki učesnik uključen u ovu studiju dao je saglasnost za učešće u istraživanju potpisivanjem obrasca o informisanosti. Genetičko-epidemiološka analiza varijanti i relativnih nivoa transkripcije ciljnih gena i cirkulišućeg LEP urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča” - Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu, Beograd, Srbija.

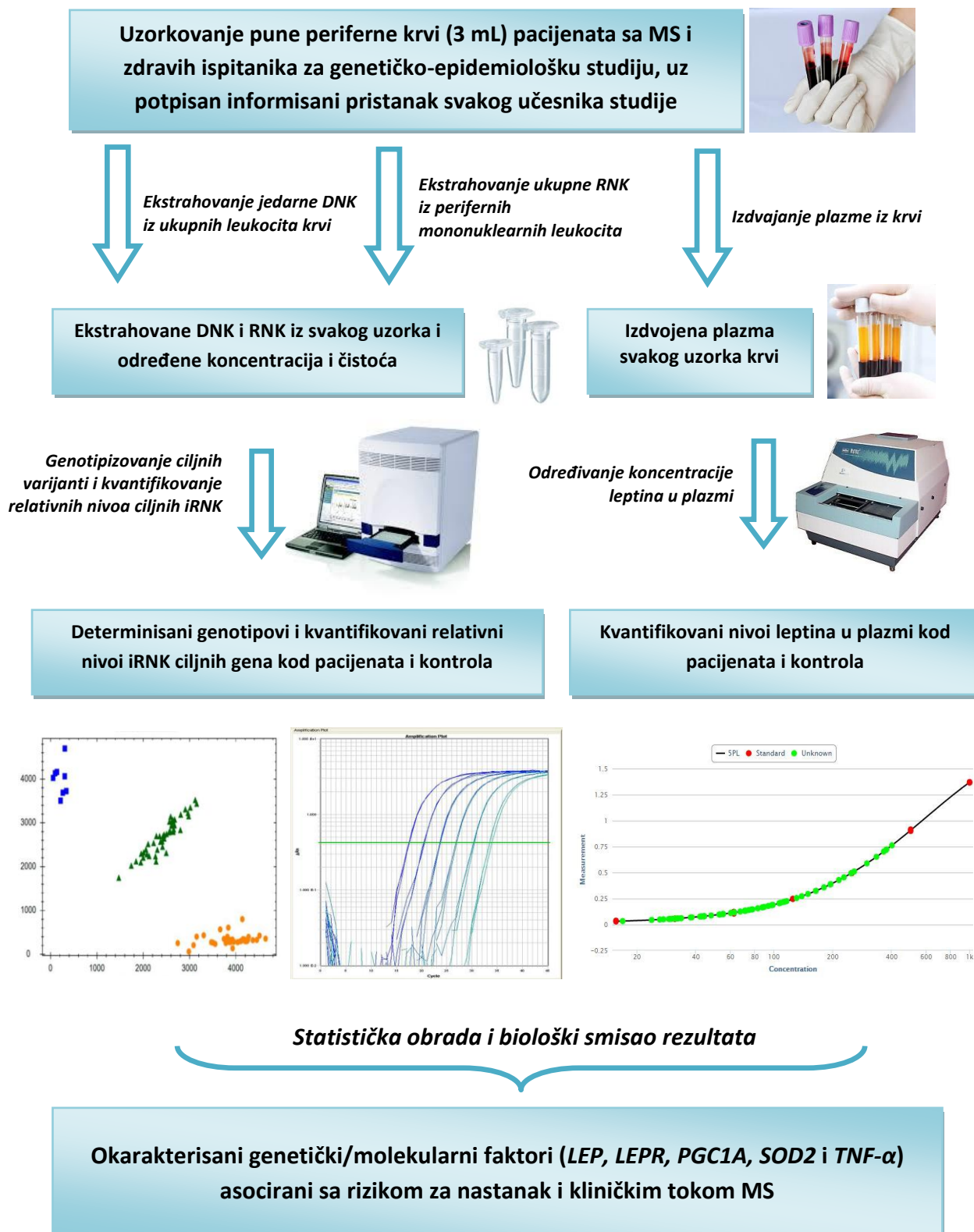
### 3.1.2. Aparatura

Prilikom izrade teze korišćena je sledeća aparatura:

- spektrofotometar NanoDrop® ND-1000 (Thermo Scientific)
- PCR aparat: ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific)
- real-time PCR sistem: Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific)
- čitač mikroploče Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA)
- mikrocentrifuga (Eppendorf 5417R)
- cenrifuga ("Super Speed" Sorvall Inc, Norwalk Conn USA)
- vodeno kupatilo (Termomedicinski aparati, Bodalec i Havoić, YU)
- termoblok ("Drybath Stdrd" 1 blk, Thermo Scientific, USA)
- vaga (Tehtnica ET 111, YU)
- analitička vaga (Mettler, Switzerland)
- pH metar (Iskra MA 5730, YU)

### 3.2. Metode

Dizajn ove genetičko-epidemiološke studije je šematski predstavljen na **Slici M1**.



Slika M1. Šematski prikaz dizajna genetičko-epidemiološke studije

### 3.2.1. Ekstrakcija jedarne DNK iz leukocita pune krvi

Ekstrakcija genomske DNK metodom po Kunkel-u i saradnicima (Kunkel i sar. 1977) predstavlja metodu koja rezultuje visokim prinosom i kvalitetom ekstrahovane DNK. Pre izvođenja procedure, uzorci pune periferne krvi iz kubitalne vene (3 mL) su prikupljeni od svih učesnika studije i skladišteni, sa dodatkom antikoagulansa EDTA, na -20°C do trenutka ekstrakcije leukocitne DNK.

#### Postupak:

1. Uzorak 3 mL pune krvi pomešan je sa 24 mL lizogenog rastvora (0,32 mol/L saharoza, 10 mmol/L Tris-HCl pH 7,5, 5 mmol/L MgCl<sub>2</sub> i 1% Triton X-100).
2. Smeša je centrifugirana u Sorvall centrifugi 10 minuta na 4°C, 800 rcf.
3. Nakon odlivanja supernatanta, talogu je dodato 125 µL "rastvora II" (0,024 mmol/L EDTA pH 8,0 i 0,075 mmol/L NaCl) u kojem je resuspendovan talog.
4. Smeši je dodato 62,5 µL 10% SDS, deterdženta kojim se razlažu sve ćelijske membrane.
5. Dodato je 50 µL proteinaze K (10 mg/mL) i zatim je smeša inkubirana 12-18 h na 37°C.
6. Nakon inkubacije smeši je dodato 500 µL ekvilibrisanog fenola, pH 7,8. Fenol omogućava razdvajanje proteina od DNK. Centrifugirano je 19 minuta na 18°C, 10800 rpm.
7. Izdvojena je gornja faza, nakon centrifugiranja, i u nju dodato 400 µL smeše fenol:hloroform u odnosu 1:1. Smeša je centrifugirana 19 minuta na 18°C, 10800 rpm.
8. Nakon centrifugiranja izdvojena je gornja faza i dodata joj je ista zapremina smeše hloroform:izoamilalkohol u odnosu 24:1. Hloroform uklanja zaostali fenol iz prethodnog koraka, dok izoamilalkohol smanjuje penu koja potiče od deterdženta. Smeša je centrifugirana 19 minuta na 18°C, 10800 rpm.
9. Izdvojenoj gornjoj fazi dodat je ohlađen 96% etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) u količini od dve zapremine izdvojene faze uzorka i 3M natrijum acetat (CH<sub>3</sub>COONa), pH 5,0, u količini od 1/10 izdvojene faze uzorka. DNK je precipitirala u vidu končica.
10. DNK je staložena na dno mikroeprevete, centrifugiranjem 19 minuta na 4°C, 11900 rcf. Supernatant je odliven iz mikroeprevete, a talog DNK ispran sa 1 mL 70% etanola. Nakon ispiranja etanol je odliven.
11. Talog ekstrahovane DNK je rastvoren u 200 µL nuclease-free vode (komercijalno dostupna voda bez nukleaza).
12. Uzorci rastvorene DNK čuvani su na +4°C do daljeg korišćenja.



### 3.2.2. Kvantitativna i kvalitativna provera ekstrahovane DNK

Određivanje koncentracije i provera čistoće ekstrahovane DNK, spektrofotometrijskom metodom koja se zasniva na specifičnoj apsorpciji svetlosti od strane nukleinskih kiselina u UV oblasti, urađeni su upotrebom aparata NanoDrop® ND-1000. Merenjem apsorbancije DNK na 230 nm, 260 nm i 280 nm utvrđena je čistoća ekstrahovanih uzoraka i ustanovljeno da odgovara preporučenom referentnom opsegu odnosa  $A_{260/230}$  i  $A_{260/280}$  (1,8-2,0). Izmerena koncentracija DNK izražena je u ng/ $\mu$ L.

### 3.2.3. Lančana reakcija polimeraze (PCR) za detektovanje genskih varijanti *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 primenom TaqMan® eseja za diskriminaciju alela

Bialelne SNV se genotipizuju tehnikama koje diskriminišu bilo koju dvoalelnu kombinaciju adeninskog, guaninskog, citozinskog i timinskog nukleotida. Među najsnažnijim testovima za diskriminaciju alela je test u realnom vremenu koji se bazira na osetljivoj i specifičnoj kvantifikaciji umnoženih sekvenci DNK, primenom kvantitativne lančane reakcije polimeraze (qPCR), i na kvalitativnoj detekciji sekvenci od interesa u "end-point" analizi prikupljenih podataka na kraju PCR reakcije. Komercijalne TaqMan® eseje za diskriminaciju alela čini par oligonukleotidnih amplimera koji okružuju varijabilno mesto i par alel-specifičnih proba čije se sekvence, komplementarne ispitivanom fragmentu koji sadrži varijantu od interesa, razlikuju samo u ciljnom varijantnom nukleotidu: jedna proba sadrži nukleotid komplementaran "wild type"/češćem alelu ispitivane varijante, dok je druga proba komplementarna sekvenci koja sadrži alternativni nukleotid/ređi alel. Svaka alel-specifična proba u komercijalnom TaqMan® eseju obeležena je specifičnom fluorescentnom bojom na 5' kraju. Očitavanjem fluorescentnog signala specifičnih fluorofora (VIC i/ili FAM), dolazi do formiranja tri diskretna klastera koji će biti definisani kao: homozigot za češći alel, homozigot za ređi alel i heterozigot. Za genotipizaciju ciljnih varijanti primenjene su komponente reakcione smeše i temperaturni profil PCR reakcija prema instrukcijama proizvođača ([https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0009593\\_TaqManSNP\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLSG%2Fmanuals%2FMAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf); Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific).

#### Korišćeni reagensi:

- komercijalni setovi amplimera i alel-specifičnih proba za genotipizaciju, TaqMan® SNP Genotyping Assay (40x): C\_\_1328079\_10 (rs7799039), C\_\_8722581\_10 (rs1137101) i C\_\_1643192\_20 (rs8192678) (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific) (**Tabela M1**)
- ostale komponente reakcije: TaqMan® Genotyping Master Mix (2x) (sadrži AmpliTaq Gold® DNK polimerazu, pufer, dNTP miks, pasivnu referencu Rox) (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific)

Tabela M1. Karakteristike korišćenih komercijalnih alel-specifičnih TaqMan® eseja

Gen, varijanta (ređi alel) Oznaka eseja	Ciljna sekvenca za vezivanje alel-specifične probe [Boja koja obeležava alel-specifičnu probu] {Lokacija ciljnog nukleotida na osnovu GRCh38 verzije}
<i>LEP</i> , rs7799039 (A) C__1328079_10	TTGTTTTGTTTTGCGACAGGGTTGC[A/G]CTGATCCTCC CGCCTCAGTCTCCCT [VIC/FAM] {Hromozom 7: 128238730}
<i>LEPR</i> , rs1137101 (G) C__8722581_10	ATCACATCTGGTGGAGTAATTTTCC[A/G]GTCACCTCTA ATGTCAGTTCAGCCC [VIC/FAM] {Hromozom 1: 65592830}
<i>PGC1A</i> , rs8192678 (A) C__1643192_20	CTGAAATCACTGTCCCTCAGTTCAC[C/T]GGTCTTGTCT GCTTCGTCGTCAAAA [VIC/FAM] {Hromozom 4: 23814039}

### 3.2.4. Izdvajanje PML iz pune krvi

Za analizu relativnih nivoa transkripcije (iRNK) ciljnih gena, od svakog ispitanika koji je uključen u ovaj deo studije uzet je uzorak od 3 mL pune krvi iz kubitalne vene, sa antikoagulansom EDTA, iz kojeg su u periodu od oko 30 minuta od uzorkovanja izdvojeni PML za ekstrakciju ukupne RNK i naknadne eksperimentalne procedure.

Metoda separacije mononuklearnih leukocita centrifugiranjem u gradijentu gustine zasniva se na primeni separacionog medijuma (Lymphocyte Separation Medium, LSM 1077, PAA), koji sadrži polisaharidni agens (polimer sukroze) kao osnovnu komponentu za agregaciju eritrocita, a zbog male viskoznosti je pogodan za izdvajanje mononukleara iz pune krvi pri malim brzinama centrifugiranja. Diferencijalna migracija ćelija krvi kroz separacioni medijum rezultuje formiranjem vidljivih agregata ćelija u slojevima, prema njihovoj gustini. Ova metoda obezbeđuje prinos oko 60% od ukupnog broja mononukleara iz uzorka pune krvi, što iznosi oko  $1,5 \times 10^6/1$  mL krvi.

#### Postupak:

1. Zapremina uzorka pune krvi razblažena je fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl), u odnosu 1:1.
2. U epruvetu u koju je prethodno sipano 3 mL LSM dodato je razblaženje krvi, lagano uz zid epruvete, kako bi se izbeglo mešanje dve faze.
3. Uzorak je centrifugiran 20 minuta na sobnoj temperaturi, 800 g.
4. Nakon centrifugiranja, PML su bili vidljivi kao beli prsten u interfazi, koja je izdvojena Pasterovom pipetom i sipana u novu epruvetu.
5. Izdvojeni PML pomešani su sa 6 mL fiziološkog rastvora i staloženi centrifugiranjem 10 minuta na sobnoj temperaturi, 250 g, nakon čega je odliven fiziološki rastvor.

### 3.2.5. Ekstrakcija ukupne RNK iz PML

Po izdvajanju PML (limfocita i monocita) iz pune krvi, ekstrahovana je ukupna ćelijska RNK korišćenjem reagensa TRI Reagent Solution®, prema protokolu proizvođača (Ambion, Austin, USA). Ovaj reagens predstavlja pripremljenu smešu za izvođenje modifikovane metode ekstrakcije RNK po autorima Chomczynski i Sacchi (Chomczynski i Sacchi, 1987).

#### Postupak:

1. U epruvetu sa talogom PML sipan je 1 mL reagensa TRI Reagent Solution. Talog je resuspendovan i sadržaj prebačen u mikroeprevetu zapremine 1,5 mL.
2. Smeša je inkubirana 5 minuta na sobnoj temperaturi (dolazi do lize ćelija).
3. Nakon inkubacije dodato je 200 µL hloroforma.
4. Smeša je energično promešana i inkubirana 15 minuta na sobnoj temperaturi.
5. Smeša je zatim centrifugirana 15 minuta na 4°C, 12000 g. Vodena (gornja) faza, koja sadrži RNK, prebačena je u novu mikroeprevetu.
6. Dodato je 500 µL izopropanola, kratko vorteksovano i inkubirano 10 minuta na sobnoj temperaturi.
7. Uzorak je centrifugiran 8 min na 4°C, 12000 g. Nakon centrifugiranja, RNK je staložena na dnu mikroeprevete (vidljiva kao beli talog).
8. Odliven je supernatant i talog RNK ispran dodavanjem 1 mL 75% etanola (apsolutni etanol razblažen komercijalno dostupnom vodom bez ribonukleaza).
9. Uzorak je centrifugiran 5 min na 4°C, 7500 g.
10. Nastavkom mikropipete uklonjen je sav alkohol i RNK osušena u termobloku, oko 20 minuta na 37°C.
11. Osušena RNK rastvorena je u 25 µL Ambion® vode bez nukleaza, inkubacijom 10 minuta na 60°C.
12. Uzorci rastvorene RNK čuvani su na -70°C do dalje upotrebe.

### 3.2.6. Kvantitativna i kvalitativna provera ekstrahovane RNK

Provera čistoće i određivanje koncentracije ekstrahovane ukupne ćelijske RNK urađena je spektrofotometrijskom metodom, na aparatu NanoDrop® ND-1000. Za utvrđivanje čistoće uzoraka određivana je apsorbancija RNK na 230 nm, 260 nm i 280 nm. Čistoća ekstrahovanih uzoraka je bila u okviru preporučenog referentnog opsega odnosa  $A_{260/230}$  i  $A_{260/280}$  (1,8-2,0). Izmerena koncentracija uzoraka RNK je izražena u ng/µL.

### 3.2.7. Tretman ekstrahovane RNK dezoksiribonukleazom I

U cilju uklanjanja jednolančanih i dvolančanih molekula DNK, uzorci ekstrahovane RNK su tretirani dezoksiribonukleazom I (DNKaza I). To je endonukleaza aktivna u prisustvu jona  $Mg^{2+}$ , koja katalizuje reakciju hidrolize fosfodiesterarskih veza duž lanca

DNK, nespecifično, vršeći digestiju jednolančanih i dvolančanih molekula DNK. Reakcija je izvedena prema protokolu proizvođača ([https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0012000\\_DNase\\_I\\_RNasefree\\_1UuL\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf); Thermo Fisher Scientific, USA).

#### **Korišćeni reagensi:**

- dezoksiribonukleaza I, DNaseI (DNKaza I) (Thermo Fisher Scientific)
- 10 x DNaseI reakcioni pufer sa MgCl<sub>2</sub> (100 mM Tris-HCl (pH 7,5 na 25 °C), 25 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM CaCl<sub>2</sub>) (Thermo Fisher Scientific)
- 25 mM EDTA (Thermo Fisher Scientific)
- voda bez ribonukleaza (Ambion®)

#### **3.2.8. Reverzna transkripcija uzoraka RNK**

Nakon pripreme uzoraka RNK, tako da zadovolje odgovarajuće kriterijume (adekvatna koncentracija i čistoća RNK, urađen tretman DNKazom I), izvedena je reverzna transkripcija (RT) poli(A)+ frakcije ukupne RNK iz PML. Ova reakcija je urađena sa ulaznom količinom ukupne RNK od 1 µg, primenom oligo-dT<sub>18</sub> amplimera, dNTP miksa i enzima RevertAid reverzne transkriptaze (Thermo Fisher Scientific, Vilnius, Lithuania). Reakcija je izvedena prema protokolu proizvođača ([https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0012955\\_RevertAid\\_RT\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FSLG%2Fmanuals%2FMAN0012955_RevertAid_RT_UG.pdf); Thermo Fisher Scientific, USA).

#### **Korišćeni reagensi:**

- amplimer, Oligo(dT)<sub>18</sub> (0,5 ng/µL) (Thermo Fisher Scientific)
- smeša dNTP-ova, dNTP mix (10 mM) (Thermo Fisher Scientific)
- inhibitor ribonukleaza, RiboLock (40 U/µL) (Thermo Fisher Scientific)
- reakcioni pufer, 5x RT Buffer (Thermo Fisher Scientific)
- reverzna transkriptaza, RevertAid Reverse Transcriptase (200 U/µL) (Thermo Fisher Scientific)
- voda bez ribonukleaza (Ambion®)

#### **3.2.9. Određivanje relativnih nivoa *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF-α* iRNK u PML metodom qPCR**

Zahvaljujući visokoj osetljivosti, specifičnosti i pouzdanosti, RT-qPCR predstavlja jednu od najčešće korišćenih metoda za kvantifikaciju genskih transkriptata (iRNK) na

osnovu kvantifikacije njima odgovarajućih komplementarnih cDNK. Za određivanje relativnih nivoa *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  iRNK korišćeni su komercijalni TaqMan® eseji, a qPCR reakcije su izvedene prema uputstvu iz protokola proizvođača ([https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4333458\\_GeneEx\\_sgltube\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4333458_GeneEx_sgltube_UG.pdf); Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, USA). Zbog širokog dinamičkog opsega qPCR metode i radi kompenzacije varijabilnosti koja može nastati tokom procedura obrade uzoraka koje prethode izvođenju qPCR, ova metoda zahteva da se u analizu uključi odgovarajući referentni gen (endogena kontrola) u odnosu na koji će se uraditi normalizacija podataka pri generisanju rezultata ekspresije iRNK ciljnih gena. Kao endogena kontrola korišćena je peptidilprolilna izomeraza A (engl. *Peptidylprolyl Isomerase A*, *PPIA*) poznata i pod imenom ciklofilin A. Karakteristike svih TaqMan® eseja korišćenih za relativnu kvantifikaciju ciljnih genskih transkripata prikazane su u **Tabeli M2**.

Svaki TaqMan® esej čini par oligonukleotidnih amplimera i jedna TaqMan® MGB proba koja je na svom 5' kraju obeležena fluorescentnom bojom i dizajnirana je tako da hibridizuje sa ciljnom sekvencom između mesta vezivanja dva specifična amplimera. Tokom čitavog trajanja reakcije, prikupljaju se podaci o intenzitetu detektovanog fluorescentnog signala u svakom ciklusu PCR. U trenutku kada reakcija uđe u eksponencijalnu fazu, prvi put se detektuje amplifikacija ciljne sekvence i definiše se "threshold cycle" (Ct) kao ciklus PCR u kome intenzitet fluorescencije koji potiče od amplifikovane sekvence postane veći od pozadinske fluorescencije. U ovoj analizi, Ct je automatski određivan u SDS softveru (v1.4.0) (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, USA) i dalje korišćen u matematičkoj formuli za preciznu kvantifikaciju ciljne cDNK tj. iRNK. Nivo transkripcije ciljnog gena u svakom ispitivanom uzorku je normalizovan na nivo transkripcije endogene kontrole.

Endogena kontrola koju smo koristili za normalizaciju nivoa transkripcije ciljnih gena odabrana je na osnovu utvrđivanja najstabilnije eksprimiranosti unutar i između ispitivanih ciljnih grupa, kontrola i pacijenata, uz pomoć kompjuterskog programa NormFinder v19 (Excel add-in NormFinder.xla) (<https://moma.dk/files/Normfinder%20documentation-v20.pdf>). Na osnovu navedenog kriterijuma, od potencijalnih endogenih kontrola koje su ispitane odabrana je PPIA.

### **Korišćeni reagensi:**

- komercijalni eseji za kvantifikaciju nivoa iRNK, TaqMan® Gene Expression Assay (20x): Hs00174877\_m1 (za *LEP*), Hs00174497\_m1 (za *LEPR*), Hs01016719\_m1 (za *PGC1A*), Hs00167309\_m1 (za *SOD2*), Hs00174128\_m1 (za *TNF- $\alpha$* ) i Hs99999904\_m1 (za *PPIA*) (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, USA) (**Tabela M2**)
- ostale komponente reakcije: TaqMan® Gene Expression Master Mix (2x) (sadrži AmpliTaq Gold® DNK polimerazu, uracil-DNK glikozilazu, pufer, dNTP miks sa dUTP, pasivnu referencu Rox) (Applied Biosystems - Thermo Fisher Scientific, USA)

**Tabela M2. TaqMan® eseji korišćeni za kvantifikaciju nivoa ispitivanih iRNK**

Gen	Esej	NCBI pristupni br. sekvence transkripta	Pozicija probe (egzoni)	Dužina sekvence obuhvaćene amplimerima (bp)
<i>LEP</i>	Hs00174877_m1	NM_000230.2	2–3	74
<i>LEPR</i>	Hs00174497_m1	NM_001003679.3	6–7	111
<i>PGC1A</i>	Hs01016719_m1	NM_013261.3	10–11	74
<i>SOD2</i>	Hs00167309_m1	NM_000636.3	4–5	67
<i>TNF-α</i>	Hs00174128_m1	NM_000594.3	3–4	80
<i>PPIA</i>	Hs99999904_m1	NM_001300981.1	5–5	98

Relativni nivoi iRNK ciljnih gena određeni su za svaki ispitani uzorak pacijenata i kontrola, prema formuli (Zimmermann i sar., 2003):

$$MNE = (E_{\text{endogena kontrola}})^{srCt \text{ endogena kontrola}} / (E_{\text{ciljni gen}})^{srCt \text{ ciljni gen}},$$

MNE (engl. *Mean Normalized Expression*) - srednja normalizovana ekspresija ciljnog gena u pojedinačnom uzorku, E - efikasnost PCR amplifikacije endogene kontrole/ciljnog gena, srCt - srednja Ct vrednost duplikata pojedinačnog uzorka pri amplifikaciji endogene kontrole/ciljnog gena.

Komercijalni *TaqMan*® eseji obezbeđuju 100% efikasnosti amplifikacije tj.  $E_{\text{endogena kontrola}} = E_{\text{ciljni gen}} = 2$  (Applied Biosystems), tako da gornja formula postaje:

$$MNE = 2^{srCt \text{ endogena kontrola}} / 2^{srCt \text{ ciljni gen}} = 2^{(srCt \text{ endogena kontrola} - srCt \text{ ciljni gen})} = 2^{-dCt}$$

Razlika u relativnom nivou iRNK ciljnog gena između grupa uzoraka predstavljena je kao stepen promene (engl. *Fold Change, FC*), koji izražava koliko je puta nivo iRNK u ispitivanoj grupi veći/manji u odnosu na nivo u referentnoj grupi.

### 3.2.10. Izdvajanje plazme iz periferne krvi

Iz uzoraka periferne venske krvi (3 mL), prikupljenih sa antikoagulansom EDTA, izdvojena je plazma, centrifugiranjem na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 minuta na 1000 g, u periodu najduže 30 minuta od trenutka uzorkovanja krvi. Uzorci plazme su čuvani na -70° C do dalje upotrebe.

### 3.2.11. Kvantifikacija nivoa LEP u plazmi metodom ELISA

Određivanje koncentracije LEP u plazmi (pLEP) urađeno je "sendvič" ELISA metodom (engl. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), uz upotrebu komercijalnog kit-a Quantikine® ELISA Human Leptin Immunoassay, prema protokolu proizvođača (<https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dlp00.pdf?v=20210319>; R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA). U "sendvič" ELISA-i angažovana su dva antitela koja se specifično vezuju za različite epitope ciljnog antigena. Određena količina primarnog antitela je vezana za površinu mikrotitarske ploče. Uzorci koji sadrže antigen nepoznate koncentracije, u ovom slučaju pLEP, kao i serija rastvora standarda sa poznatim koncentracijama LEP (na osnovu kojih se konstruiše standardna kriva za očitavanje nepoznatih koncentracija pLEP u uzorcima koje merimo) su sipani u bunare mikrotitarske ploče i tako je omogućeno vezivanje antigena (LEP) za primarno antitelo. Zatim je u bunare dodato sekundarno antitelo kovalentno kuplovano sa enzimom, a kvantifikacija antigena (LEP) je omogućena spektrofotometrijskim merenjem optičke gustine, na osnovu intenziteta razvijene boje koja reflektuje stopu enzimske konverzije odgovarajućeg, prethodno dodatog, supstrata u obojeni produkt. Merenje optičke gustine urađeno je primenom spektrofotometra Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (PerkinElmer, Inc., Waltham, MA, USA), na talasnoj dužini 450 nm sa korekcijom na 540 nm. Optička gustina je očitana za svaki standard i uzorak, u duplikatu. Srednja vrednost očitane optičke gustine duplikata je korišćena za određivanje koncentracije pLEP (ng/mL), na osnovu konstruisane petoparametarske logističke (5 PL) standardne krive (My Assays: Online data analysis; <http://www.myassays.com/fiveparameter-logistic-curve.assay>).

### 3.2.12. Statistička obrada podataka

Statistička analiza podataka urađena je upotrebom programskog paketa Statistica 8.0 (StatSoft, Inc. 2007). Razlike u distribuciji kategorijskih varijabli, uključujući učestalosti genotipova i alela ispitivanih varijanti, između kontrola i pacijenata i između podgrupa pacijenata sa različitim tokom bolesti, kao i odstupanja od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže, procenjeni su  $\chi^2$  testom. Kao mera jačine asocijacije između genskih varijanti i rizika za nastanak MS/toka MS, korišćen je odnos šansi (engl. *Odds Ratio, OR*) sa intervalom pouzdanosti od 95% (engl. *Confidence Interval, CI*). Kontinualne varijable koje su analizirane u ovoj studiji obuhvataju antropometrijske parametre (starost i BMI), kliničke parametre (trajanje bolesti, EDSS i MSSS) i kvantifikovane nivoe ciljnih molekularnih komponenata (iRNK u PML i pLEP). Normalnost distribucije kontinualnih varijabli ispitana je Shapiro-Wilk W testom. Za poređenje vrednosti kontinualnih varijabli koje su imale normalnu raspodelu, između ispitivanih grupa uzoraka, korišćeni su T-test i Analiza varijanse (ANOVA), dok su za poređenje vrednosti varijabli koje nisu u normalnoj raspodeli korišćeni Mann-Whitney U test i Kruskal-Wallis test. Pre primene ANOVA testa, urađen je Levene-ov test jednakosti varijansi. U analizi korelacija, međuzavisnost kontinualnih varijabli iskazana je Pearson-ovim koeficijentom korelacije ( $r$ ). Za ispitivanje interakcije varijabli korišćena je Faktorijalna ANOVA. Da bi se procenili efekti jedne ili

više prediktorskih varijabli uključenih u odgovarajući model, na nastanak bolesti, primenjena je prosta ili višestruka logistička regresija. Kod višestrukih poređenja, prezentovani rezultati korigovani su na višestruko testiranje primenom Benjamini-Hochberg ili FDR (engl. *False Discovery Rate*) metode, u p.adjust funkciji softverskog paketa The R Stats Package (Stats v3.6.2), i korigovane P vrednosti su prikazane kao  $P_{adj}$ . U svim statističkim testovima, vrednosti P tj.  $P_{adj}$  (ukoliko je rađena korekcija na višestruko testiranje)  $< 0,05$  smatrane su statistički značajnim.



## 4. REZULTATI

### 4.1. Karakteristike ispitivanih grupa uključenih u analizu asocijacije varijanti u genima *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* sa nastankom i kliničkim tokom MS

U **Tabeli R1** (modifikovano, iz Kolić i sar., 2021) predstavljene su osnovne karakteristike kontrola i pacijenata, koji su učestvovali u analizi asocijacije ciljnih genskih varijanti sa nastankom i kliničkim tokom MS. Veća starost kontrolne grupe smanjuje verovatnoću kasnije dijagnoze MS, dok je razlika u starosti RR i SP pacijenata očekivana, kako napredovanje bolesti teče iz RR u SP formu. Samim tim je očekivana i razlika u parametrima: trajanje bolesti, EDSS i MSSS, između ove dve grupe pacijenata. I među kontrolama i među pacijentima, žene su brojnije od muškaraca.

### 4.2. Asocijacija varijanti u genima *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* sa nastankom i kliničkim tokom MS

Distribucija genotipova ispitivanih varijanti (*LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678) u grupi kontrola nije odstupala od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže ( $\chi^2$  test:  $P_{LEP} = 0,10$ ,  $P_{LEPR} = 0,79$  i  $P_{PGC1A} = 0,65$ ). U **Tabeli R2** (Kolić i sar., 2021) predstavljena je distribucija učestalosti genotipova/alela u ispitivanim grupama kontrola i pacijenata. Nakon korigovanja rezultata na višestruko testiranje, ni jedna varijanta nije pokazala značajno različitu distribuciju genotipova/alela između pacijenata sa MS i kontrola ( $P_{adj} > 0,05$ ). Prikazani odnosi šansi sa intervalima poverenja (OR (95% CI)) rezultat su ispitivanja povezanosti genotipova sa nastankom MS po kodominantnom genetičkom modelu (**Tabela R2**). Učestalosti genotipova i alela ispitivanih varijanti nisu značajno različite između pacijenata sa različitim tokom bolesti, RR i SP (**Tabela R3**) (Kolić i sar., 2021). Analizom sve tri ispitivane varijante, testom višestruke logističke regresije, utvrđen je povišen rizik za nastanak bolesti kod nosilaca ređeg alela, A, varijante *PGC1A* rs8192678, OR (95% CI) = 1,32 (1,01-1,73),  $P = 0,04$ , **Tabela R4** (Kolić i sar., 2021).

Nije nađena polno-specifična asocijacija ni jedne od ispitivanih varijanti sa rizikom za nastanak MS niti sa tokom bolesti. Kod muškaraca je utvrđena tendencija povećane frekvencije genotipova koji nose ređi alel, G, varijante *LEPR* rs1137101 među pacijentima sa RR tokom bolesti, u poređenju sa ispitanicima kontrolne grupe: AA = 22,5%, GG + AG = 77,5% naspram AA = 32,1%, GG + AG = 67,9% (prosta logistička regresija, OR (95% CI) = 1,27 (1,01-1,61),  $P = 0,04$ ,  $P_{adj} = 0,08$ ) (**Grafik R1**), međutim, nije bilo značajne interakcije pol-genotip (Faktorijalna ANOVA,  $P > 0,05$ ).

### 4.3. Asocijacija varijanti u genima *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* sa kliničkim pokazateljem progresije MS

U ispitivanoj grupi pacijenata sa MS utvrđeno je da nema značajne asocijacije između ciljnih genskih varijanti i vrednosti kliničkog pokazatelja progresije bolesti, MSSS (**Grafik R2**). Međutim, pokazano je da muškarci nosioci ređeg alela, G, varijante *LEPR* rs1137101 imaju značajno više vrednosti MSSS parametra od muškaraca sa genotipom AA (GG + AG = 5,38 (0,64–9,88) naspram AA = 4,27 (0,78–9,63); Mann-Whitney U test, P = 0,01, P<sub>adj</sub> = 0,03; **Grafik R3 A** (Kolić i sar., 2021)), dok nema značajne asocijacije varijante rs1137101 sa MSSS, po istom genetičkom modelu, kod pacijenata ženskog pola (GG + AG = 4,86 (0,13–9,63) naspram AA = 4,82 (0,45–9,82); Mann-Whitney U test, P = 0,42; **Grafik R3 B**).

**Tabela R1. Karakteristike kontrolne grupe i grupe pacijenata, u okviru kojih je ispitana asocijacija genskih varijanti sa nastankom i kliničkim tokom MS**

	Kontrole n = 429	Pacijenti sa MS (RR+SP) n = 528	P	RR MS n = 441	SP MS n = 87	P <sub>1</sub>
<b>Žene/ muškarci (broj)</b>	237/192	318/210	0,13 <sup>a</sup>	266/175	52/35	0,95 <sup>a</sup>
<b>Starost (godine)</b>	40,0 (16,0 – 80,0)	38,0 (16,0 – 71,0)	<0,001 <sup>b</sup>	36,0 (16,0 – 63,0)	45,0 (23,0 – 71,0)	<0,001 <sup>b</sup>
<b>Trajanje bolesti (godine)</b>	-	6,0 (0,1 – 35,0)	-	5,0 (0,1 – 30,0)	12,0 (2,0 – 35,0)	<0,001 <sup>b</sup>
<b>EDSS</b>	-	3,0 (1,0 – 9,0)	-	2,5 (1,0 – 7,0)	6,0 (2,0 – 9,0)	<0,001 <sup>b</sup>
<b>MSSS</b>	-	4,9 (0,1 – 9,9)	-	4,3 (0,1 – 9,7)	7,0 (1,7 – 9,9)	<0,001 <sup>b</sup>

Vrednosti kontinualnih parametara su prikazane kao medijana (minimum–maksimum); n – broj kontrola/pacijenata; RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; SP MS – sekundarno progresivni tok multiple skleroze; EDSS – (engl. *expanded disability status scale*) klinički parametar stepena invaliditeta kod pacijenata sa MS; MSSS – (engl. *multiple sclerosis severity score*) klinički parametar progresije bolesti; P vrednosti (poređenja): P - pacijenti sa MS vs kontrole, P<sub>1</sub> - SP MS vs RR MS; <sup>a</sup>  $\chi^2$  test, <sup>b</sup> Mann-Whitney U test; značajna razlika za vrednosti P < 0,05.

Tabela R2. Frekvencije genotipova i alela varijanti u *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* u kontrolnoj grupi i u grupi pacijenata sa MS (RR+SP)

Gen Varijanta	Hrom. lokacija			Kontrole	MS pacijenti	P <sup>a</sup>	OR (95% CI)	P <sup>b</sup>	P <sup>b</sup> <sub>adj</sub>
<i>LEP</i> rs7799039G>A	7q32.1	Genotip	GG	153 (37%)	171 (33%)	0,31	1,00	0,49	0,59
			GA	184 (44%)	228 (45%)		1,11 (0,82-1,48)		
			AA	78 (19%)	114 (22%)		1,32 (0,92-1,90)		
		Alel	G	0,59	0,55	1,00			
			A	0,41	0,45	1,15 (0,96-1,39)			
<i>LEPR</i> rs1137101A>G	1p31.3	Genotip	AA	141 (34%)	155 (29%)	0,36	1,00	0,23	0,34
			AG	203 (48%)	266 (50%)		1,20 (0,89-1,60)		
			GG	77 (18%)	107 (21%)		1,26 (0,87-1,83)		
		Alel	A	0,58	0,54	1,00			
			G	0,42	0,46	1,13 (0,94-1,36)			
<i>PGC1A</i> rs8192678G>A	4p15.2	Genotip	GG	166 (38%)	228 (44%)	0,06	1,00	0,02	0,12
			GA	205 (48%)	206 (40%)		0,73 (0,55-0,96)		
			AA	58 (14%)	80 (16%)		1,00 (0,82-1,22)		
		Alel	G	0,62	0,64	1,00			
			A	0,38	0,36	0,92 (0,76-1,11)			

RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; SP MS – sekundarno progresivni tok multiple skleroze; OR – (engl. *odds ratio*) odnos šansi; CI – (engl. *confidence interval*) interval poverenja; <sup>a</sup>  $\chi^2$  test, <sup>b</sup> Prosta logistička regresija, <sup>b</sup><sub>adj</sub> P vrednosti proste logističke regresije nakon Benjamini-Hochberg korekcije na višestruko testiranje; P<sub>adj</sub> < 0,05 vrednosti su smatrane značajnim. (Uspešno genotipizovano: 415 kontrola i 513 pacijenata sa MS za *LEP* rs7799039; 421 kontrola i 528 pacijenata sa MS za *LEPR* rs1137101; 429 kontrola i 514 pacijenata sa MS za *PGC1A* rs8192678.) Tabela objavljena na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2021.

Tabela R3. Frekvencije genotipova i alela varijanti u *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* kod pacijenata sa različitim kliničkim tokom MS

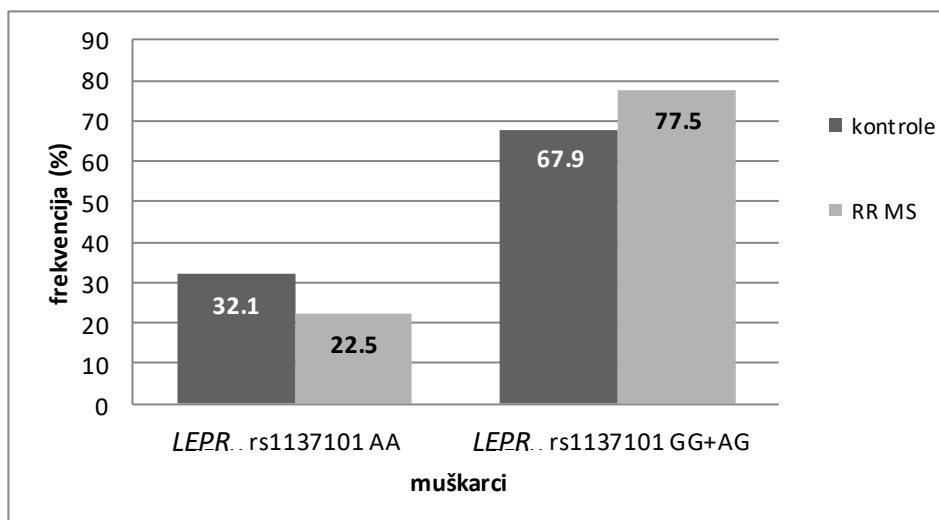
Gen Varijanta	Hrom. lokacija			RR MS pacijenti	SP MS pacijenti	Pa	OR (95% CI)	Pb
<i>LEP</i> rs7799039G>A	7q32.1	Genotip	GG	140 (33%)	31 (36%)	0,36	1,00	0,27
			GA	197 (46%)	32 (38%)		0,74 (0,43–1,27)	
			AA	91 (21%)	22 (26%)		1,09 (0,59–2,01)	
		Alel	G	0,56	0,55	1,00		
			A	0,44	0,45	1,04 (0,92–1,73)		
<i>LEPR</i> rs1137101A>G	1p31.3	Genotip	AA	129 (29%)	26 (30%)	0,54	1,00	0,80
			AG	219 (50%)	47 (54%)		1,06 (0,63–1,82)	
			GG	93 (21%)	14 (16%)		0,75 (0,36–1,53)	
		Alel	A	0,54	0,57	1,00		
			G	0,46	0,43	0,89 (0,64–1,24)		
<i>PGC1A</i> rs8192678G>A	4p15.2	Genotip	GG	188 (44%)	39 (46%)	0,71	1,00	0,54
			GA	176 (40%)	31 (36%)		0,85 (0,51–1,42)	
			AA	65 (16%)	15 (18%)		1,11 (0,57–2,16)	
		Alel	G	0,63	0,59	1,00		
			A	0,37	0,41	1,16 (0,82–1,62)		

RR MS - relapsno-remitentni tok multiple skleroze; SP MS - sekundarno progresivni tok multiple skleroze; OR – (engl. *odds ratio*) odnos šansi; CI – (engl. *confidence interval*) interval poverenja; <sup>a</sup>  $\chi^2$  test, <sup>b</sup> Prosta logistička regresija; P < 0,05 vrednosti su smatrane značajnim. (Uspešno genotipizovano: 428 RR MS i 85 SP MS pacijenata za *LEP* rs7799039; 441 RR MS i 87 SP MS pacijenata za *LEPR* rs1137101; 429 RR MS i 85 SP MS pacijenata za *PGC1A* rs8192678.) Tabela objavljena na engleskom jeziku u dodatnom materijalu Kolić i sar., 2021.

Tabela R4. Analiza učestalosti genotipova varijanti u *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* kod pacijenata sa MS (RR MS + SP MS), u odnosu na kontrole, primenom višestruke logističke regresije

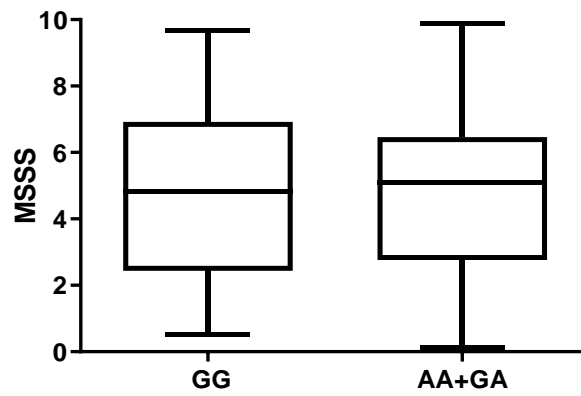
Dominantni genetički model	OR (95% CI)	P
<i>LEP</i> rs7799039G>A AA+GA vs GG	1,20 (0,91-1,58)	0,21
<i>LEPR</i> rs1137101A>G GG+AG vs AA	0,79 (0,60-1,06)	0,11
<i>PGC1A</i> rs8192678G>A AA+GA vs GG	1,32 (1,01-1,73)	<b>0,04</b>

RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; SP MS – sekundarno progresivni tok multiple skleroze; OR – (engl. *odds ratio*) odnos šansi; CI – (engl. *confidence interval*) interval poverenja; P < 0,05 vrednosti su smatrane značajnim. (Model višestruke logističke regresije je obuhvatio 496 pacijenata i 403 kontrolna ispitanika.) Tabela objavljena na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2021.



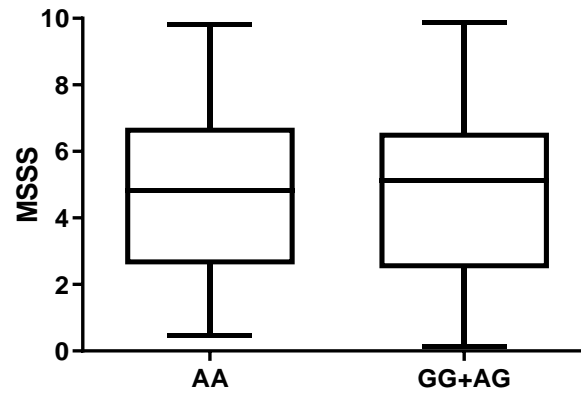
Grafik R1. Distribucija genotipova varijante *LEPR* rs1137101, po dominantnom genetičkom modelu, među kontrolama i pacijentima sa relapsno-remitentnim tokom bolesti (RR MS), muškog pola. RR MS (n = 208) u odnosu na kontrole (n = 186): GG+AG naspram AA, OR (95% CI) = 1,27 (1,01-1,61), P = 0,04, P<sub>adj</sub> = 0,08; statistička značajnost pri P<sub>adj</sub> < 0,05.

A)



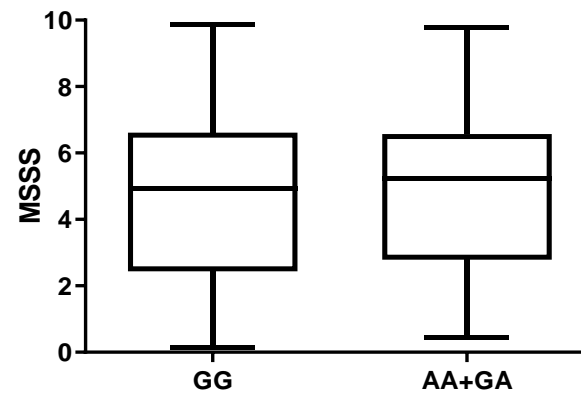
*LEP* rs7799039  
pacijenti sa MS (RR + SP)

B)



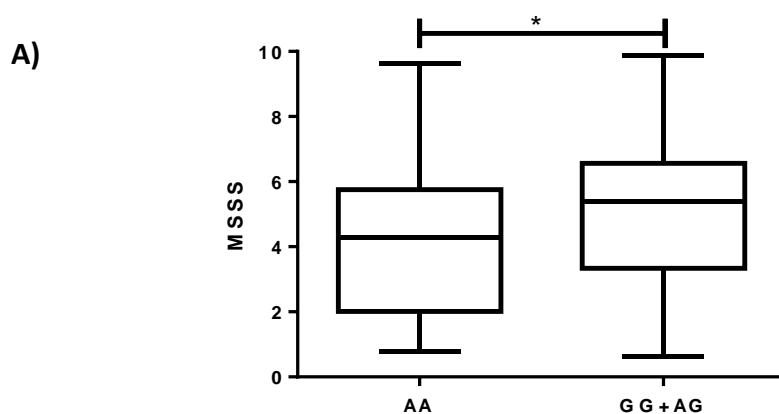
*LEPR* rs1137101  
pacijenti sa MS (RR + SP)

C)

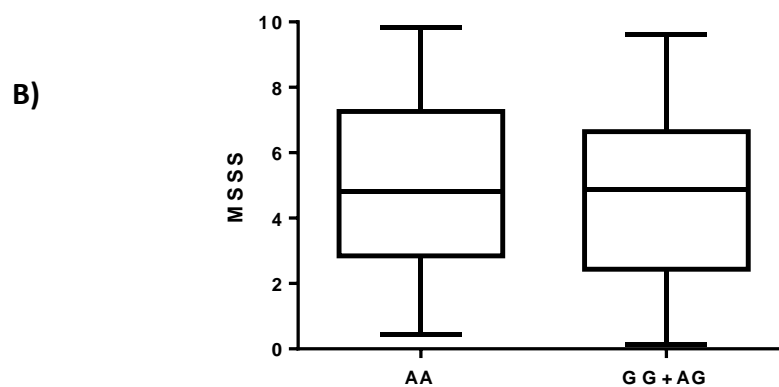


*PGC1A* rs8192678  
pacijenti sa MS (RR + SP)

**Grafik R2. Distribucija vrednosti kliničkog pokazatelja progresije bolesti, MSSS, po dominantnom genetičkom modelu za ciljne genske varijante, kod pacijenata sa MS (RR i SP).** A) *LEP* rs7799039: AA + GA (4,96 (0,13 – 9,88); n = 342) naspram GG (4,82 (0,67 – 9,68); n = 171), P = 0,51; B) *LEPR* rs1137101: GG + AG (5,03 (0,13 – 9,88); n = 377) naspram AA (4,74 (0,45 – 9,83); n = 151), P = 0,86; C) *PGC1A* rs8192678: AA + GA (5,23 (0,45 – 9,79); n = 280) naspram GG (4,82 (0,13 – 9,88); n = 234), P = 0,43. Vrednosti MSSS parametra su prikazane kao medijana (minimum–maksimum). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; SP MS – sekundarno progresivni tok multiple skleroze; MSSS – (engl. *multiple sclerosis severity score*) klinički parametar progresije bolesti. P ( $P_{adj}$ ) < 0,05 vrednosti su smatrane značajnim.



*LEPR* rs1137101  
muškarci pacijenti sa MS



*LEPR* rs1137101  
žene pacijenti sa MS

**Grafik R3. Efekat varijante *LEPR* rs1137101, po dominantnom genetičkom modelu, na nivo MSSS parametra kod pacijenata sa MS (RR + SP):** A) muškog pola – GG + AG (5,38 (0,64–9,88); n = 147) naspram AA (4,27 (0,78–9,63); n = 49), P = 0,01,  $P_{adj}$  = 0,03 (grafik objavljen na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2021); B) ženskog pola – GG + AG (4,86 (0,13–9,63); n = 208) naspram AA (4,82 (0,45–9,82); n = 93), P = 0,42. Vrednosti MSSS parametra su prikazane kao medijana (minimum–maksimum). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; SP MS – sekundarno progresivni tok



multiple skleroze; MSSS – (engl. *multiple sclerosis severity score*) klinički parametar progresije bolesti; \* – statistička značajnost za  $P_{adj} < 0,05$ .

#### 4.4. Analiza relativnih nivoa *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$* iRNK u PML i nivoa pLEP, u kontrolnoj i grupi pacijenata sa RR tokom MS

Analiza nivoa transkripcije ciljnih gena u PML i nivoa pLEP, u okviru koje su ispitani i efekti varijanti *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678, obuhvatila je grupe od 62 kontrole i 64 pacijenta sa RR tokom MS (14 u relapsu i 50 u remisiji), čije su karakteristike prikazane u **Tabeli R5** (modifikovano, iz Kolić i sar., 2020). Nije bilo značajne razlike između pacijenata i kontrola u pogledu odnosa broja žena i muškaraca, starosti, indeksa telesne mase, kao ni izmerenih nivoa pLEP (**Tabela R5**).

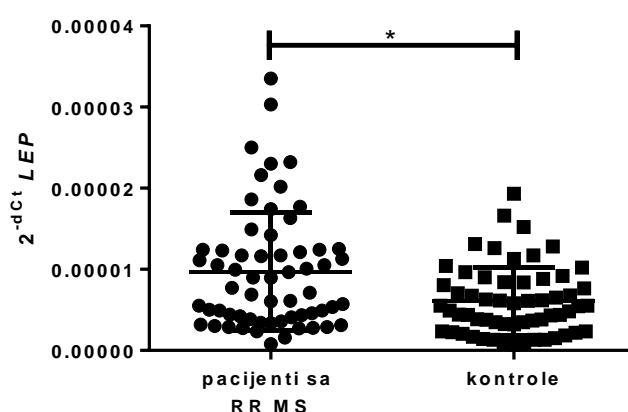
**Tabela R5. Osnovne karakteristike kontrolne grupe i pacijenata sa RR MS, uključenih u analizu relativne ekspresije iRNK ciljnih gena u PML i nivoa pLEP.**

	Kontrole n = 62	RR MS pacijenti n = 64	P
Žene/muškarci (broj)	36/26	35/29	0,70 <sup>a</sup>
Starost (godine)	37,0 (25,0 – 64,0)	39,0 (21,0 – 61,0)	0,05 <sup>b</sup>
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	24,3 (18,4 – 32,9)	22,9 (17,2 – 34,4)	0,22 <sup>b</sup>
pLEP (ng/mL)	5,4 (0,2 – 40,2)	6,8 (0,8 – 37,4)	0,29 <sup>b</sup>
Trajanje bolesti (godine)	-	6,5 (1,0 – 19,0)	-
EDSS	-	2,5 (1,0 – 6,0)	-
MSSS	-	4,3 (0,5 – 9,3)	-

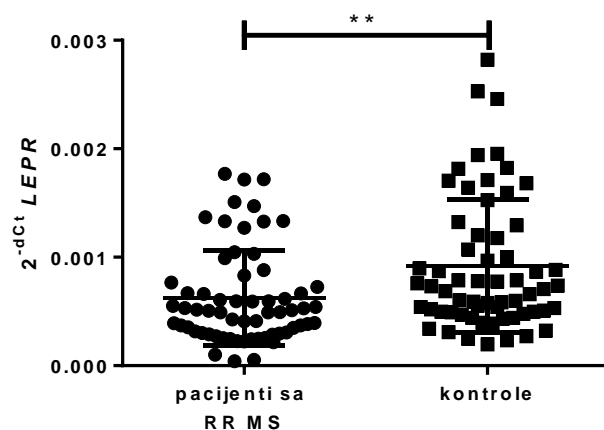
Vrednosti kontinualnih parametara su prikazane kao medijana (minimum–maksimum); n – broj kontrola/pacijenata; RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; BMI – (engl. *body mass index*) indeks telesne mase; pLEP – leptin u plazmi; EDSS – (engl. *expanded disability status scale*) klinički parametar stepena invaliditeta; MSSS – (engl. *multiple sclerosis severity score*) klinički parametar progresije bolesti; <sup>a</sup>  $\chi^2$  test, <sup>b</sup> Mann-Whitney U test. Značajna razlika za vrednosti  $P < 0,05$ .

U grupi pacijenata sa RR MS, u poređenju sa kontrolama, relativni nivo *LEP* iRNK je značajno povišen (FC = 1,42, Mann-Whitney U test,  $P = 0,01$ ) (**Grafik R4**), dok su nivoi *LEPR* i *PGC1A* iRNK značajno sniženi (FC = 0,68, Mann-Whitney U test,  $P = 0,001$ ) (**Grafik R5**) i FC = 0,71, Mann-Whitney U test,  $P = 0,04$ ) (**Grafik R6**) (Kolić i sar., 2020). Nema značajnih razlika u ekspresiji *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  iRNK između pacijenata i kontrola (Mann-Whitney U test,  $P = 0,22$ ) (**Grafik R7**) i  $P = 0,75$ ) (**Grafik R8**)).

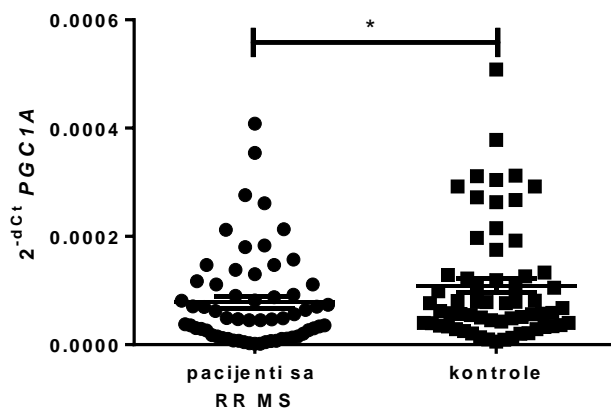
Između pacijenata koji su u različitim fazama bolesti (relaps i remisija) nisu utvrđene značajne razlike u relativnim nivoima transkripcije *LEP* (Mann-Whitney U test,  $P = 0,41$ ), *LEPR* (Mann-Whitney U test,  $P = 0,29$ ), *PGC1A* (Mann-Whitney U test,  $P = 0,31$ ), *SOD2* (Mann-Whitney U test,  $P = 0,45$ ) niti *TNF- $\alpha$*  (Mann-Whitney U test,  $P = 0,20$ ), kao ni razlika u nivou pLEP (Mann-Whitney U test,  $P = 0,50$ ). U odnosu na pol, nije utvrđena razlika u nivou pLEP u grupi kontrola (Mann-Whitney U test,  $P = 0,10$ ), dok razlika nivoa pLEP postoji između žena i muškaraca pacijenata sa RR MS (žene: 7,9 (0,8–37,4) ng/mL, muškarci: 5,2 (0,7–19,4) ng/mL; Mann-Whitney U test,  $P = 0,02$ ) (Kolić i sar., 2020).



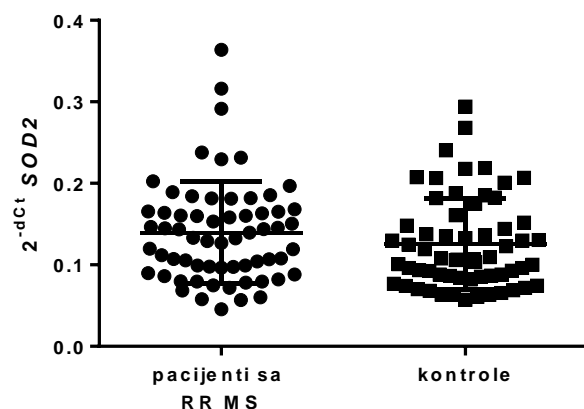
**Grafik R4. Relativni nivoi *LEP* iRNA u grupi pacijenata sa RR MS (n = 64), u odnosu na kontrole (n = 62).** FC = 1,42;  $P = 0,01$ . Za ciljni gen, relativni nivoi iRNA su normalizovani u odnosu na endogenu kontrolu (PPIA). Za svaku grupu, rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim relativnim nivoom iRNA (srednja vrednost  $2^{-dCt}$ )  $\pm$  SD; FC – stepen promene (engl. *fold change*). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; \* označava značajnu razliku za  $P < 0,05$ . Grafik objavljen na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2020.



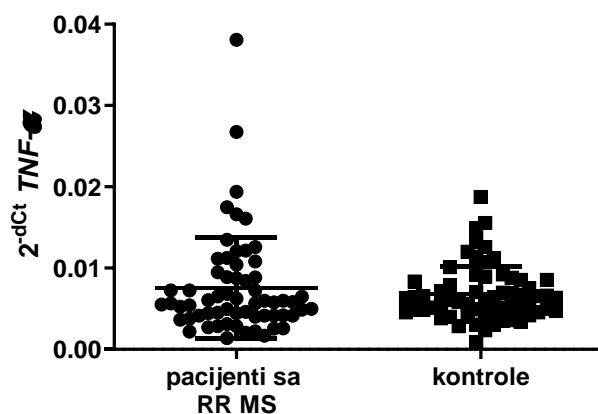
**Grafik R5. Relativni nivoi *LEPR* iRNK u grupi pacijenata sa RR MS (n = 64), u odnosu na kontrole (n = 62).** FC = 0,68; P = 0,001. Za ciljani gen, relativni nivoi iRNK su normalizovani u odnosu na endogenu kontrolu (PPIA). Za svaku grupu, rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim relativnim nivoom iRNK (srednja vrednost  $2^{-dCt}$ )  $\pm$  SD; FC – stepen promene (engl. *fold change*). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; \*\* označava značajnu razliku za P < 0,01. Grafik objavljen na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2020.



**Grafik R6. Relativni nivoi *PGC1A* iRNK u grupi pacijenata sa RR MS (n = 64), u odnosu na kontrole (n = 62).** FC = 0,71; P = 0,04. Za ciljani gen, relativni nivoi iRNK su normalizovani u odnosu na endogenu kontrolu (PPIA). Za svaku grupu, rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim relativnim nivoom iRNK (srednja vrednost  $2^{-dCt}$ )  $\pm$  SD; FC – stepen promene (engl. *fold change*). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; \* označava značajnu razliku za P < 0,05. Grafik objavljen na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2020.



**Grafik R7. Relativni nivoi *SOD2* iRNK u grupi pacijenata sa RR MS (n = 64), u odnosu na kontrole (n = 62). FC = 1,06; P = 0,22. Za ciljani gen, relativni nivoi iRNK su normalizovani u odnosu na endogenu kontrolu (PPIA). Za svaku grupu, rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim relativnim nivoom iRNK (srednja vrednost  $2^{-dCt}$ )  $\pm$  SD; FC - stepen promene (engl. *fold change*). RR MS - relapsno-remitentni tok multiple skleroze; značajna razlika pri  $P < 0,05$ .**



**Grafik R8. Relativni nivoi *TNF-α* iRNK u grupi pacijenata sa RR MS (n = 64), u odnosu na kontrole (n = 62). FC = 1,23; P = 0,75. Za ciljani gen, relativni nivoi iRNK su normalizovani u odnosu na endogenu kontrolu (PPIA). Za svaku grupu, rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim relativnim nivoom iRNK (srednja vrednost  $2^{-dCt}$ )  $\pm$  SD; FC - stepen promene (engl. *fold change*). RR MS - relapsno-remitentni tok multiple skleroze; značajna razlika pri  $P < 0,05$ .**

#### 4.5. Korelacije pLEP sa antropometrijskim, kliničkim parametrima i relativnim nivoima *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$* iRNK u PML

U korelacionoj analizi, koja je obuhvatila pacijente sa RR MS i kontrole, utvrđena je značajna pozitivna korelacija između nivoa pLEP i *TNF- $\alpha$*  iRNK u grupi pacijenata sa RR MS ( $r = 0,38$ ,  $P = 0,02$ ) (Tabela R6; modifikovano, iz Kolić i sar., 2020). Pokazana je i značajna pozitivna korelacija nivoa pLEP sa BMI, kako u celim grupama pacijenata sa RR MS i kontrola (pacijenti:  $r = 0,64$ ,  $P = 10^{-4}$ ; kontrole:  $r = 0,62$ ,  $P = 0,006$ ) (Tabela R6), tako i kod žena i muškaraca u grupi kontrola (žene:  $r = 0,75$ ,  $P = 10^{-7}$ ; muškarci:  $r = 0,43$ ,  $P = 0,03$ ). Kada je grupa pacijenata podeljena po polu, značajna korelacija pLEP–BMI pronađena je isključivo kod žena (žene:  $r = 0,74$ ,  $P = 4 \times 10^{-7}$ ; muškarci:  $r = 0,31$ ,  $P = 0,12$ ). Takođe, pozitivna korelacija je utvrđena i između nivoa *LEPR* iRNK i MSSS ( $r = 0,33$ ,  $P = 0,02$ ) (Tabela R7; modifikovano, iz Kolić i sar., 2020).

**Tabela R6. Korelacije nivoa pLEP sa relativnim nivoima transkripcije ciljnih gena (iRNK) i parametrima BMI i MSSS, u ciljnim grupama ispitanika.**

Varijabla	Kontrole n = 62		Pacijenti sa RR MS n = 64	
	r	P	r	P
<b>pLEP (ng/mL)</b>				
<i>LEP</i> iRNK	-0,07	0,72	-0,09	0,60
<i>LEPR</i> iRNK	0,08	0,67	0,26	0,12
<i>PGC1A</i> iRNK	0,29	0,14	0,03	0,84
<i>SOD2</i> iRNK	0,13	0,52	0,19	0,26
<i>TNF-<math>\alpha</math></i> iRNK	0,37	0,05	0,38	<b>0,02</b>
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	0,62	<b>0,006</b>	0,64	<b>10<sup>-4</sup></b>
<b>MSSS</b>	-	-	-0,03	0,87

U korelacionoj analizi korišćene su vrednosti  $2^{-dCt}$  relativnih nivoa transkripcije gena (iRNK); n – broj kontrola/pacijenata; RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; pLEP – leptin u plazmi; BMI – (engl. *body mass index*) indeks telesne mase; MSSS – (engl. *multiple sclerosis severity score*) klinički parametar progresije bolesti; r – Pearson-ov koeficijent korelacije; značajna razlika pri  $P < 0,05$ .

Tabela R7. Korelacije parametara BMI i MSSS sa relativnim nivoima transkripcije ciljnih gena (iRNK) u grupama ispitanika.

Varijabla	Kontrole n = 62		Pacijenti sa RR MS n =64		
	r	P	r	P	
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	<i>LEP</i> iRNK	0,20	0,17	-0,05	0,78
	<i>LEPR</i> iRNK	0,21	0,14	0,25	0,13
	<i>PGC1A</i> iRNK	0,03	0,81	0,10	0,56
	<i>SOD2</i> iRNK	0,15	0,31	0,10	0,54
	<i>TNF-<math>\alpha</math></i> iRNK	0,23	0,11	0,05	0,78
MSSS	<i>LEP</i> iRNK	-	-	-0,10	0,46
	<i>LEPR</i> iRNK	-	-	0,33	<b>0,02</b>
	<i>PGC1A</i> iRNK	-	-	0,12	0,41
	<i>SOD2</i> iRNK	-	-	0,02	0,86
	<i>TNF-<math>\alpha</math></i> iRNK	-	-	-0,02	0,89

U korelacionoj analizi korišćene su vrednosti  $2^{-dCt}$  relativnih nivoa transkripcije gena (iRNK); n – broj kontrola/pacijenata; RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; BMI – (engl. *body mass index*) indeks telesne mase; MSSS – (engl. *multiple sclerosis severity score*) klinički parametar progresije bolesti; r – Pearson-ov koeficijent korelacije; značajna razlika pri  $P < 0,05$ .

#### 4.6. Međusobne korelacije relativnih nivoa *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF-α* iRNK u PML kod pacijenata sa RR MS i kontrola

Korelacije između relativnih nivoa iRNK ciljnih gena u grupama pacijenata sa RR MS i kontrola prikazane su u **Tabeli R8** (Kolić i sar., 2020). U grupi kontrola, nivo *LEP* iRNK je u značajnoj pozitivnoj korelaciji sa *LEPR* iRNK ( $r = 0,48$ ,  $P = 10^{-4}$ ), *PGC1A* iRNK ( $r = 0,27$ ,  $P = 0,04$ ), *SOD2* iRNK ( $r = 0,36$ ,  $P = 0,005$ ) i *TNF-α* iRNK ( $r = 0,48$ ,  $P = 10^{-5}$ ). Mada je isti tip korelacije utvrđen i kod pacijenata sa RR MS, kod njih *LEP* iRNK značajno koreliše samo sa *SOD2* iRNK ( $r = 0,41$ ,  $P = 0,001$ ). Kod kontrola nivo *LEPR* iRNK značajno pozitivno koreliše sa *SOD2* iRNK ( $r = 0,73$ ,  $P = 10^{-7}$ ) i *TNF-α* iRNK ( $r = 0,81$ ,  $P = 10^{-7}$ ), dok kod pacijenata samo sa *SOD2* iRNK ( $r = 0,47$ ,  $P = 10^{-4}$ ). Nivo *SOD2* iRNK značajno pozitivno koreliše sa *PGC1A* iRNK kod pacijenata ( $r = 0,36$ ,  $P = 0,005$ ), dok sa nivoom *TNF-α* iRNK koreliše i kod pacijenata ( $r = 0,47$ ,  $P = 10^{-4}$ ) i kod kontrola ( $r = 0,70$ ,  $P = 10^{-7}$ ).

**Tabela R8. Međusobne korelacije relativnih nivoa iRNK ciljnih gena u grupama ispitanika.**

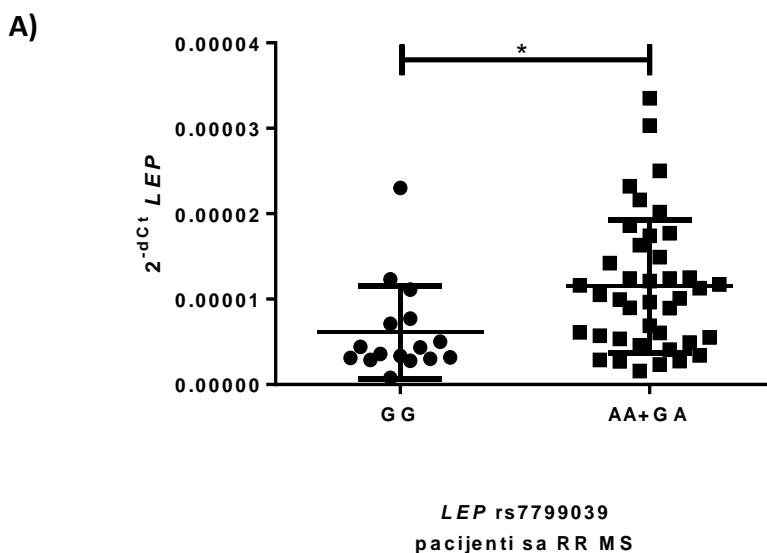
Varijabla		Kontrole n = 62		Pacijenti sa RR MS n = 64	
		r	P	r	P
<i>LEP</i> iRNK	<i>LEPR</i> iRNK	0,48	$10^{-4}$	0,13	0,34
	<i>PGC1A</i> iRNK	0,27	<b>0,04</b>	0,19	0,14
	<i>SOD2</i> iRNK	0,36	<b>0,005</b>	0,41	<b>0,001</b>
	<i>TNF-α</i> iRNK	0,48	$10^{-5}$	0,22	0,09
<i>LEPR</i> iRNK	<i>PGC1A</i> iRNK	0,09	0,47	0,24	0,06
	<i>SOD2</i> iRNK	0,73	$10^{-7}$	0,47	$10^{-4}$
	<i>TNF-α</i> iRNK	0,81	$10^{-7}$	0,11	0,40
<i>PGC1A</i> iRNK	<i>SOD2</i> iRNK	0,14	0,29	0,36	<b>0,005</b>
	<i>TNF-α</i> iRNK	0,10	0,44	0,20	0,11
<i>SOD2</i> iRNK	<i>TNF-α</i> iRNK	0,70	$10^{-7}$	0,47	$10^{-4}$

U korelacionoj analizi korišćene su vrednosti  $2^{-dCt}$  relativnih nivoa transkripcije gena (iRNK); n – broj kontrola/pacijenata; RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze; r – Pearson-ov koeficijent korelacije; značajna razlika pri  $P < 0,05$ . Tabela objavljena na engleskom jeziku u dodatnom materijalu Kolić i sar., 2020.

#### 4.7. Asocijacija varijanti rs7799039, rs1137101 i rs8192678 sa relativnim nivoima transkripcije (iRNK) *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* u PML i sa nivoima pLEP

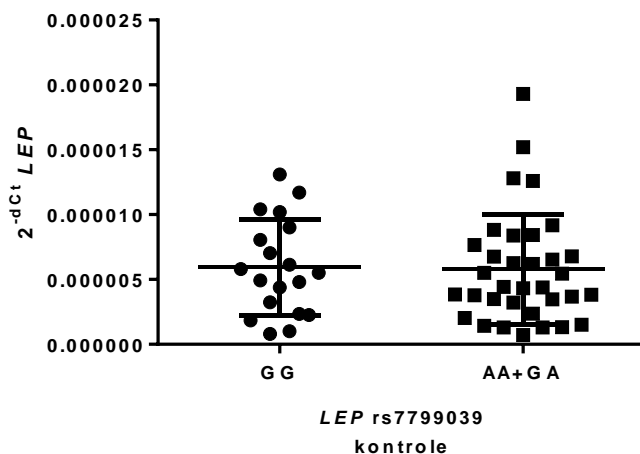
Ispitivanjem asocijacije varijanti u genima *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* sa njihovim relativnim nivoima transkripcije u PML (Kolić i sar., 2021), ustanovljen je značajno viši nivo *LEP* iRNK kod pacijenata sa RR MS nosilaca *LEP* rs7799039 ređeg alela, A, nego kod pacijenata sa genotipom GG (FC = 1,88; Mann-Whitney U test,  $P = 0,006$ ,  $P_{adj} = 0,04$ ) (**Grafik R9 A**). Pored toga, pacijenti sa *LEPR* rs1137101 genotipom GG imaju tendenciju ka sniženju nivoa *LEPR* iRNK, u poređenju sa nosiocima češćeg alela, A (FC = 0,58; Mann-Whitney U test,  $P = 0,03$ ,  $P_{adj} = 0,09$ ) (**Grafik R10 A**). Nema značajnog uticaja varijante *PGC1A* rs8192678 na nivo *PGC1A* iRNK kod pacijenata, po odgovarajućem genetičkom modelu (**Grafik R11 A**), dok kontrolni subjekti sa rs8192678 genotipom AA pokazuju tendenciju ka sniženju nivoa *PGC1A* iRNK, u odnosu na nosioce češćeg alela, G (FC = 0,36; Mann-Whitney U test,  $P = 0,02$ ,  $P_{adj} = 0,12$ ) (**Grafik R11 B**). Varijante rs7799039 i rs1137101 nisu asociirane sa relativnim nivoima *LEP* i *LEPR* iRNK u grupi kontrola, po odgovarajućem genetičkom modelu (**Grafik R9 B**, **Grafik R10 B**).

Nema značajne asocijacije genotipova *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 sa nivoima pLEP, ni u grupi pacijenata sa RR MS (Kruskal-Wallis ANOVA,  $P_{LEP} = 0,85$ ,  $P_{LEPR} = 0,05$  i  $P_{PGC1A} = 0,90$ ) ni u grupi kontrola (Kruskal-Wallis ANOVA,  $P_{LEP} = 0,41$ ,  $P_{LEPR} = 0,36$  i  $P_{PGC1A} = 0,77$ ) (Kolić i sar., 2021).



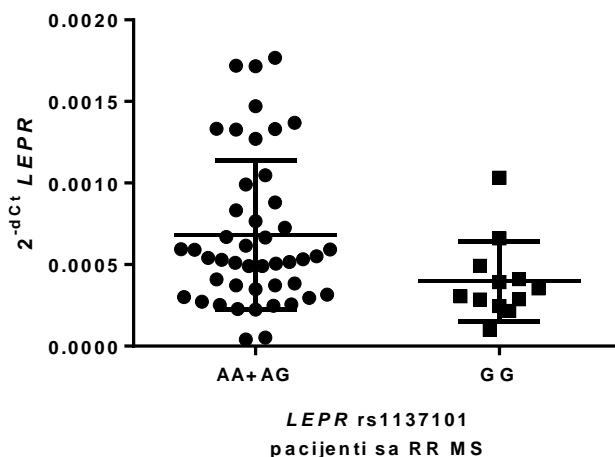


B)

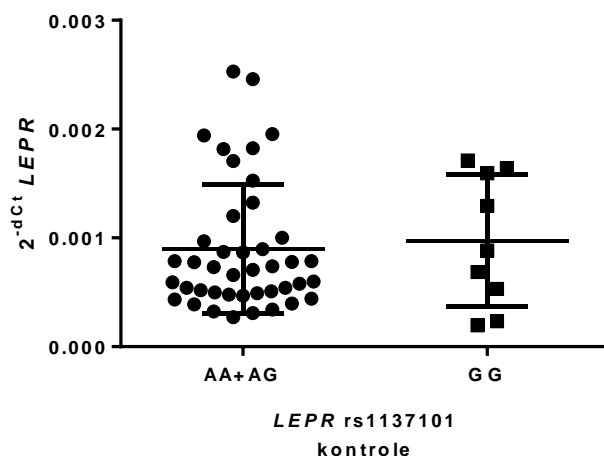


**Grafik R9. Asocijacija varijante *LEP* rs7799039, po dominantnom genetičkom modelu, sa relativnim nivoima *LEP* iRNK u PML: A) u grupi pacijenata sa RR MS: AA+GA (n = 40) naspram GG (n = 16) (FC = 1,88; P = 0,006, P<sub>adj</sub> = 0,04); grafik objavljen na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2021; B) u grupi kontrola: AA+GA (n = 34) naspram GG (n = 20) (FC = 0,76; P = 0,48). Rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim vrednostima relativnih nivoa iRNK (srednja vrednost  $2^{-dCt}$ ) ± SD; FC – stepen promene (engl. *fold change*). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze. \* Statistička značajnost pri P<sub>adj</sub> < 0,05.**

A)

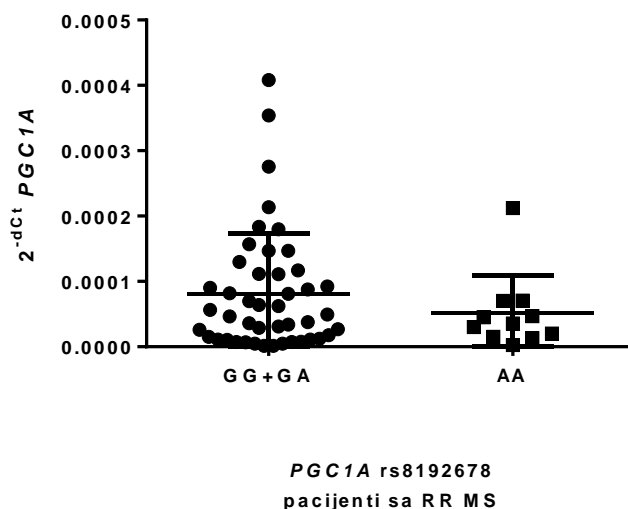


B)

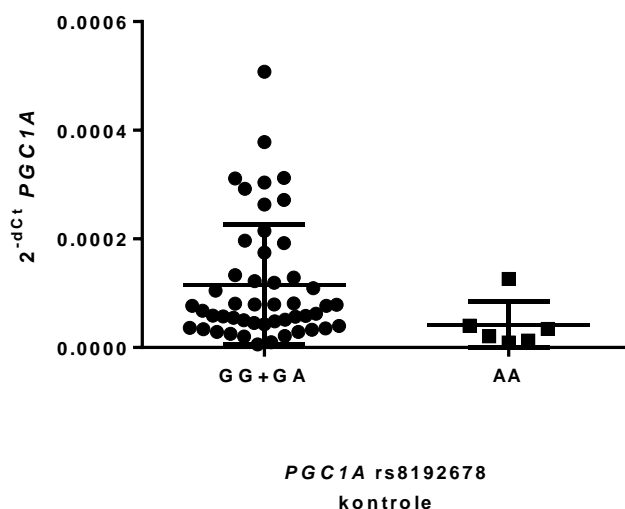


**Grafik R10. Asocijacija varijante *LEPR* rs1137101, po recesivnom genetičkom modelu, sa relativnim nivoima *LEPR* iRNK u PML: A) u grupi pacijenata sa RR MS: GG (n = 12) naspram AA+AG (n = 46) (FC = 0,58; P = 0,03, P<sub>adj</sub> = 0,09); grafik objavljen na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2021; B) u grupi kontrola: GG (n = 10) naspram AA+AG (n = 42) (FC = 1,30; P = 0,44). Rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim vrednostima relativnih nivoa iRNK (srednja vrednost  $2^{-dCt}$ )  $\pm$  SD; FC – stepen promene (engl. *fold change*). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze. Statistička značajnost pri P<sub>adj</sub> < 0,05.**

A)



B)



**Grafik R11. Asocijacija varijante *PGC1A* rs8192678, po recesivnom genetičkom modelu, sa relativnim nivoima *PGC1A* iRNK u PML: A) u grupi pacijenata sa RR MS: AA (n = 11) naspram GG+GA (n = 45) (FC = 0,72; P = 0,49); B) u grupi kontrola: AA (n = 6) naspram GG+GA (n = 49) (FC = 0,36; P = 0,02, P<sub>adj</sub> = 0,12); grafik objavljen na engleskom jeziku u Kolić i sar., 2021. Rezultati su predstavljeni kao tačkasti grafik sa srednjim vrednostima relativnih nivoa iRNK (srednja vrednost 2<sup>-dCt</sup>) ± SD; FC – stepen promene (engl. *fold change*). RR MS – relapsno-remitentni tok multiple skleroze. Statistička značajnost pri P<sub>adj</sub> < 0,05.**

## 5. DISKUSIJA

Većina humanih bolesti je poligenske prirode, uključujući MS, kao autoimunska, inflamatornu neurodegenerativnu bolest. Važno je napomenuti da trenutno ne postoji terapija kojom se može izlečiti ova bolest, već je lečenje samo simptomatsko i dugotrajno ili doživotno. Njime se može usporiti progresija bolesti tj. ublažiti simptomi, ali se ne zaustavlja neurodegeneracija, koja konačno dovodi do gubitka motornih funkcija i trajnog invaliditeta, a može biti i letalna ukoliko pogodi moždane centre koji su odgovorni za vitalne funkcije. S obzirom na ovu činjenicu, od izuzetne je važnosti otkrivanje novih genetičkih faktora koji učestvuju u patogenezi MS i koji bi bili potencijalne buduće mete u kreiranju efikasne personalizovane terapije ove bolesti (Zheng i sar., 2018; Tsareva i sar., 2019).

Dosadašnja saznanja ukazuju na to da su mehanizmi koji su u osnovi patogeneze MS heterogeni, da uključuju trijadu specifičnih događaja: inflamaciju – demijelinizaciju – degeneraciju u CNS, i da su koordinisani medijatorima imunskog sistema (Barkhof i Koeller, 2020). LEP ima dualnu ulogu, sistemski delujući kao hormon i kao citokin, adipocitokin. Pokazano je da poremećaji u produkciji LEP značajno doprinose remećenju funkcionisanja imunskog sistema (Farooqi i sar., 2002), povećavajući rizik za nastanak određenih bolesti, uključujući autoimunske (la Cava A., 2012; La Cava A., 2017; Matarese i sar., 2002). Literaturni podaci ukazuju da je LEP uključen u patogenezu MS (Frisullo i sar., 2007; Emamgholipour i sar., 2013). Ono što je intrigantno, a u isto vreme i ohrabrujuće, jeste rezultat *in vivo* studije tretmana anti-LEP antitelima ili solubilnim LEPR-Fc fuzionisanim proteinom kod miševa sa EAE, u kojoj je utvrđeno da ovakvim tretmanom dolazi do odlaganja pojave EAE, kao i smanjene smrtnosti i težine bolesti (Matarese i sar., 2005; Matarese i sar., 2010). Patologija MS povezana je i sa povišenim nivoom ROS, tj. oksidativnim stresom (Ortiz i sar., 2016). Održanje ravnoteže između proizvodnje i uklanjanja ROS je bitno za sprečavanje oštećenja CNS i od naročite je važnosti u patologiji MS (Padureanu i sar., 2019; Zhang i sar., 2020), predstavljajući jedan od mehanizama kojim bi se neurološki deficit mogao držati pod kontrolom. Analizom efekata LEP *in vitro*, pokazan je njegov uticaj na porast nivoa oksidativnog stresa, uz pojačanu inflamaciju, u endotelnim ćelijama (Teixeira i sar., 2017). Takođe, LEP utiče na produkciju enzima antioksidativne zaštite u neuronima (Guo i sar., 2008), kao i proinflamatornih citokina u PML (Sánchez-Margalet i sar., 2003). Na ovaj način, delujući na mehanizme inflamatornog odgovora i odgovora na oksidativni stres, LEP predstavlja moguću veoma značajnu komponentu u patogenezi MS, intrigantnu za buduća istraživanja. Stoga, u ovoj studiji asocijacije gena kandidata koja je obuhvatila pacijente sa MS (RR i SP toka bolesti) i zdrave ispitanike, po prvi put je urađena analiza varijanti u genima komponenata leptinskog signalnog puta, *LEP* (rs7799039), *LEPR* (rs1137101) i *PGC1A* (rs8192678), uporedo sa analizom nivoa transkripcije (iRNK) navedenih gena (*LEP*, *LEPR* i *PGC1A*) i gena koji kodiraju ključni enzim antioksidativne zaštite, SOD2, i inflamatorni medijator, TNF- $\alpha$ , za koje je sugerisano da su povezani sa LEP signalnim putem.

## 5.1. Asocijacija genskih varijanti *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 sa nastankom i kliničkim tokom MS

Dosadašnje studije tipa GWAS su definisale brojne SNV kao potencijalne faktore rizika za nastanak MS. Ono što se zapaža jeste da gotovo svi do sada identifikovani regioni genoma asocirani sa MS sadrže gene koji učestvuju u regulaciji imunskog sistema, što je u skladu sa definicijom MS kao autoimunske bolesti (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2013; 2018). Istraživanja, takođe, ukazuju da određene genske varijante mogu biti asocirane sa različitim formama ili fazama bolesti (Pan i sar., 2016; Jia i sar., 2018), što sve ističe značaj genetičkih asocijacionih studija u izučavanju patologije MS.

S obzirom na to da bi aktivacija *LEP*-*LEPR* ose mogla biti jedan od mehanizama koji učestvuju u patogenezi autoimunskih bolesti (La Cava 2017), analizirali smo asocijaciju varijanti *LEP* rs7799039 i *LEPR* rs1137101 sa nastankom i kliničkim tokom MS kod ciljne grupe ispitanika iz populacije Srbije. Do danas je objavljen mali broj studija koje su analizirale asocijaciju varijanti rs7799039 i rs1137101 sa MS, uz nekonzistentnost dobijenih rezultata (Dashti i sar., 2019; Farrokhi i sar., 2016; Rey i sar., 2011). U više studija pokazano je da su ove varijante asocirane sa nastankom masovnih hroničnih bolesti, kao što su različiti tipovi karcinoma (Marcello i sar., 2015; Zhang i sar., 2018; He i sar., 2013) i koronarna bolest (Xiao i sar., 2019). U našoj studiji nije utvrđena asocijacija varijanti rs7799039 i rs1137101 sa nastankom niti sa kliničkim tokom MS (RR MS i SP MS). Za ove dve varijante, na osnovu prethodno utvrđenih asocijacija sa rizikom za nastanak MS (Dashti i sar., 2019; Farrokhi i sar., 2016), imali smo statističku snagu studije u rasponu od 82-99% za ispitivanje definisane asocijacije. Naš rezultat je u skladu sa rezultatima studije izvedene u nemačkoj populaciji (Rey i sar., 2011), koja je uključila najveći broj pacijenata sa MS među do sada izvedenim i ovde razmotrenim studijama. Razlike u veličini uzorka, toku bolesti, kao i genetička varijabilnost između ispitivanih populacija, mogu da doprinesu heterogenosti rezultata pomenutih asocijacionih studija (Dashti i sar., 2019; Farrokhi i sar., 2016; Rey i sar., 2011), uključujući i našu. Nekonzistentnost rezultata takođe može biti posledica interakcije genetičkih i faktora sredine, kao što je ishrana, budući da *LEP* ima ključnu ulogu u regulaciji unosa hrane i energetske homeostaze (Ge i sar., 2020).

Prema pregledu dosadašnje literature, analiza asocijacije *PGC1A* rs8192678 sa nastankom i kliničkim tokom MS, koja je urađena u našoj studiji, je pionirska u oblasti asocijacionih studija gena kandidata. Pokazali smo da je varijanta rs8192678 asocirana sa nastankom MS, uz konstataciju da naš rezultat zahteva dalju proveru. Nismo ustanovili asocijaciju *PGC1A* rs8192678 sa kliničkim tokom bolesti. U pogledu genetike neurodegenerativnih bolesti, ova genska varijanta je ispitana u grupi pacijenata sa Parkinsonovom bolešću i nije povezana sa rizikom za nastanak ove bolesti (Clark i sar., 2011). U istoj studiji homozigot češćeg alela, GG, varijante rs8192678 je asociran sa dugovečnošću kontrolnih ispitanika (Clark i sar., 2011), što bi se moglo povezati sa predloženom potencijalnom protektivnom ulogom ovog genotipa u ćelijskim oksidativnim oštećenjima izazvanim procesima kao što je lipidna peroksidacija (Weng i sar. 2010). Potencijalni protektivni efekat češćeg alela, G, varijante rs8192678 u stresnim uslovima opisan je i u studiji izvedenoj u populaciji Italije (Pasquinelli i sar., 2016). U toj studiji je utvrđeno da je ređi *PGC1A* alel, A, asociran sa povišenim vrednostima markera oksidativnog stresa u plazmi pacijenata sa amiotrofičnom lateralnom sklerozom, tokom i

neposredno nakon fizičke aktivnosti. Stoga, moguće je da varijanta rs8192678 utiče na domen PGC1A za interakciju sa transkripcionim regulatorima gena antioksidativne zaštite, pošto je porast vrednosti markera oksidativnog stresa detektovan pri fizičkoj aktivnosti, a to i jeste jedno od stanja koje indukuje aktivaciju proteina PGC1A u ćeliji, koja inače treba da bude praćena snižavanjem nivoa ROS (Pasquinelli i sar., 2016). U našoj studiji rs8192678 alel A je asociran sa povećanim rizikom za MS, što se može dovesti u vezu sa pretpostavljenim prooksidantnim efektom ovog alela (Weng i sar., 2010; Pasquinelli i sar., 2016), podržavajući ulogu oksidativnog stresa u patogenezi MS.

## 5.2. Asocijacija genskih varijanti sa vrednostima kliničkog parametra progresije MS

Od tri ispitane genske varijante, ustanovili smo asocijaciju *LEPR* rs1137101 sa kliničkim parametrom progresije bolesti, MSSS. Genotipovi sa ređim alelom, G, varijante rs1137101 asocirani su sa značajno višim vrednostima MSSS, u poređenju sa češćim homozigotom, AA, u grupi muškaraca sa MS. Dobijeni rezultat ukazuje na moguće postojanje genotip-zavisnog polnog dimorfizma u LEP signalnom putu u patogenezi MS, što je potrebno istražiti u budućim funkcionalnim studijama. Pokazano je da LEP potencira indukciju EAE kod mužjaka miševa, a težinu bolesti kod ženki, čime je podržano postojanje polnih razlika u mehanizmu delovanja LEP u MS (Matarese i sar., 2001). Mali broj studija, gena kandidata, ispitao je asocijaciju *LEP* rs7799039 i *LEPR* rs1137101 sa vrednostima kliničkih parametara EDSS (Dashti i sar., 2019; Yousefian i sar., 2018; Farrokhi i sar., 2016) i MSSS (Dashti i sar., 2019), bez značajnih rezultata. Do sada je samo jedna studija, tipa GWAS, pokazala vezu između varijante *PGC1A* rs8192678 i MS, asociranjem ređeg alela, A, sa višim vrednostima MSSS (Briggs i sar., IMSGC, 2011). Najobimnija studija koja je istraživala povezanost genskih varijanti sa težinom bolesti, tj. nivoom MSSS parametra, testirala je 52 varijante identifikovane kroz studije GWAS (George i sar., 2016) i nije uključila u analizu varijante ispitivane u našoj studiji. Budući da naša studija ima veći uzorak nego citirane studije gena kandidata (Dashti i sar., 2019; Yousefian i sar., 2018; Farrokhi i sar., 2016), dobijeni rezultat značajne povezanosti varijante u *LEPR* sa kliničkim parametrom progresije MS bi trebalo uzeti u obzir za dalju analizu u replikacionim studijama.

## 5.3. Relativni nivoi transkripcije (iRNK) gena *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$* u MS

U ovoj studiji kvantifikovana je transkripcija gena *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  u PML kod pacijenata sa RR MS i kontrola. Ustanovljene su značajne razlike u relativnim nivoima *LEP*, *LEPR* i *PGC1A* iRNK, dok se nivoi transkripcije *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  nisu značajno razlikovali, između dve grupe ispitanika. U studiji analize transkripcionog profila iRNK u MS lezijama na mikročip matrici, pokazan je značajan porast *LEP* iRNK, i to 6,5 puta viši nivo, u akutnim (aktivnim) u odnosu na hronične (tihe) MS lezije (Lock i sar., 2002). Rezultat Lock i sar. i detektovani porast nivoa *LEP* iRNK u PML kod pacijenata u našoj studiji podržavaju proinflamatorno delovanje LEP u patogenezi MS. Pritom, povećana transkripcija *LEP* mogla bi se dovesti u vezu sa dejstvom tipičnih proinflamatornih citokina. Ovu pretpostavku podržava rezultat Matarese i sar. koji su utvrdili da je značajno povišen nivo interferona-gama korelisao sa povišenim LEP, u likvoru pacijenata

sa RR MS (Matarese i sar., 2005). Za razliku od značajnog porasta *LEP* iRNK, utvrdili smo značajno opadanje nivoa *LEPR* iRNK u PML pacijenata sa RR MS, u poređenju sa kontrolama. U studiji u kojoj je kvantifikovan *LEPR* u MS, pokazan je značajan porast *LEPR* u PML kod pacijenata koji su bili u fazi relapsa, u odnosu na kontrole, pri čemu su pacijenti imali i značajno povišen serumski *LEP* (Frisullo i sar. 2007). S obzirom da u našoj studiji nije bilo značajne razlike u koncentraciji p*LEP* između pacijenata i kontrola, zabeleženi značajno sniženi nivo *LEPR* iRNK kod pacijenata može se pripisati, ne delovanju *LEP*, već drugih faktora, poput proinflamatornih citokina. Naime, primena smeše proinflamatornih citokina za koje je poznato da učestvuju u patogenezi MS, u kojoj je interferon-gama bio preovladavajući Th1 citokin, snizila je ekspresiju *LEPR*, kako na nivou iRNK tako i na nivou proteina, u kulturi glijalnih ćelija CNS (Rose i sar., 2009). Sniženje nivoa *LEPR* moglo bi da dovede do ublažavanja pretpostavljenih proinflamatornih efekata *LEP*, što bi moglo uticati protektivno na klinički tok i progresiju MS, sa čime je u skladu i rezultat korelacione analize u kojoj smo identifikovali značajnu pozitivnu korelaciju nivoa *LEPR* iRNK i MSSS parametra. Predloženo tumačenje našeg rezultata analize transkripcije *LEP* i *LEPR* ukazuje na potrebu za budućim istraživanjima o međuzavisnosti ekspresije i delovanja *LEP* i drugih citokina, u prvoj meri proinflamatornih, u patogenezi MS.

U ovoj studiji utvrđen je značajno snižen nivo *PGC1A* iRNK u PML pacijenata sa RR MS, u poređenju sa kontrolama. Naš rezultat je u skladu sa prethodno detektovanim značajnim sniženjem *PGC1A*, na nivou iRNK i proteina, u kortikalnim neuronima pacijenata sa MS, detektovanim pri poređenju sa kontrolnim ćelijama (Witte i sar., 2013). Mogućnost praćenja statusa medijatora antioksidativne zaštite u ciljnom tkivu na osnovu analize periferne krvi podržava i studija u kojoj je uspostavljena pozitivna korelacija između izmerenih nivoa *PGC1A* iRNK u uzorcima PML i uzorcima biopsije ciljnog tkiva miokarda (Fabregat-Andres i sar., 2016). U našoj studiji pokazana je značajna pozitivna korelacija između nivoa *PGC1A* i *SOD2* iRNK u PML isključivo u grupi pacijenata. Sa ovim u vezi, *in vitro* studija izvedena na ćelijskoj liniji humanog neuroblastoma sa "utišanim" *PGC1A* predstavila je rezultate o značajnom sniženju nivoa *SOD2* iRNK u ovim ćelijama, koje je bilo praćeno povećanjem unutarćelijske proizvodnje ROS, kao i povećanom osetljivošću neurona na ROS (Witte i sar., 2013). S obzirom na to da ROS koje proizvode inflamatorne ćelije doprinose neurodegeneraciji (Ohl i sar., 2016), postoji mogućnost da značajno sniženi nivo transkripcije *PGC1A* kod pacijenata u našoj studiji bude povezan sa povećanom produkcijom ROS u mononuklearnim leukocitima, što bi doprinosilo patogenezi MS putem predloženog mehanizma ROS-stimulisane neurodegeneracije. U korelacionoj analizi smo utvrdili i to da, osim sa *PGC1A* iRNK kod pacijenata, *SOD2* iRNK značajno pozitivno koreliše sa nivoima *LEP*, *LEPR* i *TNF- $\alpha$*  iRNK i kod pacijenata i kod zdravih ispitanika, što sugerije da *SOD2* verovatno nije specifični efektor *LEP* signalnog puta u PML u patogenezi MS.

Značajno viši nivo *TNF- $\alpha$*  iRNK, kao jednog od glavnih Th1 citokina, detektovan je u PML pacijenata sa MS, u odnosu na zdrave osobe, u studiji Furlan i sar., 2005. U našoj studiji nije pokazana značajna promena u nivou *TNF- $\alpha$*  iRNK između pacijenata sa RR MS i kontrola. S obzirom na to da je pokazano da *LEP* indukuje ekspresiju *TNF- $\alpha$*  u PML (Zarkesh-Esfahani i sar., 2001), odsustvo značajne razlike nivoa *TNF- $\alpha$*  iRNK između pacijenata i kontrola mogli bismo delom objasniti odsustvom razlike u koncentraciji p*LEP* između grupa. Odsustvo očekivanog porasta *TNF- $\alpha$*  iRNK kod pacijenata, takođe, se može objasniti i činjenicom da je većina pacijenata u remisiji i leči se interferonom-beta, pošto je

prethodno pokazano da interferon-beta smanjuje sintezu TNF- $\alpha$  u PML izolovanim iz krvi pacijenata sa MS (Sternberg i sar., 2008). Pošto nije bilo mogućnosti da se u studiju uključe pacijenti u obe faze RR MS (relapsu i remisiji) koji ne primaju terapiju, naše rezultate razmatramo i u okviru ovog studijskog ograničenja.

#### 5.4. Efekti genskih varijanti *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 na nivoe ciljnih iRNK u PML

Mnogobrojne SNV su povezane sa promenama u transkripciji gena (Hindorff i sar., 2009; Kreimer i Pe'er, 2013). Sveobuhvatna analiza obimnih rezultata asocijacionih studija tipa gena kandidata i GWAS daje uvid u regulatorne varijante kao bitne genetičke faktore humane fenotipske varijabilnosti (Johnson i sar., 2009; Nicolae i sar., 2010). Ustanovljeno je da su promene u ekspresiji *LEP* i *LEPR* asocirane sa MS (Frisullo i sar., 2007; La Cava A., 2017), ali do danas ne postoji ni jedna studija koja je ispitala asocijaciju varijanti rs7799039 i rs1137101 sa nivoima transkripcije gena *LEP* i *LEPR* u MS. Zbog toga, rezultati ovog segmenta našeg istraživanja su bitni u pogledu identifikovanja potencijalne regulatorne uloge ciljnih varijanti. U ispitivanoj grupi pacijenata, sa RR tokom bolesti, ustanovili smo značajan porast nivoa *LEP* iRNK u PML kod nosilaca ređeg alela, A, varijante *LEP* rs7799039 (-2548 G/A), u odnosu na ispitanike sa češćim homozigotnim genotipom, GG. Studija koja je izučavala efekat varijante rs7799039 na ekspresiju *LEP* u adipoznom tkivu zdravih, negojaznih žena je pokazala da nosioci ređeg homozigotnog genotipa imaju značajno više nivoe *LEP* iRNK u ovom tkivu u odnosu na nosioce češćeg alela, čime autori naglašavaju potencijalni uticaj varijante na nivo transkripcije *LEP* (Hoffsted i sar., 2002). Na osnovu dobijenog rezultata, sugerišemo da ređi alel *LEP* može doprinositi i ukupnom detektovanom porastu nivoa *LEP* iRNK u PML pacijenata sa RR MS, u poređenju sa zdravim kontrolama, čime ukazujemo i na moguće efekte rs7799039 na patogenezu MS. Varijante *LEP* rs7799039 i *LEPR* rs1137101 nisu asocirane sa značajnim promenama transkripcije pri poređenju genotipova u kontrolnoj grupi. Ustanovili smo da kod pacijenata sa ređim homozigotnim genotipom, GG, varijante *LEPR* rs1137101 (Gln223Arg) postoji trend opadanja nivoa *LEPR* iRNK, u odnosu na nosioce češćeg alela, A, i takođe sugerišemo da genotip GG može da doprinosi ukupnom detektovanom sniženju nivoa *LEPR* iRNK u PML pacijenata. Varijanta rs1137101 može da utiče na funkciju *LEPR*, što se, posredno, može odraziti i na nivo ekspresije *LEPR*. Naime, rezultati molekularne analize *LEPR* pokazuju da supstitucija aminokiseline glutamina argininom na poziciji 223 utiče na strukturnu fleksibilnost receptora, usled čega dolazi do remećenja konformacionih promena u *LEPR* nakon vezivanja sa *LEP*, čime se narušava signalna transdukcija i dolazi do rezistencije na *LEP* (Daghestani i sar., 2019).

Za razliku od ustanovljenih efekata varijanti u *LEP* i *LEPR* na transkripciju samo u grupi pacijenata, za varijantu *PGC1A* rs8192678 (Gly482Ser) smo utvrdili da je asocirana sa promenom transkripcije isključivo u kontrolnoj grupi, u kojoj su nosioci češćeg alela varijante rs8192678, G, imali trend porasta nivoa *PGC1A* iRNK, u odnosu na osobe sa ređim homozigotnim genotipom, AA. Značajno viši nivo *PGC1A* iRNK koji smo detektovali kod kontrola, u poređenju sa pacijentima, ukazuje na potencijalni protektivni efekat povišenog nivoa transkripcije *PGC1A* kod zdravih osoba, podržavajući time i



predloženu protektivnu ulogu češćeg alela, G, varijante u *PGC1A*, koja se tiče zaštite od oksidativnog stresa (Weng i sar., 2010; Pasquinelli i sar., 2016).

S obzirom na poziciju ispitivanih varijanti u genima *LEPR* i *PGC1A*, očekuje se da one ne mogu direktno uticati na nivo transkripcije. Mi smo pokazali trend tj. nominalnu asocijaciju (kada se ne uzima u obzir korekcija na višestruko testiranje) strukturnih varijanti *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 sa promenama nivoa *LEPR* i *PGC1A* iRNK, i naglašavamo ovu nominalnu asocijaciju, budući da je za obe varijante predloženo da mogu imati funkcionalne efekte (Daghestani i sar. 2019; Chen i sar., 2013). Postoji ograničen broj studija na humanim uzorcima koje su analizirale vezu između ovih varijanti i ekspresije gena. U studiji Johnson i sar., opisano je da i regulatorne i strukturne SNV mogu uticati na obradu iRNK (splajsing, maturacija, stabilnost, transport) i degradaciju iRNK (Johnson i sar., 2009). Mehanizam regulacije nivoa iRNK pod uticajem ispitivanih varijanti mogao bi biti degradacija, pošto SNV može da uvede motive prepoznavanja za RNK-vezujuće proteine koji regulišu degradaciju iRNK. U skladu sa ovom pretpostavkom, na osnovu podataka iz javno dostupne baze rSNPBase (<http://rsnp.psich.ac.cn>; Guo i sar., 2014), predloženo je da varijante rs1137101 i rs8192678 učestvuju u posttranskripcionoj regulaciji *LEPR* i *PGC1A*, posredovanoj proteinom ELAVL1 (engl. *ELAV Like RNA Binding Protein 1*). Za ELAVL1 je pokazano da utiče na regulaciju molekularne mreže povezane sa neurodegeneracijom, kroz njegovu interakciju sa *PGC1A* iRNK u primarnim neuronima (Skloris i sar., 2015). Drugo potencijalno objašnjenje asocijacije varijanti rs1137101 i rs8192678 sa promenama u nivoima *LEPR* i *PGC1A* iRNK leži u njihovoj povezanosti sa genskim varijantama koje imaju regulatornu ulogu. Shodno tome, na osnovu javno dostupnih baza podataka HapMap i 1000 Genomes (<http://rsnp.psich.ac.cn>), postoji 30 SNV koje su u jakoj neravnoteži vezanosti ( $r^2 \geq 0,8$ ) sa *LEPR* rs1137101 i 6 SNV u jakoj neravnoteži vezanosti sa *PGC1A* rs8192678. Sve ove varijante su potencijalno regulatorne i nalaze se u intronima *LEPR* i *PGC1A* (<http://rsnp.psich.ac.cn>), ali za njih još uvek nema eksperimentalnih dokaza o eQTL (engl. *Expression Quantitative Trait Locus*). Neophodna su buduća eksperimentalna istraživanja u cilju razjašnjavanja funkcionalnih efekata varijanti rs1137101 i rs8192678.

## 5.5. Cirkulišući LEP u MS

Studije koje su analizirale metaboličku komponentu u MS sugerišu da bi LEP mogao biti jedan od markera važnih za praćenje toka i dijagnozu MS (Kraszula i sar., 2012; Mähler i sar., 2012; Guerrero-García i sar., 2016). Utvrđeno je da su nivoi LEP povišeni u likvoru i serumu kod pacijenata sa RR MS, koji nisu primali terapiju, kao i to da su nivoi LEP u negativnoj korelaciji sa brojem regulatornih T limfocita (Matarese i sar., 2005; De Rosa i sar., 2007). Meta-analiza koja je ispitivala asocijaciju cirkulišućeg LEP sa MS je uključila 9 studija iz perioda od 2009–2016. godine, obuhvativši različite geografske regione i populacije (Xie i sar., 2018). Utvrđeno je da je nivo LEP u serumu značajno povišen kod pacijenata sa MS, u poređenju sa kontrolama, indikujući da bi on mogao biti faktor vezan za nastanak MS (Xie i sar., 2018). U našoj studiji nije utvrđena značajna razlika u koncentraciji pLEP između ispitanih grupa pacijenata sa RR MS i kontrola, koje se nisu razlikovale prema odnosu broja žena i muškaraca, starosti i BMI. U studijama koje iznose podatke o značajno povišenom LEP u cirkulaciji kod pacijenata sa MS, u poređenju

sa kontrolama, pacijenti nisu bili pod imunosupresivnom ili imunomodulatornom terapijom (Frisullo i sar., 2007; Emamgholipour i sar. 2013), za razliku od pacijenata u našoj studiji među kojima je većina, odnosno svi u fazi remisije, lečena interferonom-beta. Nadalje, pokazano je da je LEP u serumu značajno snižen kod pacijenata u remisiji lečenih interferonom-beta (Bacocchi i sar., 2003). Naš rezultat je u skladu sa studijom Chatzantoni i sar., u kojoj je većina pacijenata koja je bila u remisiji primala terapiju interferon-beta i, kao u našoj studiji, nisu bile zabeležene značajne razlike u nivoima pLEP između grupe RR MS pacijenta i kontrola (Chatzantoni i sar., 2004). Treba imati u vidu da različiti faktori utiču na koncentraciju cirkulišućeg LEP, uključujući pol, starost i BMI, kako u fiziološkim uslovima tako i u patogenezi bolesti kao što je MS (Lausten-Thomsen i sar., 2016; Rotondi i sar., 2013), te da svi ovi faktori mogu doprinositi nekonzistentnosti rezultata dosadašnjih studija asocijacije LEP sa MS. Poznato je da su i koncentracija cirkulišućeg LEP i učestalost MS veće kod žena nego kod muškaraca (Havel i sar., 1996; Harbo i sar., 2013). Zabeleženi su značajno povišeni nivoi LEP u cirkulaciji kod žena obolelih od RR MS kao i kod žena kontrola, u poređenju sa muškarcima pacijentima/kontrolama (Evangelopoulos i sar., 2014). U našoj analizi nije uočena značajna razlika u grupi kontrola u odnosu na pol, ali je među pacijentima utvrđen značajno viši nivo pLEP kod žena nego kod muškaraca, bez razlike u BMI. Ovaj rezultat u skladu je sa studijom Rotondi i sar. (Rotondi i sar., 2013). Takođe, utvrdili smo značajnu pozitivnu korelaciju između pLEP i BMI kod obe grupe ispitanika, kontrola i pacijenata, kao i kod žena i muškaraca kontrola, što je u skladu sa prethodno navedenim studijama (Bacocchi i sar., 2003; Frisullo i sar., 2007). Međutim, kada smo pacijente grupisali po polu, pLEP i BMI su značajno korelisali samo kod žena. Razlike između polova u koncentraciji pLEP i korelaciji pLEP–BMI, uočene kod pacijenata sa RR MS, ukazuju na potencijalni polno-zavisni uticaj LEP na patogenezu RR MS, što je potrebno istraživati u daljim studijama.

Što se tiče povezanosti cirkulišućeg LEP sa kliničkim parametrima MS, do sada je ista ispitana između vrednosti LEP i EDSS, i nije ustanovljena njihova značajna korelacija ni u jednoj studiji (Evangelopoulos i sar., 2014; Rotondi i sar., 2013; Keyhanian i sar., 2019). U našoj studiji ispitano je parametar MSSS i utvrđeno je da pLEP ne koreliše značajno sa ovim kliničkim parametrom.

Ovo je prva studija u kojoj su analizirane korelacije između nivoa cirkulišućeg LEP i nivoa transkripcije gena *LEP*, *LEPR*, *PGC1A*, *SOD2* i *TNF- $\alpha$*  kod pacijenata sa MS. Pokazali smo da postoji značajna pozitivna korelacija pLEP sa *TNF- $\alpha$*  iRNK u PML u grupi pacijenata, ne i kontrola, što sugeriše da produkcija i efekti *TNF- $\alpha$*  u patogenezi MS mogu biti povezani sa LEP signalnim putem, podržavajući predloženu proinflamatornu ulogu LEP u ovoj bolesti.

Utvrdili smo da varijante *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 nisu asociirane sa nivoima pLEP, ni u grupi pacijenata ni u grupi kontrola. Rezultati dosadašnjih studija koje su ispitale asocijaciju varijanti rs7799039 i rs1137101 sa koncentracijom cirkulišućeg LEP u MS su malobrojni i nekonzistentni (Dashti i sar., 2019; Farrokhi i sar., 2016) usled razlika u karakteristikama studijskih kohorti i njihovim genetičkim i sredinskim činiocima, ukazujući na potrebu za daljim ispitivanjem efekata ciljnih varijanti na koncentraciju i delovanje cirkulišućeg LEP u patogenezi MS.

## 5.6. Ograničenja i potencijalna klinička primena rezultata studije

Ovo je prva studija koja je ispitala varijante i nivoe transkripcije gena koji kodiraju komponente LEP signalnog puta i sa njima povezane komponente antioksidativne zaštite i inflamacije, u asocijaciji sa nastankom i kliničkim tokom MS. Kao takva, studija predstavlja osnovu za dalja istraživanja potrebna kako bi se razjasnila uloga LEP signalnog puta u MS. Glavno ograničenje naše studije jeste veličina uzorka, prvenstveno u poređenjima koja su vršena unutar podgrupa celog uzorka definisanih u odnosu na tok/fazu bolesti ili pol. Pored veličine uzorka, ograničenje je i to što nije bilo mogućnosti da se u studiju uključe pacijenti ujednačeni po kriterijumu terapije. Iako smo uvođenjem korekcije na višestruko testiranje smanjili verovatnoću za nastanak statističke greške tipa I, ukazujemo da bi dobijene rezultate trebalo validirati u okviru većih, nezavisnih, grupa uzoraka, uz definisanje i pridržavanje jedinstvenog kriterijuma za terapiju kod pacijenata, čime bi se pružili jasni dokazi o doslednosti prezentovanih rezultata.

Jedan od glavnih izazova u izučavanju genetičke osnove MS jeste organizacija i analiza velike količine dostupnih genetičkih podataka, u cilju definisanja uzroka i procesa koji leže u osnovi patogeneze bolesti (Didonna A. i Oksenberg J., 2017), kao i kreiranja panela SNV kroz integraciju rezultata GWAS i asocijacionih i funkcionalnih studija gena kandidata, bazirajući se na analizi interakcija preko 200 do danas identifikovanih varijanti asociiranih sa MS (Patsopoulos i sar., 2019; Baranzini S., 2018). Uzimajući u obzir heterogenost MS i suštinsku složenost ljudskog genoma, doprinos rezultata naše studije jeste i u istraživanju mogućnosti da se okarakterisani potencijalni genetički faktori rizika u budućim istraživanjima uključe u razvoj personalizovane terapije MS kroz kreiranje kliničkog predikcionog algoritma.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Nije utvrđena asocijacija ni jedne od ispitivanih pojedinačnih genskih varijanti, *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678, sa nastankom MS niti sa kliničkim tokom bolesti (RR i SP), kod ciljne grupe ispitanika iz populacije Srbije. Istovremenom analizom sve tri varijante, po dominantnom modelu nasleđivanja, utvrđena je asocijacija varijante *PGC1A* rs8192678 sa povišenim rizikom za nastanak MS.
2. Postoji polno-zavisna povezanost varijante *LEPR* rs1137101 sa vrednostima kliničkog pokazatelja progresije bolesti (MSSS): asocijacija sa povišenim MSSS je utvrđena kod pacijenata muškog pola po dominantnom modelu nasleđivanja.
3. Značajni porast relativnog nivoa *LEP* iRNK i značajno opadanje nivoa *LEPR* i *PGC1A* iRNK u PML mogu biti povezani sa RR formom MS. Nije utvrđena povezanost nivoa iRNK ispitanih gena sa različitim fazama bolesti, relapsom i remisijom. U grupi pacijenata sa RR MS postoji asocijacija *LEP* rs7799039, po dominantnom genetičkom modelu, sa povećanjem nivoa *LEP* iRNK u PML.
4. Značajna pozitivna korelacija pLEP sa *TNF-α* iRNK u PML kod pacijenata sugerise na povezanost između produkcije TNF- $\alpha$  i LEP signalnog puta, podržavajući predloženu proinflamatornu ulogu LEP u patogenezi MS. Utvrđena je i pozitivna korelacija između nivoa *PGC1A* i *SOD2* iRNK u PML u grupi pacijenata.
5. Na povezanost sa težinom RR forme MS sugerise značajna pozitivna korelacija uspostavljena između nivoa *LEPR* iRNK u PML i vrednosti kliničkog parametra MSSS.
6. Nije utvrđena asocijacija pLEP sa RR MS, kao ni sa različitim fazama bolesti. Varijante *LEP* rs7799039, *LEPR* rs1137101 i *PGC1A* rs8192678 nisu asociirane sa nivoima pLEP, ni u grupi pacijenata sa RR MS ni u grupi kontrola.

## 7. LITERATURA

- Aggarwal, B. B., Eessalu, T. E., Hass, P. E. (1985). Characterization of receptors for human tumour necrosis factor and their regulation by gamma-interferon. *Nature*, 318(6047), 665–667. <https://doi.org/10.1038/318665a0>
- Aggarwal, B. B., Gupta, S. C., Kim, J. H. (2012). Historical perspectives on tumor necrosis factor and its superfamily: 25 years later, a golden journey. *Blood*, 119(3), 651–665. <https://doi.org/10.1182/blood-2011-04-325225>
- Aggarwal, B. B., Moffat, B., Harkins, R. N. (1984). Human Lymphotoxin. Human lymphotoxin. Production by a lymphoblastoid cell line, purification, and initial characterization. *J. Biol. Chem.*, 259(1), 686–691. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)43716-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)43716-1)
- Ahima, R. S., Flier, J. S. (2000). Leptin. *Annu. Rev. Physiol.*, 62, 413–37. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.62.1.413>
- Almishri, W., Santodomingo-Garzon, T., Le, T., Stack, D., Mody, C. H., Swain, M. G. (2016). TNF $\alpha$  Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN $\gamma$  Production through TNFR2. *Journal of innate immunity*, 8(6), 617–629. <https://doi.org/10.1159/000448077>
- Alti, D., Sambamurthy, C., Kalangi, S. K. (2018). Emergence of leptin in infection and immunity: Scope and challenges in vaccines formulation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00147>
- Anderson, P. (2000). Post-transcriptional regulation of tumour necrosis factor alpha production. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 59 Suppl 1(Suppl 1), i3–i5. [https://doi.org/10.1136/ard.59.suppl\\_1.i3](https://doi.org/10.1136/ard.59.suppl_1.i3)
- Aulova, K. S., Urusov, A. E., Toporkova, L. B., Sedykh, S. E., Shevchenko, Y. A., Tereshchenko, V. P., Sennikov, S. V., Budde, T., Meuth, S. G., Popova, N. A., Orlovskaya, I. A., Nevinsky, G. A. (2020). Production of abzymes in th, cba, and c57bl/6 mice before and after mog treatment: Comparing changes in cell differentiation and proliferation. *Biomolecules*, 10(1), 1–25. <https://doi.org/10.3390/biom10010053>
- Bacart, J., Leloire, A., Levoye, A., Froguel, P., Jockers, R., Couturier, C. (2010). Evidence for leptin receptor isoforms heteromerization at the cell surface. *FEBS Letters*, 584(11), 2213–2217. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.03.033>
- Bailleul, B., Akerblom, I., Strosberg, A. D. (1997). The leptin receptor promoter controls expression of a second distinct protein. *Nucleic Acids Research*, 25(14), 2752–2758. <https://doi.org/10.1093/nar/25.14.2752>
- Baranova, S. V., Mikheeva, E. V., Buneva, V. N., Nevinsky, G. A. (2019). Antibodies from the sera of multiple sclerosis patients efficiently hydrolyze five histones. *Biomolecules*, 9(11). <https://doi.org/10.3390/biom9110741>
- Baranzini, S. E. (2018). The Era of GWAS Is over - Commentary. *Nature* 24(3):260–61. doi: 10.1177/1352458517747408.
- Barkhof, F., Koeller, K. K. (2020). Demyelinating Diseases of the CNS Brain and Spine, In: Hodler J, Kubik-Huch RA, von Schulthess GK, editors. Diseases of the Brain, Head and Neck, Spine 2020–2023: Diagnostic Imaging [Internet]. Cham (CH): Springer; 2020. Chapter 13; p.165–76. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-38490-6\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-030-38490-6_13).

- Bartella, V., Cascio, S., Fiorio, E., Auriemma, A., Russo, A., Surmacz, E. (2008). Insulin-dependent leptin expression in breast cancer cells. *Cancer Research*, 68(12), 4919-4927. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0642>
- Batocchi, A. P., Rotondi, M., Caggiula, M., Frisullo, G., Odoardi, F., Nociti, V., Carella, C., Tonali, P. A., Mirabella, M. (2003). Leptin as a marker of multiple sclerosis activity in patients treated with interferon-beta. *Journal of Neuroimmunology*, 139(1-2), 150-154. [https://doi.org/10.1016/S0165-5728\(03\)00154-1](https://doi.org/10.1016/S0165-5728(03)00154-1)
- Belbasis, L., Bellou, V., Evangelou, E., Ioannidis, J. P. A., Tzoulaki, I. (2015). Environmental risk factors and multiple sclerosis: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses. *The Lancet Neurology*, 14(3), 263-273. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(14\)70267-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(14)70267-4)
- Bertolotto, A., Malucchi, S., Capobianco, M., Manzardo, E., Guastamacchia, G., Milano, E., Audano, L., Mutani, R. (1999). Quantitative PCR reveals increased levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  mRNA in peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis patients during relapses. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 19(6), 575-581. <https://doi.org/10.1089/107999099313703>
- Biener, E., Charlier, M., Ramanujan, V. K., Daniel, N., Eisenberg, A., Bjørbaek, C., Herman, B., Gertler, A., Djiane, J. (2005). Quantitative FRET imaging of leptin receptor oligomerization kinetics in single cells. *Biology of the Cell*, 97(12), 905-919. <https://doi.org/10.1042/bc20040511>
- Brambilla, R., Ashbaugh, J. J., Magliozzi, R., Dellarole, A., Karmally, S., Szymkowski, D. E., Bethea, J. R. (2011). Inhibition of soluble tumour necrosis factor encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain*. 134(9), 2736-2754. <https://doi.org/10.1093/brain/awr199>
- Briffa, J. F., McAinch, A. J., Romano, T., Wlodek, M. E., Hryciw, D. H. (2015). Leptin in pregnancy and development: A contributor to adulthood disease? *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*, 308(5), E335-E350. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00312.2014>
- Briggs, F. B. S., Shao, X., Goldstein, B. A., Oksenberg, J. R., Barcellos, L. F., De Jager, P. L., Consortium, I. M. S. G. (2011). Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes Immunity*, 12(8), 615-625. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.34>
- Charcot, J. M. (1868). Histologie de la sclerose en plaques. [s.n.].
- Chatzantoni, K., Papatthanassopoulos, P., Gourzoulidou, E., Mouzaki, A. (2004). Leptin and its soluble receptor in plasma of patients suffering from remitting-relapsing multiple sclerosis (MS): In vitro effects of leptin on type-1 and type-2 cytokine secretion by peripheral blood mononuclear cells, T-cells and monocytes of MS patient. *Journal of Autoimmunity*, 23(2), 169-177. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2004.05.007>
- Chen, Y., Mu, P., He, S., Tang, X., Guo, X., Li, H., Xu, H., Woo, S. L., Qian, X., Zeng, L., Wu, C. (2013). Gly482Ser mutation impairs the effects of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  on decreasing fat deposition and stimulating phosphoenolpyruvate carboxykinase expression in hepatocytes. *Nutrition Research*, 33(4), 332-339. PMID: 23602251
- Cherry, A. D., Suliman, H. B., Bartz, R. R., Piantadosi, C. A. (2014). Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  co-activator 1- $\alpha$  as a critical co-activator of the murine hepatic oxidative stress response and mitochondrial biogenesis in

- Staphylococcus aureus sepsis. *Journal of Biological Chemistry*, 289(1), 41-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.512483>
- Choi, Y. S., Hong, J. M., Lim, S., Ko, K. S., Pak, Y. K. (2006). Impaired coactivator activity of the Gly482 variant of peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ ) on mitochondrial transcription factor A (Tfam) promoter. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 344(3), 708-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.03.193>
- Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry*, 162(1), 156-159. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90021-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90021-2)
- Chua, S. C., Koutras, I. K., Han, L., Liu, S. M., Kay, J., Young, S. J., Chung, W. K., Leibel, R. L. (1997). Fine structure of the murine leptin receptor gene: Splice site suppression is required to form two alternatively spliced transcripts. *Genomics*, 45(2), 264-270. <https://doi.org/10.1006/geno.1997.4962>
- Clark, J., Sonika, R., Zheng, K., Betensky, R. A., Simon, D. K. (2011). Association of PGC-1 $\alpha$  Polymorphisms with Age of Onset and Risk of Parkinson's Disease. *BMC Medical Genetics* 12(1):69. <https://doi.org/10.1186/1471-2350-12-69>
- Considine, R. V. (2001). Regulation of Leptin Production. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 2(4), 357-363. <https://doi.org/10.1023/A:1011896331159>
- Copin, J. C., Gasche, Y., Chan, P. H. (2000). Overexpression of copper/zinc superoxide dismutase does not prevent neonatal lethality in mutant mice that lack manganese superoxide dismutase. *Free Radical Biology and Medicine*, 28(10), 1571-1576. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(00\)00280-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00280-X)
- Cotsapas, C., Mitrovic, M., Hafler, D. (2018) Multiple sclerosis. *Handb Clin Neurol*. 148:723-730. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00046-6>.
- Crescenti, A., Solà, R., Valls, R. M., Anguera, A., Arola, L. (2013). Polymorphisms in LEP and NPY genes modify the response to soluble fibre *Plantago ovata* husk intake on cardiovascular risk biomarkers. *Genes and Nutrition*, 8(1), 127-136. <https://doi.org/10.1007/s12263-012-0303-9>
- Cui, L. Y., Chu, S. F., Chen, N. H. (2020). The role of chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *International immunopharmacology*, 83, 106314. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.106314>
- Daghestani, M., Purohit, R., Daghestani, M., Daghestani, M., Warsy, A. (2019). Molecular dynamic ( MD ) studies on leptin receptor gene and associated variations in the anthropometric and metabolic profiles of Saudi women. *PLoS ONE*, 14(2):e0211381. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0211381>.
- Dam, J., Jockers, R. (2013). Hunting for the functions of short leptin receptor isoforms. *Molecular Metabolism*, 2(4), 327-328. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.09.001>
- Dashti, M., Alroughani, R., Jacob, S., Al-Temaimi, R. (2019). Leptin rs7799039 polymorphism is associated with multiple sclerosis risk in Kuwait. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 36, 101409. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101409>
- De Rosa, V., Procaccini, C., Calì, G., Pirozzi, G., Fontana, S., Zappacosta, S., La Cava, A., Matarese, G. (2007). A Key Role of Leptin in the Control of Regulatory T Cell Proliferation. *Immunity* 26(2):241-55. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2007.01.011>.

- Didonna, A., Oksenberg, J. R. (2017). The Genetics of Multiple Sclerosis. In I. S. Zagon (Eds.) et. al., *Multiple Sclerosis: Perspectives in Treatment and Pathogenesis. Codon Publications*. <https://doi.org/10.15586/codon.multiplesclerosis.2017.ch1>
- Dobson, R., Giovannoni, G. (2019). Multiple sclerosis - a review. *European Journal of Neurology*, 26(1), 27-40. <https://doi.org/10.1111/ene.13819>
- Emamgholipour, S., Mahdieh Eshaghi, S., Hossein-nezhad, A., Mirzaei, K., Maghbooli, Z., Ali Sahraian, M. (2013). Adipocytokine Profile, Cytokine Levels and Foxp3 Expression in Multiple Sclerosis: A Possible Link to Susceptibility and Clinical Course of Disease. *PLoS ONE* 8(10):6-8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076555>.
- Esterbauer, H., Oberkofler, H., Krempler, F., Patsch, W. (1999). Human peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 (PPARGC1) gene: cDNA sequence, genomic organization, chromosomal localization, and tissue expression. *Genomics*, 62(1), 98-102. <https://doi.org/10.1006/geno.1999.5977>
- Evangelopoulos, M. E., Koutsis, G., Markianos, M. (2014). Serum Leptin Levels in Treatment-Naive Patients with Clinically Isolated Syndrome or Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. *Autoimmune Diseases*, <https://doi.org/10.1155/2014/486282>.
- Fabregat-Andres, O., Paredes, F., Monsalve, M., Milara, J., Ridocci-Soriano, F., Gonzalez-Hervas, S., Mena, A., Facila, L., Hornero, F., Morell, S., Martinez-Leon, J., Cortijo, J. (2016). mRNA PGC-1 $\alpha$  levels in blood samples reliably correlates with its myocardial expression: study in patients undergoing cardiac surgery. *Anatolian Journal of Cardiology*, 16(8):622-29. <https://doi.org/10.5152/AnatolJCardiol.2015.6466>.
- Falvo, J. V., Tsytsykova, A. V., Goldfeld, A. E. (2010). Transcriptional control of the TNF Gene. *Current Directions in Autoimmunity*, 11, 27-60. <https://doi.org/10.1159/000289196>
- Farooqi, I. S., Matarese, G., Lord, G. M., Keogh, J. M., Lawrence, E., Agwu, C., Sanna, V., Jebb, S. A., Perna, F., Fontana, S., Lechler, R. I., DePaoli, A. M., O'Rahilly, S. (2002). Beneficial effects of leptin on obesity, T cell hyporesponsiveness, and neuroendocrine/metabolic dysfunction of human congenital leptin deficiency. *The Journal of clinical investigation*, 110(8), 1093-1103. <https://doi.org/10.1172/JCI15693>
- Farooqi, I. S., Wangensteen, T., Collins, S., Kimber, W., Matarese, G., Keogh, J. M., Lank, E., Bottomley, B., Lopez-Fernandez, J., Ferraz-Amaro, I., Dattani, M. T., Ercan, O., Myhre, A. G., Retterstol, L., Stanhope, R., Edge, J. A., McKenzie, S., Lessan, N., Ghodsi, M., ... O'Rahilly, S. (2007). Clinical and Molecular Genetic Spectrum of Congenital Deficiency of the Leptin Receptor. *New England Journal of Medicine*, 356(3), 237-247. <https://doi.org/10.1056/nejmoa063988>
- Farrokhi, M., Dabirzadeh, M., Fadaee, E., Beni, A. A., Saadatpour, Z., Rezaei, A., Heidari, Z. (2016). Polymorphism in Leptin and Leptin Receptor Genes May Modify Leptin Levels and Represent Risk Factors for Multiple Sclerosis. *Immunological Investigations*, 45(4), 328-335. <https://doi.org/10.3109/08820139.2016.1157811>
- Fernandez-Marcos, P. J., Auwerx, J. (2011). Regulation of PGC-1 $\alpha$ , a nodal regulator of mitochondrial biogenesis. *American Journal of Clinical Nutrition*, 93(4), 884-890. <https://doi.org/10.3945/ajcn.110.001917>



- Francisco, V., Pino, J., Campos-Cabaleiro, V., Ruiz-Fernández, C., Mera, A., Gonzalez-Gay, M. A., Gómez, R., Gualillo, O. (2018). Obesity, Fat Mass and Immune System: Role for Leptin. *Frontiers in physiology*, 9, 640. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.00640>
- Fridovich, I. (2013). Superoxide Dismutase. In *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition (2nd ed., Issue II)*. Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00129-8>
- Frischer, J. M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C. F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P. S., Lassmann, H. (2009). The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132(5), 1175-1189. <https://doi.org/10.1093/brain/awp070>
- Frisullo, G., Mirabella, M., Angelucci, F., Caggiula, M., Morosetti, R., Sancricca, C., Patanella, A. K., Nociti, V., Iorio, R., Bianco, A., Tomassini, V., Pozzilli, C., Tonali, P. A., Matarese, G., Batocchi, A. P. (2007). The effect of disease activity on leptin, leptin receptor and suppressor of cytokine signalling-3 expression in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, 192(1-2), 174-183. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.08.008>
- Frumento, D. (2020). Blood-Brain Barrier Disruption as a Key Role Problem in Multiple Sclerosis: A Novel Primary Prevention Strategy. *Biomed J Sci & Tech Res*, 24(2), 18038-18041. <https://doi.org/10.26717/BJSTR.2020.24.004012>
- Fuke, T., Yoshizaki, T., Kondo, M., Morino, K., Obata, T., Ugi, S., Nishio, Y., Maeda, S., Kashiwagi, A., Maegawa, H. (2010). Transcription factor AP-2beta inhibits expression and secretion of leptin, an insulin-sensitizing hormone, in 3T3-L1 adipocytes. *International journal of obesity (2005)*, 34(4), 670-678. <https://doi.org/10.1038/ijo.2009.295>
- Furlan, R., Rovaris, M., Martinelli Boneschi, F., Khademi, M., Bergami, A., Gironi, M., Deleidi, M., Agosta, F., Franciotta, D., Scarpini, E., Uccelli, A., Zaffaroni, M., Kurne, A., Comi, G., Olsson, T., Filippi, M., Martino, G. (2005). Immunological patterns identifying disease course and evolution in multiple sclerosis patients. *Journal of neuroimmunology*, 165(1-2), 192-200. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2005.04.012>
- Gamba, P., Testa, G., Gargiulo, S., Staurenghi, E., Poli, G., Leonarduzzi, G. (2015). Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 7, 119. <https://doi.org/10.3389/fnagi.2015.00119>
- García-Carrizo, F., Nozhenko, Y., Palou, A., Rodríguez, A. M. (2016). Leptin Effect on Acetylation and Phosphorylation of Pgc1 $\alpha$  in Muscle Cells Associated With Ampk and Akt Activation in High-Glucose Medium. *Journal of Cellular Physiology*, 231(3), 641-649. <https://doi.org/10.1002/jcp.25109>
- Ge, T. T., Yao, X. X., Zhao, F. L., Zou, X. H., Yang, W., Cui, R. J., Li, B. J. (2020). Role of leptin in the regulation of food intake in fasted mice. *Journal of cellular and molecular medicine*, 24(8), 4524-4532. <https://doi.org/10.1111/jcmm.15110>
- George, M. F., Briggs, F. B., Shao, X., Gianfrancesco, M. A., Kockum, I., Harbo, H. F., Celius, E. G., Bos, S. D., Hedström, A., Shen, L., Bernstein, A., Alfredsson, L., Hillert, J., Olsson, T., Patsopoulos, N. A., De Jager, P. L., Oturai, A. B., Søndergaard, H. B., Sellebjerg, F., Sorensen, P. S., ... Barcellos, L. F. (2016). Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10

- studies. *Neurology. Genetics*, 2(4), e87.  
<https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000087>
- Ghilardi, N., Ziegler, S., Wiestner, A., Stoffel, R., Heim, M. H., Skoda, R. C. (1996). Defective STAT signaling by the leptin receptor in diabetic mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(13), 6231-6235. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.13.6231>
- Gilgun-Sherki, Y., Melamed, E., Offen, D. (2004). The role of oxidative stress in the pathogenesis of multiple sclerosis: The need for effective antioxidant therapy. *Journal of Neurology*, 251(3), 261-268. <https://doi.org/10.1007/s00415-004-0348-9>
- Gorska, E., Popko, K., Stelmazczyk-Emmel, A., Ciepiela, O., Kucharska, A., Wasik, M. (2010). Leptin receptors. *European Journal of Medical Research*, 15 Suppl 2(Suppl 2), 50-54. <https://doi.org/10.1186/2047-783x-15-s2-50>
- Guerrero-García, J. J., Carrera-Quintanar, L., López-Roa, R. I., Márquez-Aguirre, A. L., Rojas-Mayorquín, A. E., Ortuño-Sahagún, D. (2016). Multiple Sclerosis and Obesity: Possible Roles of Adipokines. *Mediators of inflammation*, 2016, 4036232. <https://doi.org/10.1155/2016/4036232>
- Guo, L., Du, Y., Chang, S., Zhang, K., Wang, J. (2014). rSNPBase: a database for curated regulatory SNPs. *Nucleic acids research*, 42(Database issue), D1033-D1039. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1167>
- Guo, X., Jiang, Q., Tuccitto, A., Chan, D., Alqawlaq, S., Won, G.J., Sivak, J.M. (2018). The AMPK-PGC-1 $\alpha$  Signaling Axis Regulates the Astrocyte Glutathione System to Protect against Oxidative and Metabolic Injury. *Neurobiology of Disease*, 113(2017), 59-69. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2018.02.004>
- Guo, Z., Jiang, H., Xu, X., Duan, W., Mattson, M. P. (2008). Leptin-mediated cell survival signaling in hippocampal neurons mediated by JAK STAT3 and mitochondrial stabilization. *Journal of Biological Chemistry*, 283(3), 1754-1763. <https://doi.org/10.1074/jbc.M703753200>
- Handschin, C., Spiegelman, B. M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocrine reviews*, 27(7), 728-735. <https://doi.org/10.1210/er.2006-0037>
- Harbo, H. F., Gold, R., & Tintoré, M. (2013). Sex and gender issues in multiple sclerosis. *Therapeutic advances in neurological disorders*, 6(4), 237-248. <https://doi.org/10.1177/1756285613488434>
- Havel, P. J., Kasim-Karakas, S., Dubuc, G. R., Mueller, W., Phinney, S. D. (1996). Gender differences in plasma leptin concentrations. *Nature medicine*, 2(9), 949-950. <https://doi.org/10.1038/nm0996-949b>
- He, J., Xi, B., Ruiter, R., Shi, T. Y., Zhu, M. L., Wang, M. Y., Li, Q. X., Zhou, X. Y., Qiu, L. X., Wei, Q. Y. (2013). Association of LEP G2548A and LEPR Q223R Polymorphisms with Cancer Susceptibility: Evidence from a Meta-Analysis. *PLoS ONE*, 8(10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075135>
- Hekerman, P., Zeidler, J., Bamberg-Lemper, S., Knobelspies, H., Lavens, D., Tavernier, J., Joost, H. G., Becker, W. (2005). Pleiotropy of leptin receptor signalling is defined by distinct roles of the intracellular tyrosines. *FEBS Journal*, 272(1), 109-119. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.2004.04391.x>
- Hindorff, L. A., Sethupathy, P., Junkins, H. A., Ramos, E. M., Mehta, J. P., Collins, F. S., Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National*

- Academy of Sciences of the United States of America*, 106(23), 9362–9367.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0903103106>
- Hoang, D., Broer, N., Roman, S. A., Yao, X., Abitbol, N., Li, F., Sosa, J. A., Sue, G. R., Dewan, A. T., Wong, M. L., Licinio, J., Simpson, C., Li, A. Y., Pizzoferrato, N., Narayan, D. (2014). Leptin signaling and hyperparathyroidism: Clinical and genetic associations. *Journal of the American College of Surgeons*, 218(6), 1239-1250.e4. <https://doi.org/10.1016/j.jamcollsurg.2013.11.013>
- Hochmeister, S., Grundtner, R., Bauer, J., Engelhardt, B., Lyck, R., Gordon, G., Korosec, T., Kutzelnigg, A., Berger, J. J., Bradl, M., Bittner, R. E., Lassmann, H. (2006). Dysferlin is a new marker for leaky brain blood vessels in multiple sclerosis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 65(9), 855-865. <https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000235119.52311.16>
- Hoffsted, J., Eriksson, P., Mottagui-Tabar, S., Arner, P. (2002). A polymorphism in the leptin promoter region (-2548 G/A) influences gene expression and adipose tissue secretion of leptin. *Hormone and Metabolic Research*, 34(7), 355-359. <https://doi.org/10.1055/s-2002-33466>
- Hofman, F. M., Hinton, D. R., Johnson, K., Merrill, J. E. (1989). Tumor necrosis factor identified in multiple sclerosis brain. *The Journal of Experimental Medicine*, 170(2), 607-612. <https://doi.org/10.1084/jem.170.2.607>
- Hohlfeld, R., Dornmair, K., Meinl, E., Wekerle, H. (2016). The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: Autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. *The Lancet Neurology*, 15(2), 198-209. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00334-8](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00334-8)
- <http://rsnp.psych.ac.cn>
- <http://www.myassays.com/fiveparameter-logistic-curve.assay>
- [https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4333458\\_GeneEx\\_sgltube\\_UG.pdf](https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/4333458_GeneEx_sgltube_UG.pdf)
- <https://guides.mclibrary.duke.edu/sysreview/types>
- <https://moma.dk/files/Normfinder%20documentation-v20.pdf>
- <https://mspacient.wordpress.com/tag/ms/page/3/>
- <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>
- <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/dlp00.pdf?v=20210319>
- [https://www.bioinformatics.org/sms/prot\\_mw.html](https://www.bioinformatics.org/sms/prot_mw.html)
- <https://www.genecards.org/cgi-bin/carddisp.pl?gene=LEPR>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6648>
- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_000636.4](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_000636.4)
- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP\\_000627.2](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/NP_000627.2)
- [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1137101#frequency\\_tab](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/rs1137101#frequency_tab)
- [https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109819-PPARGC1A#gene\\_information](https://www.proteinatlas.org/ENSG00000109819-PPARGC1A#gene_information)
- <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000116678-LEPR>
- [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0009593\\_TaqManSNP\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0009593_TaqManSNP_UG.pdf)
- [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012000\\_DNase\\_I\\_RNasefree\\_1UuL\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012000_DNase_I_RNasefree_1UuL_UG.pdf)

- [https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012955\\_RevertAid\\_RT\\_UG.pdf](https://www.thermofisher.com/document-connect/document-connect.html?url=https%3A%2F%2Fassets.thermofisher.com%2FTFS-Assets%2FLSG%2Fmanuals%2FMAN0012955_RevertAid_RT_UG.pdf)
- <https://www.uniprot.org/uniprot/Q9UBK2>
- Huang, L., Wang, Z., Li, C. (2001). Modulation of circulating leptin levels by its soluble receptor. *The Journal of biological chemistry*, 276(9), 6343–6349. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009795200>
- Hummel, K. P., Dickie, M. M., Coleman, D. L. (1966). Diabetes, a new mutation in the mouse. *Science*, 153(3740), 1127-1128. <https://doi.org/10.1126/science.153.3740.1127>
- Ibitoye, R., Kemp, K., Rice, C., Hares, K., Scolding, N., Wilkins, A. (2016). Oxidative stress-related biomarkers in multiple sclerosis: A review. *Biomarkers in Medicine*, 10(8), 889-902. <https://doi.org/10.2217/bmm-2016-0097>
- Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B., Silvennoinen, O. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends in Biochemical Sciences*, 19(5), 222-227. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(94\)90026-4](https://doi.org/10.1016/0968-0004(94)90026-4)
- Illangasekera, Y. A., Kumarasiri, P. V. R., Fernando, D. J., Dalton, C. F. (2020). Association of the leptin receptor Q223R (rs1137101) polymorphism with obesity measures in Sri Lankans. *BMC Research Notes*, 13(1), 5-8. <https://doi.org/10.1186/s13104-020-4898-4>
- Ingalls, A. M., Dickie, M. M., Snell, G. D. (1950). Obese, a new mutation in the house mouse. *Journal of Heredity*, 41(12), 315-317. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jhered.a106072>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2013). "Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis." *Nature Genetics*, 45:1353-60. <https://doi.org/10.1038/ng.2770>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. (2018). "Low-frequency and rare-coding variation contributes to multiple sclerosis risk." *Cell*, 175:1679-87.e7. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.049>
- Jia, X., Madireddy, L., Caillier, S., Santaniello, A., Esposito, F., Comi, G., Stuve, O., Zhou, Y., Taylor, B., Kilpatrick, T., Martinelli-Boneschi, F., Cree, B., Oksenberg, J. R., Hauser, S. L., Baranzini, S. E. (2018). Genome sequencing uncovers phenocopies in primary progressive multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 84(1), 51–63. <https://doi.org/10.1002/ana.25263>
- Johnson, A. D., Zhang, Y., Papp, A. C., Pinsonneault, J. K., Lim, J. E., Saffen, D., Dai, Z., Wang, D., Sadée, W. (2008). Polymorphisms affecting gene transcription and mRNA processing in pharmacogenetic candidate genes: detection through allelic expression imbalance in human target tissues. *Pharmacogenetics and genomics*, 18(9), 781–791. <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283050107>
- Kassmann, C. M., Lappe-Siefke, C., Baes, M., Brügger, B., Mildner, A., Werner, H. B., Natt, O., Michaelis, T., Prinz, M., Frahm, J., Nave, K. A. (2007). Axonal loss and neuroinflammation caused by peroxisome-deficient oligodendrocytes. *Nature Genetics*, 39(8), 969-976. <https://doi.org/10.1038/ng2070>
- Keyhanian, K., Saxena, S., Gombolay, G., Healy, B. C., Misra, M., Chitnis, T. (2019). Adipokines are associated with pediatric multiple sclerosis risk and course. *Multiple sclerosis and related disorders*, 36, 101384. <https://doi.org/10.1016/j.msard.2019.101384>

- Kolić, I., Stojković, L., Dinčić, E., Jovanović, I., Stanković, A., Živković, M. (2020). Expression of LEP, LEPR and PGC1A genes is altered in peripheral blood mononuclear cells of patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 338, 577090. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2019.577090>
- Kolić, I., Stojković, L., Stankovic, A., Stefanović, M., Dinčić, E., Zivkovic, M. (2021). Association study of rs7799039, rs1137101 and rs8192678 gene variants with disease susceptibility/severity and corresponding LEP, LEPR and PGC1A gene expression in multiple sclerosis. *Gene*, 774, 145422. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2021.145422>
- Kraszula, L., Jasińska, A., Eusebio, M., Kuna, P., Głabiński, A., Pietruczuk, M. (2012). Evaluation of the relationship between leptin, resistin, adiponectin and natural regulatory T cells in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurologia i neurochirurgia polska*, 46(1), 22–28. <https://doi.org/10.5114/ninp.2012.27211>
- Kreimer, A., Pe'er, I. (2013). Variants in exons and in transcription factors affect gene expression in trans. *Genome biology*, 14(7), R71. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-7-r71>
- Kroner, A., Schwab, N., Ip, C. W., Leder, C., Nave, K. A., Mäurer, M., Wiendl, H., Martini, R. (2009). PD-1 regulates neural damage in oligodendroglia-induced inflammation. *PLoS ONE*, 4(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004405>
- Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W., Lassmann, H. (2017). An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathologica*, 133(1), 13-24. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y>
- Kunkel, L. M., Smith, K. D., Boyer, S. H., Borgaonkar, D. S., Wachtel, S. S., Miller, O. J., Breg, W. R., Jones, H. W., Rary, J. M. (1977). Analysis of human Y chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(3), 1245-1249. <https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.1245>
- Kuroda, M., Tominaga, A., Nakagawa, K., Nishiguchi, M., Sebe, M., Miyatake, Y., Kitamura, T., Tsutsumi, R., Harada, N., Nakaya, Y., Sakaue, H. (2016). DNA methylation suppresses leptin gene in 3T3-L1 adipocytes. *PLoS ONE*, 11(8), 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160532>
- Kurtzke, J. F. (1983). Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: An expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), 1444-1452. <https://doi.org/10.1212/wnl.33.11.1444>
- Kyong, S. P., Hyoung, D. S., Byung, L. P., Hyun, S. C., Young, M. C., Hong, K. L., Lee, J. Y., Lee, J. K., Oh, B., Kimm, K. (2006). Polymorphisms in the leptin receptor (LEPR) - Putative association with obesity and T2DM. *Journal of Human Genetics*, 51(2), 85-91. <https://doi.org/10.1007/s10038-005-0327-8>
- La Cava, A. (2017). Leptin in inflammation and autoimmunity. *Cytokine*, 98, 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2016.10.011>
- La Cava, A., Matarese, G. (2004). The weight of leptin in immunity. *Nature Reviews Immunology*, 4(5), 371-379. <https://doi.org/10.1038/nri1350>
- La Cava A. (2012). Proinflammatory activities of leptin in non-autoimmune conditions. *Inflammation & allergy drug targets*, 11(4), 298–302. <https://doi.org/10.2174/187152812800959031>
- Lausten-Thomsen, U., Christiansen, M., Louise Hedley, P., Esmann Fonvig, C., Stjernholm, T., Pedersen, O., Hansen, T., Holm, J. C. (2016). Reference values for serum leptin in healthy non-obese children and adolescents. *Scandinavian journal*

- of clinical and laboratory investigation, 76(7), 561-567.  
<https://doi.org/10.1080/00365513.2016.1210226>
- Lebovitz, R. M., Zhang, H., Vogel, H., Cartwright, J., Dionne, L., Lu, N., Huang, S., Matzuk, M. M. (1996). Neurodegeneration, myocardial injury, and perinatal death in mitochondrial superoxide dismutase-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(18), 9782-9787.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.93.18.9782>
- Lee, G. H., Proenca, R., Montez, J. M., Carroll, K. M., Darvishzadeh, J. G., Lee, J. I., Friedman, J. M. (1996). Abnormal splicing of the leptin receptor in diabetic mice. *Nature*, 379(6566), 632-635. <https://doi.org/10.1038/379632a0>
- Leray, E., Moreau, T., Fromont, A., Edan, G. (2016). Epidemiology of multiple sclerosis. *Revue Neurologique*, 172(1), 3-13.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurol.2015.10.006>
- Leray, E., Vukusic, S., Debouverie, M., Clanet, M., Brochet, B., de Sèze, J., Zéphir, H., Defer, G., Lebrun-Frenay, C., Moreau, T., Clavelou, P., Pelletier, J., Berger, E., Cabre, P., Camdessanché, J. P., Kalson-Ray, S., Confavreux, C., Edan, G. (2015). Excess Mortality in Patients with Multiple Sclerosis Starts at 20 Years from Clinical Onset: Data from a Large-Scale French Observational Study. *PloS ONE*, 10(7), e0132033. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0132033>
- Li, M. D. (2011). Leptin and beyond: An odyssey to the central control of body weight. *The Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(1), 1-7.
- Li, Z., Ceccarini, G., Eisenstein, M., Tan, K., Friedman, J. M. (2013). Phenotypic effects of an induced mutation of the ObRa isoform of the leptin receptor. *Molecular Metabolism*, 2(4), 364-375. <https://doi.org/10.1016/j.molmet.2013.07.007>
- Liang, H., Ward, W. F. (2006). PGC-1alpha: a key regulator of energy metabolism. *Advances in physiology education*, 30(4), 145-151.  
<https://doi.org/10.1152/advan.00052.2006>
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S. J., Oksenberg, J. R., Raine, C. S., Heller, R., Steinman, L. (2002). Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature medicine*, 8(5), 500-508.  
<https://doi.org/10.1038/nm0502-500>
- Lublin, F. D., Reingold, S. C. (1996). Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, 46(4), 907-911. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.4.907>
- Lublin, F. D., Reingold, S. C., Cohen, J. A., Cutter, G. R., Thompson, A. J., Wolinsky, J. S., Banwell, B., Barkhof, F., Bebo, B., Calabresi, P. A., Clanet, M., Fox, R. J., Freedman, M. S., Goodman, A. D., Lincoln, J. A., Lubetzki, C., Miller, A. E., Montalban, X., Connor, P. W. O., Sormani, M. P. (2014). Defining the clinical course of multiple sclerosis. *Neurology*, 83, :278-286.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4117366/pdf/NEUROLOGY2013555623.pdf>
- Mahad, D., Ziabreva, I., Lassmann, H., Turnbull, D. (2008). Mitochondrial defects in acute multiple sclerosis lesions. *Brain*, 131(7), 1722-1735.  
<https://doi.org/10.1093/brain/awn105>

- Mähler, A., Steiniger, J., Bock, M., Brandt, A. U., Haas, V., Boschmann, M., Paul, F. (2012). Is metabolic flexibility altered in multiple sclerosis patients?. *PloS ONE*, 7(8), e43675. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0043675>
- Mammès, O., Betoulle, D., Aubert, R., Herbeth, B., Siest, G., Fumeron, F. (2000). Association of the G-2548A polymorphism in the 5' region of the LEP gene with overweight. *Annals of Human Genetics*, 64(5), 391-394. <https://doi.org/10.1017/S000348000008277>
- Mammès, O., Betoulle, D., Aubert, R., Giraud, V., Tuzet, S., Petiet, A., Colas-Linhart, N., Fumeron, F. (1998). Novel polymorphisms in the 5' region of the LEP gene: association with leptin levels and response to low-calorie diet in human obesity. *Diabetes*, 47(3), 487-489. <https://doi.org/10.2337/diabetes.47.3.487>
- Marcello, M. A., Calixto, A. R., de Almeida, J. F., Martins, M. B., Cunha, L. L., Cavalari, C. A., Etchebehere, E. C., da Assumpção, L. V., Geloneze, B., Carvalho, A. L., Ward, L. S. (2015). Polymorphism in LEP and LEPR May Modify Leptin Levels and Represent Risk Factors for Thyroid Cancer. *International journal of endocrinology*, 2015, 173218. <https://doi.org/10.1155/2015/173218>
- Mason, M. M., He, Y., Chen, H., Quon, M. J., Reitman, M. (1998). Regulation of leptin promoter function by Sp1, C/EBP, and a novel factor. *Endocrinology*, 139(3), 1013-1022. <https://doi.org/10.1210/endo.139.3.5792>
- Matarese, G., Carrieri, P. B., La Cava, A., Perna, F., Sanna, V., De Rosa, V., Aufiero, D., Fontana, S., Zappacosta, S. (2005). Leptin increase in multiple sclerosis associates with reduced number of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(14), 5150-5155. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408995102>
- Matarese, G., Carrieri, P. B., Montella, S., De Rosa, V., La Cava, A. (2010). Leptin as a metabolic link to multiple sclerosis. *Nature Reviews Neurology*, 6(8), 455-461. <https://doi.org/10.1038/nrneuro.2010.89>
- Matarese, G., Procaccini, C., De Rosa, V. (2008). The intricate interface between immune and metabolic regulation: a role for leptin in the pathogenesis of multiple sclerosis? *Journal of Leukocyte Biology*, 84(4), 893-899. <https://doi.org/10.1189/jlb.0108022>
- Matarese, G., Sanna, V., Di Giacomo, A., Lord, G. M., Howard, J. K., Bloom, S. R., Lechler, R. I., Fontana, S., Zappacosta, S. (2001) Leptin potentiates experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL female mice and confers susceptibility to males. *Eur J Immunol.* 31(5):1324-32. [https://doi.org/10.1002/1521-4141\(200105\)31:5<1324::AID-IMMU1324>3.0.CO;2-Y](https://doi.org/10.1002/1521-4141(200105)31:5<1324::AID-IMMU1324>3.0.CO;2-Y).
- Matarese, G., La Cava, A., Sanna, V., Lord, G. M., Lechler, R. I., Fontana, S., Zappacosta, S. (2002). Balancing susceptibility to infection and autoimmunity: a role for leptin?. *Trends in immunology*, 23(4), 182-187. [https://doi.org/10.1016/s1471-4906\(02\)02188-9](https://doi.org/10.1016/s1471-4906(02)02188-9)
- Matthews, P. M. (2019). Chronic inflammation in multiple sclerosis - seeing what was always there. *Nature Reviews Neurology*, 15(10), 582-593. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0240-y>
- McCord, J. M., Fridovich, I. (1969). Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *The Journal of biological chemistry*, 244(22), 6049-6055. PMID: 5389100
- Moharana, K., Zabeau, L., Peelman, F., Ringler, P., Stahlberg, H., Tavernier, J., Savvides, S. N. (2014). Structural and mechanistic paradigm of Leptin receptor

- activation revealed by complexes with wild-type and antagonist leptins. *Structure*, 22(6), 866-877. <https://doi.org/10.1016/j.str.2014.04.012>
- Moss, M. L., Jin, S. L., Milla, M. E., Bickett, D. M., Burkhart, W., Carter, H. L., Chen, W. J., Clay, W. C., Didsbury, J. R., Hassler, D., Hoffman, C. R., Kost, T. A., Lambert, M. H., Leesnitzer, M. A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahel, G., Rocque, W., ... Becherer, J. D. (1997). Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*, 385(6618), 733-736. <https://doi.org/10.1038/385733a0>
- Neniskyte, U., Vilalta, A., Brown, G. C. (2014). Tumour necrosis factor alpha-induced neuronal loss is mediated by microglial phagocytosis. *FEBS Letters*, 588(17), 2952-2956. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.05.046>
- Nevinsky, G. A. (2016). Autoimmune Processes in Multiple Sclerosis: Production of Harmful Catalytic Antibodies Associated with Significant Changes in the Hematopoietic Stem Cell Differentiation and Proliferation. *Trending Topics in Multiple Sclerosis*. <https://doi.org/10.5772/63824>
- Nicolae, D. L., Gamazon, E., Zhang, W., Duan, S., Dolan, M. E., Cox, N. J. (2010). Trait-associated SNPs are more likely to be eQTLs: annotation to enhance discovery from GWAS. *PLoS genetics*, 6(4), e1000888. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000888>
- Nijland, P. G., Witte, M. E., Van Het Hof, B., Van der Pol, S., Bauer, J., Lassmann, H., Van der Valk, P., de Vries, H. E., Van Horssen, J. (2014). Astroglial PGC-1alpha increases mitochondrial antioxidant capacity and suppresses inflammation: Implications for multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica Communications*, 2(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s40478-014-0170-2>
- Ohl, K., Tenbrock, K., Kipp, M. (2016). Oxidative stress in multiple sclerosis: Central and peripheral mode of action. *Experimental Neurology*, 277, 58-67. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2015.11.010>
- Okpechi, I. G., Rayner, B. L., Van Der Merwe, L., Mayosi, B. M., Adeyemo, A., Tiffin, N., Ramesar, R. (2010). Genetic variation at selected SNPs in the leptin gene and association of alleles with markers of kidney disease in a Xhosa population of South Africa. *PLoS ONE*, 5(2), 1-7. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009086>
- Ortiz, G. G., Pacheco-Moisés, F. P., Bitzer-Quintero, O. K., Ramírez-Anguiano, A. C., Flores-Alvarado, L. J., Ramírez-Ramírez, V., Macias-Islas, M. A., Torres-Sánchez, E. D. (2013). Immunology and oxidative stress in multiple sclerosis: Clinical and basic approach. *Clinical and Developmental Immunology*, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/708659>
- Ortiz, G. G., Pacheco-Moisés, F. P., Torres-Sánchez, E. D., Sorto-Gómez, T. E., Mireles-Ramírez, M., León-Gil, A., González-Usigli, H., Flores-Alvarado, L. J., González-Renovato, E. D., Sánchez-López, A. L., Cid-Hernández, M., Velázquez-Brizuela, I. E. (2016). Multiple Sclerosis and Its Relationship with Oxidative Stress, Glutathione Redox System, ATPase System, and Membrane Fluidity. *Trending Topics in Multiple Sclerosis*. doi: 10.5772/64737.
- Padureanu, R., Albu, C. V., Mititelu, R. R., Bacanoiu, M. V., Docea, A. O., Calina, D., Padureanu, V., Olaru, G., Sandu, R. E., Malin, R. D., Buga, A.-M. (2019). Oxidative Stress and Inflammation Interdependence in Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Medicine*, 8(11), 1815. <https://doi.org/10.3390/jcm8111815>
- Pan, G., Simpson, S., Jr, Van der Mei, I., Charlesworth, J. C., Lucas, R., Ponsonby, A. L., Zhou, Y., Wu, F., Taylor, B. V. (2016). Role of genetic susceptibility variants in



- predicting clinical course in multiple sclerosis: a cohort study. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 87(11), 1204-1211. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2016-313722>
- Pasquinelli, A., Chico, L., Pasquali, L., Bisordi, C., Lo Gerfo, A., Fabbrini, M., Petrozzi, L., Marconi, L., Caldarazzo Ienco, E., Mancuso, M., Siciliano, G. (2016). Gly482Ser PGC-1 $\alpha$  Gene Polymorphism and Exercise-Related Oxidative Stress in Amyotrophic Lateral Sclerosis Patients. *Frontiers in cellular neuroscience*, 10, 102. <https://doi.org/10.3389/fncel.2016.00102>
- Patsopoulos, N. A., Baranzini, S. E., Santaniello, A., Shoostari, P., Cotsapas, C., Wong, G., Beecham, A. H., James, T., Replogle, J., Vlachos, I. S., McCabe, C., Pers, T. H., Brandes, A., White, C., Keenan, B., Cimpean, M., Winn, P., Panteliadis, I. P., Robbins, A., ... De Jager, P. L. (2019). Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*, 365(6460). <https://doi.org/10.1126/science.aav7188>
- Peelman, F., Waelput, W., Iserentant, H., Lavens, D., Eyckerman, S., Zabeau, L., Tavernier, J. (2004). Leptin: linking adipocyte metabolism with cardiovascular and autoimmune diseases. *Progress in Lipid Research*, 43(4), 283-301. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2004.03.001>
- Pérez-Montarelo, D., Fernández, A., Barragán, C., Noguera, J. L., Folch, J. M., Rodríguez, M. C., Óvilo, C., Silió, L., Fernández, A. I. (2013). Transcriptional Characterization of Porcine Leptin and Leptin Receptor Genes. *PLoS ONE*, 8(6), 1-11. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066398>
- Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B., Wolinsky, J. S. (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria. *Annals of Neurology*, 69(2), 292-302. <https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Popov, D. V., Lysenko, E. A., Kuzmin, I. V., Vinogradova, O. L., Grigoriev, A. I. (2015). Regulation of PGC-1 $\alpha$  isoform expression in skeletal muscles. *Acta Naturae*, 7(1), 48-59. <https://doi.org/10.32607/20758251-2015-7-1-48-59>
- Probert, L. (2015). TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects. *Neuroscience*, 302, 2-22. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2015.06.038>
- Qi, X., Lewin, A. S., Sun, L., Hauswirth, W. W., Guy, J. (2007). Suppression of mitochondrial oxidative stress provides long-term neuroprotection in experimental optic neuritis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 48(2), 681-691. <https://doi.org/10.1167/iovs.06-0553>
- Quinton, N. D., Lee, A. J., Ross, R. J. M., Eastell, R., Blakemore, A. I. F. (2001). A single nucleotide polymorphism (SNP) in the leptin receptor is associated with BMI, fat mass and leptin levels in postmenopausal Caucasian women. *Hum Genet*, 108(3), 233-236. <https://doi.org/10.1007/s004390100468>
- Ramos-Lobo, A. M., Donato, J. (2017). The role of leptin in health and disease. *Temperature*, 4(3), 258-291. <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1327003>
- Ramos-Lobo, A. M., Teixeira, P. D., Furigo, I. C., Melo, H. M., de M Lyra E Silva, N., De Felice, F. G., Donato, J., Jr (2019). Long-term consequences of the absence of leptin signaling in early life. *eLife*, 8, e40970. <https://doi.org/10.7554/eLife.40970>

- Reich, D. S., Lucchinetti C. F., Calabresi P. A. (2018) Multiple Sclerosis. *N Engl J Med.* 378(2):169-180. <https://doi.org/10.1056/NEJMra1401483>
- Rey, L. K., Wieczorek, S., Akkad, D. A., Linker, R. A., Chan, A., Hoffjan, S. (2011). Polymorphisms in genes encoding leptin, ghrelin and their receptors in German multiple sclerosis patients. *Molecular and Cellular Probes*, 25(5-6), 255-259. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2011.05.004>
- Rhoades, K. L., Golub, S. H., Economou, J. S. (1992). The regulation of the human tumor necrosis factor alpha promoter region in macrophage, T cell, and B cell lines. *The Journal of biological chemistry*, 267(31), 22102–22107. PMID: 1429562
- Rieckmann, P., Albrecht, M., Kitze, B., Weber, T., Tumani, H., Broocks, A., Lüer, W., Helwig, A., Poser, S. (1995). Tumor necrosis factor-alpha messenger RNA expression in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with disease activity. *Annals of neurology*, 37(1), 82–88. <https://doi.org/10.1002/ana.410370115>
- Rius-Pérez, S., Torres-Cuevas, I., Millán, I., Ortega, Á. L., Pérez, S., Sandhu, M. A. (2020). PGC-1 $\alpha$ , Inflammation, and Oxidative Stress: An Integrative View in Metabolism. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 1452696. <https://doi.org/10.1155/2020/1452696>
- Rong, G., Tang, W., Wang, Y., Qiu, H., Chen, S. (2019). Investigation of leptin receptor rs1137101 G>A polymorphism with cancer risk: Evidence from 35936 subjects. *Bioscience Reports*, 39(6). <https://doi.org/10.1042/BSR20182240>
- Rose, J. J., Bealmear, B., Nedelkoska, L., Studzinski, D., Lisak, R. P., Benjamins, J. A. (2009). Cytokines Decrease Expression of Interleukin-6 Signal Transducer and Leptin Receptor in Central Nervous System Glia. *Journal of neuroscience research*, 87(14), 3098–3106. <https://doi.org/10.1002/jnr.22135>
- Rotondi, M., Batocchi, A. P., Coperchini, F., Caggiula, M., Zerbini, F., Sideri, R., Loporati, P., Nociti, V., Frisullo, G., Mirabella, M., Magri, F., Oliviero, A., Chiovato, L. (2013). Severe disability in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with profound changes in the regulation of leptin secretion. *NeuroImmunoModulation*, 20(6), 341-347. <https://doi.org/10.1159/000353567>
- Roxburgh, R. H., Seaman, S. R., Masterman, T., Hensiek, A. E., Sawcer, S. J., Vukusic, S., Achiti, I., Confavreux, C., Coustans, M., le Page, E., Edan, G., McDonnell, G. V., Hawkins, S., Trojano, M., Liguori, M., Cocco, E., Marrosu, M. G., Tesser, F., Leone, M. A., Weber, A., ... Compston, D. A. (2005). Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*, 64(7), 1144–1151. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8>
- Sánchez-Margalet, V., Martín-Romero, C., Santos-Alvarez, J., Goberna, R., Najib, S., Gonzalez-Yanes, C. (2003). Role of leptin as an immunomodulator of blood mononuclear cells: Mechanisms of action. *Clinical and Experimental Immunology*, 133(1), 11-19. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2249.2003.02190.x>
- Sanna, V., Di Giacomo, A., La Cava, A., Lechler, R. I., Fontana, S., Zappacosta, S., Matarese, G. (2003). Leptin surge precedes onset of autoimmune encephalomyelitis and correlates with development of pathogenic T cell responses. *Journal of Clinical Investigation*, 111(2), 241-250. <https://doi.org/10.1172/JCI200316721>
- Satoh, T., Yoshino, S., Katano, A., Ishizuka, T., Tomaru, T., Shibusawa, N., Hashimoto, K., Yamada, M., Mori, M. (2009). Isolation of a novel leptin receptor gene

- promoter preferentially functioning in neuronal cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 389(4), 673-677.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.09.056>
- Sedger, L. M., McDermott, M. F. (2014). TNF and TNF-receptors: From mediators of cell death and inflammation to therapeutic giants - past, present and future. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 25(4), 453-472.  
<https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2014.07.016>
- Sharief, M. K., M.B., Ch. B., Phil, M., Hentges, R. (1991). Association between Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Disease Progression in Patients with Multiple Sclerosis. *N Engl J Med*, 325, 467-72. <https://doi.org/10.1056/NEJM199108153250704>
- Simpson, S., Stewart, N., Van Der Mei, I., Otahal, P., Charlesworth, J., Ponsonby, A. L., Blizzard, L., Dwyer, T., Pittas, F., Gies, P., Taylor, B. (2015). Stimulated PBMC-produced IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  are associated with altered relapse risk in multiple sclerosis: Results from a prospective cohort study. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, 86(2), 200-207. <https://doi.org/10.1136/jnnp-2013-307336>
- Sintzel, M. B., Rametta, M., Reder, A. T. (2018). Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurology and Therapy*, 7(1), 59-85.  
<https://doi.org/10.1007/s40120-017-0086-4>
- Skiris, A., Papadaki, O., Kafasla, P., Karakasiliotis, I., Hazapis, O., Reczko, M., Grammenoudi, S., Bauer, J., Kontoyiannis, D. L. (2015). Neuroprotection requires the functions of the RNA-binding protein HuR. *Cell death and differentiation*, 22(5), 703-718. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.158>
- Solleiro-Villavicencio, H., Rivas-Arancibia, S. (2018). Effect of chronic oxidative stress on neuroinflammatory response mediated by CD4+T cells in neurodegenerative diseases. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 114.  
<https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00114>
- Stachowiak, M., Mackowski, M., Madeja, Z., Szydłowski, M., Buszka, A., Kaczmarek, P., Rubis, B., Mackowiak, P., Nowak, K. W., Switonski, M. (2007). Polymorphism of the porcine leptin gene promoter and analysis of its association with gene expression and fatness traits. *Biochemical Genetics*, 45(3-4), 245-253.  
<https://doi.org/10.1007/s10528-006-9070-x>
- Sternberg, Z., Chadha, K., Lieberman, A., Drake, A., Hojnacki, D., Weinstock-Guttman, B., Munschauer, F. (2009). Immunomodulatory responses of peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients upon in vitro incubation with the flavonoid luteolin: additive effects of IFN-beta. *Journal of Neuroinflammation*, 6, 28. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-6-28>
- St-Pierre, J., Drori, S., Uldry, M., Silvaggi, J.M., Rhee, J., Jäger, S., Handschin, C., Zheng, K., Lin, J., Yang, W., Simon, D.K., Bachoo, R., Spiegelman, B.M. (2006). Suppression of Reactive Oxygen Species and Neurodegeneration by the PGC-1 Transcriptional Coactivators. *Cell*, 127(2), 397-408.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.09.024>
- St-Pierre, J., Lin, J., Krauss, S., Tarr, P. T., Yang, R., Newgard, C. B., Spiegelman, B. M. (2003). Bioenergetic analysis of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivators 1alpha and 1beta (PGC-1alpha and PGC-1beta) in muscle cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(29), 26597-26603.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M301850200>

- Sun, Q., Cornelis, M. C., Kraft, P., Qi, L., van Dam, R. M., Girman, C. J., Laurie, C. C., Mirel, D. B., Gong, H., Sheu, C. C., Christiani, D. C., Hunter, D. J., Mantzoros, C. S., Hu, F. B. (2010). Genome-wide association study identifies polymorphisms in LEPR as determinants of plasma soluble leptin receptor levels. *Human Molecular Genetics*, 19(9), 1846-1855. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq056>
- Tartaglia, L. A. (1997). The leptin receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272(10), 6093-6096. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.10.6093>
- Tartaglia, L., Dembski, M., Weng, X., Deng, N., Culpepper, J., Devos, R., Richards, G. J., Campfield, L. A., Clark, F. T., Deeds, J., Muir, C., Sanker, S., Moriarty, A., Moore, K. J., Smutko, J. S., Mays, G. G., Wool, E. A., Monroe, C. A., Tepper, R. I. (1995) Identification and Expression Cloning of a Leptin Receptor, OB-R. *Cell*, 83(7), 1263-1271. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90151-5](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90151-5)
- Teixeira, T. M., da Costa, D. C., Resende, A. C., Soulage, C. O., Bezerra, F. F., Daleprane, J. B. (2017). Activation of Nrf2-Antioxidant Signaling by 1,25-Dihydroxycholecalciferol Prevents Leptin-Induced Oxidative Stress and Inflammation in Human Endothelial Cells. *The Journal of Nutrition*, 147(4), 506-513. <https://doi.org/10.3945/jn.116.239475>
- Thornton, P., Pinteaux, E., Gibson, R. M., Allan, S. M., Rothwell, N. J. (2006). Interleukin-1-induced neurotoxicity is mediated by glia and requires caspase activation and free radical release. *Journal of Neurochemistry*, 98(1), 258-266. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03872.x>
- Trapp, B. D., Nave, K. A. (2008). Multiple sclerosis: An immune or neurodegenerative disorder? *Annual Review of Neuroscience*, 31, 247-269. <https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.30.051606.094313>
- Trapp, B. D., Peterson, J., Ransohoff, R. M., Rudick, R., Mörk, S., Bö, L. (1998). Axonal Transection in the Lesions of Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 338(5), 278-285. <https://doi.org/10.1056/nejm199801293380502>
- Tsareva, E. Y., Favorova, O. O., Boyko, A. N., Kulakova, O. G. (2019). Genetic Markers for Personalized Therapy of Polygenic Diseases: Pharmacogenetics of Multiple Sclerosis. *Molecular Biology*, 53(4), 513-534. <https://doi.org/10.1134/S0026893319040149>
- Uotani, S., Bjørbaek, C., Tornøe, J., Flier, J. S. (1999). Functional properties of leptin receptor isoforms: internalization and degradation of leptin and ligand-induced receptor downregulation. *Diabetes*, 48(2), 279-286. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.2.279>
- Valle, I., Álvarez-Barrientos, A., Arza, E., Lamas, S., Monsalve, M. (2005). PGC-1 $\alpha$  regulates the mitochondrial antioxidant defense system in vascular endothelial cells. *Cardiovascular Research*, 66(3), 562-573. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2005.01.026>
- van Langelaar, J., Rijvers, L., Smolders, J., van Luijn, M. M. (2020). B and T Cells Driving Multiple Sclerosis: Identity, Mechanisms and Potential Triggers. *Frontiers in Immunology*, 11, 760. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00760>
- Villanueva, E. C., Myers, M. G. (2008). Leptin receptor signaling and the regulation of mammalian physiology. *International Journal of Obesity*, 32, S8-S12. <https://doi.org/10.1038/ijo.2008.232>
- Walduck, A. K., Becher, D. (2012). Leptin, CD4<sup>+</sup> Treg and the prospects for vaccination against H. Pylori infection. *Frontiers in Immunology*, 3, 316. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2012.00316>

- Wan, X. S., Devalaraja, M. N., St. Clair, D. K. (1994). Molecular Structure and Organization of the Human Manganese Superoxide Dismutase Gene. *DNA and Cell Biology*, 13(11), 1127-1136. <https://doi.org/10.1089/dna.1994.13.1127>
- Wang, Y., Branicky, R., Noë, A., Hekimi, S. (2018). Superoxide dismutases: Dual roles in controlling ROS damage and regulating ROS signaling. *Journal of Cell Biology*, 217(6), 1915-1928. <https://doi.org/10.1083/jcb.201708007>
- Weng, S. W., Lin, T. K., Wang, P. W., Chen, I. Y., Lee, H. C., Chen, S. Der, Chuang, Y. C., Liou, C. W. (2010). Gly482Ser polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$  gene is associated with oxidative stress and abdominal obesity. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 59(4), 581-586. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2009.08.021>
- White, D. W., Tartaglia, L. A. (1996). Leptin and OB-R: body weight regulation by a cytokine receptor. *Cytokine & growth factor reviews*, 7(4), 303-309. [https://doi.org/10.1016/s1359-6101\(96\)00040-8](https://doi.org/10.1016/s1359-6101(96)00040-8)
- Wilhelm, J., Birkenstock, A., Buchholz, V., Müller, A., Aly, S. A., Gruner-Labitzke, K., Koehler, H., Lichtinghagen, R., Jahn, K., Groh, A., Kahl, K. G., de Zwaan, M., Hillemacher, T., Bleich, S., Frieling, H. (2021). Promoter Methylation of LEP and LEPR before and after Bariatric Surgery: A Cross-Sectional Study. *Obesity Facts*, 30625, 1-7. <https://doi.org/10.1159/000511918>
- Witte, M. E., Nijland, P. G., Drexhage, J. A. R., Gerritsen, W., Geerts, D., Van Het Hof, B., Reijkerkerk, A., De Vries, H. E., Van Der Valk, P., Van Horsen, J. (2013). Reduced expression of PGC-1 $\alpha$  partly underlies mitochondrial changes and correlates with neuronal loss in multiple sclerosis cortex. *Acta Neuropathologica*, 125(2), 231-243. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1052-y>
- Wootla, B., Eriguchi, M., Rodriguez, M. (2012). Is multiple sclerosis an autoimmune disease? *Autoimmune Diseases*, 1(1). <https://doi.org/10.1155/2012/969657>
- Wrann, C. D., Rosen, E. D. (2012). New insights into adipocyte-specific leptin gene expression. *Adipocyte*, 1(3), 168-172. <https://doi.org/10.4161/adip.20574>
- Wu, L., Sun, D. (2017). Leptin receptor gene polymorphism and the risk of cardiovascular disease: A systemic review and meta-analysis. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 14(4). <https://doi.org/10.3390/ijerph14040375>
- Xiao, P., Shi, J., Liu, X. (2019). Associations of leptin and leptin receptor genetic variants with coronary artery disease: a meta-analysis. *Bioscience reports*, 39(6), BSR20190466. <https://doi.org/10.1042/BSR20190466>
- Xie, X. F., Huang, X. H., Shen, A. Z., Li, J., Sun, Y. H. (2018). Association between circulating leptin levels and multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis. *Postgraduate medical journal*, 94(1111), 278-283. <https://doi.org/10.1136/postgradmedj-2017-135397>
- Xu, Y., Porntadavity, S., St Clair, D. K. (2002). Transcriptional regulation of the human manganese superoxide dismutase gene: the role of specificity protein 1 (Sp1) and activating protein-2 (AP-2). *Molecular and Cellular Biology*, 362, 401-412.
- Yang, J., Du, H., Lv, J., Zhang, L. (2016). Association of rs1137101 polymorphism in LEPR and susceptibility to knee osteoarthritis in a Northwest Chinese Han population. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 17(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1162-0>

- Yang, Y., Niu, T. (2018). A meta-analysis of associations of LEPR Q223R and K109R polymorphisms with Type 2 diabetes risk. *PLoS ONE*, 13(1), 1-25. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189366>
- Yarlagadda, A., Alfson, E., Clayton, A. H. (2009). The blood brain barrier and the role of cytokines in neuropsychiatry. *Psychiatry (Edgmont (Pa. : Township))*, 6(11), 18-22.
- Yousefi, M., Karmaus, W., Zhang, H., Ewart, S., Arshad, H., Holloway, J. W. (2013). The methylation of the LEPR/LEPROT genotype at the promoter and body regions influence concentrations of leptin in girls and BMI at age 18 years if their mother smoked during pregnancy. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 4(2), 86-100. PMID: 23875062
- Yousefian, M., Nemati, R., Daryabor, G., Gholijani, N., Nikseresht, A., Borhani-Haghighi, A., Kamali-Sarvestani, E. (2018). Gender-Specific Association of Leptin and Adiponectin Genes With Multiple Sclerosis. *American Journal of the Medical Sciences*, 356(2), 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.amjms.2018.03.008>
- Zabeau, L., Peelman, F. (2016). Encyclopedia of Signaling Molecules. *Encyclopedia of Signaling Molecules*, January 2016. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6438-9>
- Zarkesh-Esfahani, H., Pockley, G., Metcalfe, R. A., Bidlingmaier, M., Wu, Z., Ajami, A., Weetman, A. P., Strasburger, C. J., Ross, R. J. (2001). High-dose leptin activates human leukocytes via receptor expression on monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 167(8), 4593-4599. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.8.4593>
- Zhang, S., Jiang, J., Chen, Z., Wang, Y., Tang, W., Liu, C., Liu, L., Chen, Y. (2018). Investigation of LEP and LEPR polymorphisms with the risk of hepatocellular carcinoma: a case-control study in Eastern Chinese Han population. *Oncotargets and therapy*, 11, 2083-2089. <https://doi.org/10.2147/OTT.S153931>
- Zhang, S. Y., Gui, L. N., Liu, Y. Y., Shi, S., Cheng, Y. (2020). Oxidative Stress Marker Aberrations in Multiple Sclerosis: A Meta-Analysis Study. *Frontiers in neuroscience*, 14, 823. <https://doi.org/10.3389/fnins.2020.00823>
- Zheng, W., Chen, Y., Chen, H., Xiao, W., Liang, Y., Wang, N., Jiang, X., Wen, S. (2018). Identification of key target genes and biological pathways in multiple sclerosis brains using microarray data obtained from the Gene Expression Omnibus database. *Neurological research*, 40(10), 883-891. <https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1497253>
- Zhu, Y., Zou, X., Dean, A. E., Brien, J. O., Gao, Y., Tran, E. L., Park, S. H., Liu, G., Kieffer, M. B., Jiang, H., Stauffer, M. E., Hart, R., Quan, S., Satchell, K. J. F., Horikoshi, N., Bonini, M., Gius, D. (2019). Lysine 68 acetylation directs MnSOD as a tetrameric detoxification complex versus a monomeric tumor promoter. *Nature Communications*, 10(1), 1-15. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10352-4>
- Zimmermann, A. K., Simon, P., Seeburger, J., Hoffmann, J., Ziemer, G., Aebert, H., Wendel, H. P. (2003). Cytokine gene expression in monocytes of patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery evaluated by real-time PCR. *Journal of cellular and molecular medicine*, 7(2), 146-156. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2003.tb00213.x>

## BIOGRAFIJA AUTORA

Ivana Z. Kolić je rođena 21.02.1987. godine u Beogradu, gde je stekla osnovno i srednje obrazovanje. Diplomске studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijski program: Molekularna biologija i fiziologija, smer: Primenjena genetika) završila je 22.05.2013. godine odbranom završnog diplomskog ispita, sa ocenom 10, pod naslovom: „Polimorfizmi u genima za citokine IL-1 $\beta$  i IL-1Ra i hronična inflamacija u srednjem uhu“. Diplomski rad urađen je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, pod rukovodstvom mentora dr Maje Živković. Školske 2013./2014. godine je upisala doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijski program: Molekularna biologija, modul: Molekularna biologija eukariota).

Od 01.07.2013. godine stalno je zaposlena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. Kao viši stručni saradnik, angažovana je na temi „Genetska osnova hronične inflamacije“, br. 0802102, u okviru programa istraživanja INN „Vinča“, čiji je koordinator dr Aleksandra Stanković. U periodu od 01.07.2020.-01.12.2020. bila je učesnik na projektu mladih istraživača PROMIS, „miFaDriCa“, ev.br.6066923, Fonda za nauku RS, pod rukovodstvom dr Ivana Jovanovića. Nosilac je prve nagrade za mlade istraživače na internacionalnom kongresu elektrokardiologije, „International Congress on Electrocardiology (ICE)“ za rad pod naslovom: „Association of ACE I/D, AGTR1 +1166A/C and AGTR2 -1332A/G gene variants with autonomous nervous system function in Serbian syncope patients“.

Do sada je publikovala 6 radova iz uže naučne oblasti u časopisima međunarodnog značaja i 15 kongresnih saopštenja iz uže naučne oblasti na skupovima međunarodnog značaja, štampanih u izvodu.

## Изјава о ауторству

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Ивана Колић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ М3003/2013 \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Студија асоцијације варијанти и нивоа транскрипције гена лептинског сигналног пута (LEP, LEPR i PGC1A), антиоксидативне заштите (SOD2) и инфламације (TNF- $\alpha$ ) са ризиком за настанак и клиничким током мултипле склерозе

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, 26.05.2021.

\_\_\_\_\_



# Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора \_\_\_\_\_ Ивана Колић \_\_\_\_\_

Број индекса \_\_\_\_\_ М3003/2013 \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_ молекуларна биологија еукариота \_\_\_\_\_

**Наслов рада** „Студија асоцијације варијанти и нивоа транскрипције гена лептинског сигналног пута (LEP, LEPR i PGC1A), антиоксидативне заштите (SOD2) и инфламације (TNF- $\alpha$ ) са ризиком за настанак и клиничким током мултипле склерозе“

**Ментори:** др Љиљана Стојковић, научни сардник Института за нуклеарне науке “Винча” Универзитета у Београду и др Душка Савић Павићевић, редовни професор Биолошког факултета Универзитета у Београду

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањивања у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

**Потпис докторанда**

У Београду, 26.05.2021.

\_\_\_\_\_

## Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

**„Студија асоцијације варијанти и нивоа транскрипције гена лептинског сигналног пута (LEP, LEPR i PGC1A), антиоксидативне заштите (SOD2) и инфламације (TNF- $\alpha$ ) са ризиком за настанак и клиничким током мултипле склерозе“**

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на следећој страни).

Потпис докторанда

У Београду, 26.05.2021.

---

1. Ауторство - Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољавање умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.