

**UNIVERZITET U BEOGRADU  
MEDICINSKI FAKULTET**

**Irena R. Vuković Petrović**

**Ekspresija gena i proteina koji regulišu  
autofagiju u mononuklearnim ćelijama  
periferne krvi pacijenata sa multiplom  
sklerozom**

**Doktorska disertacija**

**Beograd, 2019.**

**UNIVERSITY OF BELGRADE  
FACULTY OF MEDICINE**

**Irena R. Vuković Petrović**

**The expression of genes and proteins that  
regulate autophagy in peripheral blood  
mononuclear cells of patients with multiple  
sclerosis**

**Doctoral dissertation**

**Belgrade, 2019**

## **Mentor**

---

Prof. dr Jelena Drulović  
Klinika za neurologiju,  
Klinički centar Srbije

## **Članovi Komisije**

---

Prof. dr Vladimir Trajković  
Medicinski fakultet u Beogradu  
Predsednik Komisije

## **Komentori**

---

Doc. dr Emina Milošević  
Medicinski fakultet u Beogradu

---

Prof. dr Vera Pravica  
Medicinski fakultet u Beogradu

---

N. saradnik dr Verica Paunović  
Medicinski fakultet u Beogradu

---

Akademik prof. dr Miodrag Čolić  
Srpska akademija nauka i umetnosti

## Zahvalnica

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije u Beogradu. Istraživanja predstavljena u disertaciji su realizovana u okviru projekta Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetski balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ pod rukovodstvom prof. dr Vladimira Trajkovića.*

*Zahvaljujem se:*

*svom mentoru, prof. dr Jeleni Drulović na neposrednom rukovođenju pri pisanju doktorske disertacije, na izuzetnoj višegodišnjoj saradnji i podršci,*

*komentorima, doc. dr Emini Milošević na posvećenosti i korisnim savetima pri pisanju disertacije i dr Verici Paunović na prijateljstvu, neposrednoj i nesebičnoj pomoći pri izradi eksperimenata, iskrenoj podršci i dragocenim sugestijama pri pisanju ove disertacije i publikacije koja je iz nje proistekla,*

*prof. dr Vladimiru Trajkoviću na kolegijalnosti, razumevanju i pomoći u eksperimentalnom radu, pisanju doktorske disertacije i publikacije koja je iz nje proistekla,*

*poštovanim članovima komisije prof. dr Veri Pravici i akademiku prof. dr Miodragu Čoliću na uloženom trudu i pomoći pri oblikovanju konačne verzije disertacije,*

*prof. dr Dušanu Popadiću i prof. dr Mariji Mostarici-Stojković na korisnim savetima pri izradi disertacije,*

*svim koleginicama i kolegama koji su neposredno doprineli uspešnom završetku ove doktorske disertacije na izuzetnoj višegodišnjoj saradnji,*

*svim pacijentima Klinike za neurologiju koji su učestvovali u ovom istraživanju.*

*Najveću zahvalnost dugujem mojoj porodici i prijateljima koji su postali porodica, na veri, razumevanju i безусловnoj podršci koju su mi pružili tokom izrade ove doktorske disertacije. Mom suprugu Aljoši, jer je, u mojim sukobima sa svetom, uvek u prvim borbenim redovima.*

*Tezu posvećujem svojoj porodici.*

# **Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom**

## **Sažetak**

**Uvod:** Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) u kojoj infiltracija limfocitima dovodi do oštećenja mijelina i aksona. Autofagija, proces kontrolisane auto-digestije koji reguliše homeostazu ćelije, važan je u urođenoj i adaptivnoj imunosti. Uloga autofagije nije do sada detaljno izučavana u različitim populacijama limfocita u MS.

**Ciljevi istraživanja:** Ispitati ekspresiju gena za regulatore autofagije (*ATG7, ATG10, ATG5, ATG4B, ATG3, ATG13, ATG8A, ATG14, SQSTM1, BCL2, ULK1, BNIP3, FOXO1, FOXO3, VPS34, BECN1, ATF4*) i proinflamatorne citokine (*TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17* i *GM-CSF*), kao i aktivnost autofagije u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MNČPK) i različitim populacijama limfocita pacijenata sa MS i kontrolnih ispitanika.

**Pacijenti i metode:** Naša studija je uključila novoobolele pacijente sa MS, dijagnostikovane prema McDonald-ovim kriterijumima (2001.), koji u trenutku uzimanja uzorka nisu bili uključeni ni u jedan terapijski protokol. Koristeći kvantitativni PCR u realnom vremenu ispitali smo ekspresiju gena koji regulišu autofagiju i ekspresiju gena za proinflamatorne citokine u MNČPK i CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> T-limfocitima i CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>B-limfocitima pacijenata sa MS i kontrola. Takođe smo analizirali aktivnost bazalne autofagije imunoblot metodom u MNČPK i CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> T-limfocitima ove dve grupe ispitanika.

**Rezultati:** Nivoi iRNK i proteina ATG5, potrebnog za formiranje autofagozoma, bili su povišeni u CD4<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup> T-limfocitima, ali ne i u B-limfocitima i MNČPK pacijenata sa MS u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. Ekspresija ostalih ispitivanih autofagnih gena i aktivnost autofagije nisu se značajno razlikovale u ovim grupama ispitanika. Nivoi ATG5 iRNK u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS bili su u pozitivnoj korelaciji sa nivoma iRNK za proinflamatorni citokin - faktor nekroze tumora (TNF).

**Zaključak:** Naši rezultati ukazuju da povišena ekspresija ATG5, nezavisno od autofagije, može biti povezana sa proinflamatornom ulogom T-limfocita u MS.

**KLJUČNE REČI:** multipla skleroza; T-limfociti; autofagija; ATG5; TNF

**NAUČNA OBLAST:** Medicina

**UŽA NAUČNA OBLAST:** Molekularna medicina

**UDK:**

# The expression of genes and proteins that regulate autophagy in peripheral blood mononuclear cells of patients with multiple sclerosis

## Abstract

**Introduction:** Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS), in which focal lymphocytic infiltration leads to damage of myelin and axons. Autophagy, a process of controlled self-digestion which regulates cell homeostasis, is involved in innate and adaptive immunity. The role of autophagy has not been thoroughly investigated in distinct lymphocyte populations in MS.

**Aims of the investigation:** We investigated the expression of genes encoding autophagy regulators (*ATG7, ATG10, ATG5, ATG4B, ATG3, ATG13, ATG8A, ATG14, SQSTM1, BCL2, ULK1, BNIP3, FOXO1, FOXO3, VPS34, BECN1, ATF4*) and proinflammatory cytokines (*TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17* and *GM-CSF*), as well as autophagic activity in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) and distinct lymphocyte populations in MS patients and controls.

**Patients and methods:** Our study included newly diagnosed MS patients according to the McDonald criteria (2001), who have not been submitted to any therapeutic protocol at the moment of sampling. Using quantitative real-time PCR, we assessed the relative expression of genes involved in autophagy regulation and proinflammatory cytokines in PBMCs as well as the separated CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> T and CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B cell populations of MS patients and controls. We also analyzed activity of basal autophagy by immunoblotting in PBMCs and CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells of these two subject groups.

**Results:** The mRNA and protein levels of autophagy-related (ATG)5, required for autophagosome formation, were increased in CD4<sup>+</sup> and CD4<sup>-</sup> T cells, but not B cells of MS patients compared to control subjects. The expression of other investigated autophagy genes, as well as the autophagic activity, did not significantly differ between the two groups. ATG5 mRNA levels in CD4<sup>+</sup> T cells from MS patients were positively correlated with those of the proinflammatory cytokine tumor necrosis factor (TNF).



**Conclusions:** These data suggest that autophagy-independent increase in ATG5 expression might be associated with the proinflammatory capacity of T cells in multiple sclerosis.

**KEY WORDS:** multiple sclerosis; T cells; autophagy; ATG5; TNF

**SCIENTIFIC FIELD:** Medicine

**SPECIALISED SCIENTIFIC FIELD:** Molecular medicine

**UDK:**

# Sadržaj

<b>1. UVOD</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1. MULTIPLA SKLEROZA</b> .....	<b>2</b>
1.1.1. DEFINICIJA I EPIDEMIOLOGIJA .....	2
1.1.2. KLINIČKI TOK I FORME MS .....	2
1.1.3. ETIOLOGIJA MULTIPLE SKLEROZE.....	3
1.1.4. IMUNOPATOGENEZA MULTIPLE SKLEROZE .....	4
<b>1.2. AUTOFAGIJA</b> .....	<b>10</b>
1.2.1. OSNOVNI PRINCIPI I MEHANIZMI REGULACIJE .....	10
1.2.2. ULOGA AUTOFAGIJE U IMUNSKOM ODGOVORU I AUTOIMUNOSTI .....	13
<b>2. CILJEVI</b> .....	<b>16</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE</b> .....	<b>18</b>
<b>3.1. ISPITANICI</b> .....	<b>19</b>
<b>3.2. UZIMANJE UZORAKA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.3. IZOLACIJA MONONUKLEARNIH ČELIJA PERIFERNE KRVI</b> .....	<b>20</b>
<b>3.4. SORTIRANJE ČELIJA</b> .....	<b>20</b>
<b>3.5. ODREĐIVANJE GENSKE EKSPRESIJE</b> .....	<b>21</b>
3.5.1. IZOLACIJA RNK.....	21
3.5.2. REVERZNA TRANSKRIPCIJA.....	21
3.5.3. REAKCIJA LANČANOG UMNOŽAVANJA (PCR) U REALNOM VREMENU (KVANTITATIVNI PCR, QPCR) .....	22
<b>3.6. IMUNOBLOT ANALIZA (WESTERN BLOT)</b> .....	<b>24</b>
<b>3.7. STATISTIČKA ANALIZA</b> .....	<b>26</b>
<b>4. REZULTATI</b> .....	<b>27</b>
<b>4.1. RAZLIKA U EKSPRESIJI GENA KOJI REGULIŠU AUTOFAGIJU U MNČPK PACIJENATA SA MS I ZDRAVIH KONTROLA NIJE STATISTIČKI ZNAČAJNA</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2. EKSPRESIJA ATG5 IRNK JE SELEKTIVNO POVIŠENA U T-LIMFOCITIMA OBOLELIH OD MS</b> .....	<b>30</b>
<b>4.3. POVIŠENA EKSPRESIJA ATG5 U CD4+ T-LIMFOCITIMA PACIJENATA SA MS NIJE POVEZANA SA INDUKCIJOM AUTOFAGIJE</b> .....	<b>34</b>
<b>4.4. EKSPRESIJA TNF IRNK JE POVIŠENA U CD4+ T-LIMFOCITIMA</b> .....	<b>39</b>
<b>4.5. KORELACIJA ATG5 IRNK SA PROINFLAMATORNIM CITOKINIMA</b> .....	<b>41</b>

<b>4.6. KORELACIJA ATG5 iRNK SA STEPENOM ONESPOSOBLJENOSTI OBOLELIH OD MS.....</b>	<b>42</b>
<b>4.7. KORELACIJA TNF iRNK SA STEPENOM ONESPOSOBLJENOSTI OBOLELIH OD MS.....</b>	<b>43</b>
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>44</b>
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>52</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>54</b>

## **1.Uvod**

## 1.1. Multipla skleroza

### 1.1.1. Definicija i epidemiologija

Multipla skleroza (MS) je hronična, zapaljenska, demijelinizaciona i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS) [1]. Genetske, patohistološke, radiografske i kliničke karakteristike multiple skleroze pokazuju izrazitu heterogenost [2]. Bolest karakterišu promene tzv. plakovi koji predstavljaju inflamatorne lezije praćene demijelinizacijom, oštećenjem oligodendrocita, neurodegeneracijom, gubitkom aksona i remijelinizacijom. Oni se mogu detektovati magnetnom rezonancom (*engl.* magnetic resonance imaging, MRI), a novija istraživanja su pokazala da plakovi mogu biti lokalizovani ne samo u beloj već i u sivoj moždanoj masi u vidu kortikalnih lezija [3, 4]. Za postavljanje dijagnoze MS neophodno je da se utvrdi postojanje diseminacije lezija u vremenu i prostoru. Prema McDonald-u i saradnicima, kao dokaz o diseminaciji može da se koristi detekcija novih lezija magnetnom rezonancom, a koje nisu praćene pojavom neurološkog deficita [5-8].

U Evropi više od 600 000 ljudi boluje od MS, sa prevalencijom od 100 na 100 000 stanovnika i incidencijom od 5,5 na 100 000 stanovnika [9]. Prevalencija u Srbiji je, kao i u drugim zemljama jugoistočne Evrope, nešto manja (64,9/100 000) [10]. Bolest tipično počinje u trećoj i četvrtoj deceniji života i javlja se dva puta češće kod žena [11].

### 1.1.2. Klinički tok i forme MS

Klinička prezentacija bolesti je heterogena i obuhvata motorne neurološke manifestacije, senzorne i vizuelne smetnje, pojavu zamora, bola i kognitivnih deficita [12]. Bolest najčešće počinje vizuelnim smetnjama i/ili pojavom parestezija u donjim ekstremitetima [13]. Ove prve kliničke manifestacije inflamatorne demijelinizacije nazivaju se klinički izolovani sindrom. Ukoliko se pokaže diseminacija lezija u vremenu i prostoru postavlja se dijagnoza MS [13]. Radiološki izolovani sindrom predstavlja nalaz inflamatorne demijelinizacije na magnetnoj rezonanci koji nije praćen kliničkim znacima i/ili simptomima bolesti [14]. Iako ne predstavlja formu MS, neophodno je pratiti ove pacijente usled povećanog rizika od nastanka bolesti [15].

Na osnovu kliničkih karakteristika izdvajaju se tri tipa bolesti:

- primarno-progresivni - PPMS, podrazumeva progresivno pogoršavanje neuroloških smetnji bez perioda oporavka,

- relapsno-remitentni - RRMS, karakteriše pojavu neuroloških smetnji koje su praćene periodima skoro potpunog oporavka,
- sekundarno-progresivni - SPMS, RRMS pacijenti koji ulaze u postepeno progresivno pogoršavanje neuroloških smetnji bez perioda oporavka [16].

Još uvek nije razjašnjeno da li je PPMS posebna forma ili oblik SPMS u kojoj relapsi bolesti nisu bili klinički izraženi [17].

Za određivanje stepena težine bolesti koristi se Proširena skala statusa onesposobljenosti (*engl.* expanded disability status scale, EDSS). EDSS skor izražava broj i intenzitet zahvaćenosti funkcionalnih sistema CNS, a iskazuje se brojačano u rasponu od 1 do 10 [18]. U proceni progresije MS koristi se i skor težine multiple skleroze (*engl.* Multiple Sclerosis Severity Score, MSSS), koji pored EDSS skora uzima u obzir i trajanje bolesti u trenutku određivanja EDSS skora [19].

### 1.1.3. Etiologija multiple skleroze

Uzrok nastanka bolesti još uvek je nepoznat, a patogenetski mehanizmi nisu dovoljno razjašnjeni. Savremena istraživanja ukazuju da je MS multifaktorijalna bolest posredovana imunskim mehanizmima sa jasnom genetskom predispozicijom. Smatra se da je u osnovi oštećenja CNS autoimunski proces koji se javlja kod genetski predisponiranih osoba pod dejstvom faktora iz spoljašnje sredine [1].

**Genetska predispozicija** se ogleda u povećanom riziku za oboljevanje od MS koji kod bližih srodnika iznosi 2,9%, a kod jednojajčanih blizanaca dostiže 25,3% [20]. Istraživanja genetske osnove MS ukazuju na značajnu povezanost sa genima čiji produkti učestvuju u imunskom odgovoru [21]. Pokazan je visok stepen korelacije pojedinih HLA (*engl.* human leukocyte antigen) alela sa nastankom MS. Ističe se HLA-DRB1\*15:01 kao faktor rizika i HLA-A\*02 i HLA-B\*44 kao protektivni aleli [22]. Ispitivanjem polimorfizama pojedinačnih nukleotida (*engl.* single nucleotide polymorphisms, SNP) gena izvan HLA lokusa, najjača povezanost sa MS je nađena upravo za gene čiji produkti učestvuju u imunskom odgovoru [23].

**Faktori spoljašnje sredine** koji doprinose nastanku bolesti su brojni, ali njihova uloga u patogenezi MS je još uvek nedovoljno ispitana. Pokazana je, na primer, protektivna uloga visokog nivoa vitamina D, koja se može objasniti imunomodulatornim dejstvom ovog vitamina kako na nivou urođene imunosti, tako i u supresiji proliferacije

B- i T-limfocita i nastanku regulatornih T-limfocita (Treg) [24]. Smatra se takođe da pušenje cigareta (i aktivno i pasivno) povećava rizik od nastanka bolesti i utiče na njenu aktivnost, a pokazana je i udruženost sa drugim faktorima rizika: deficitom vitamina D, virusnim infekcijama, posebno Epstein–Barr virusom (EBV) i pomenutim HLA lokusima [25, 26].

O značaju virusnih infekcija u etiologiji MS govori i podatak da je interferon (IFN)- $\alpha$ , prvi lek koji je pokazao imunomodulatorni potencijal i uticao na tok bolesti, uveden u terapiju MS zahvaljujući hipotezi po kojoj je u osnovi MS virusna infekcija [27]. Ispitivana je povezanost MS i velikog broja virusa, među kojima se kao najznačajniji navodi EBV [28]. Smatra se da defektan odgovor CD8<sup>+</sup> T-limfocita na EBV dovodi do latentne infekcije B-limfocita u centralnom nervnom sistemu (CNS) [29]. Novija istraživanja ukazuju da udružena infekcija sa Humanim Herpes Virusom 6A dovodi do transformacije ovih B-limfocita, dok oba virusa indukuju odgovor T-limfocita što rezultira pojavom autoimunskih fenomena [30]. Nasuprot tome, pokazano je da citomegalovirusna (CMV) infekcija, kao i konzumacija kafe i alkohola smanjuju rizik od nastanka bolesti [31].

Gojaznost, stanje hronične inflamacije niskog stepena, posebno u periodu adolescencije, je još jedan od sredinskih faktora rizika za MS. Povišeni nivoi leptina u serumu i likvoru MS pacijenata su u korelaciji sa povećanom produkcijom IFN- $\gamma$  i smanjenim brojem Treg [32]. Interesantno je da gojaznost utiče i na smanjenu bioraspoloživost vitamina D, verovatno usled deponovanja ovog vitamina u masnom tkivu [33].

Pored navedenih faktora rizika, sve više podataka ukazuje na specifičnosti crevne mikrobiote kod obolelih od MS i njen uticaj na imunski sistem (koji je pokazan i u drugim autoimunskim bolestima) [34-36].

#### 1.1.4. **Imunopatogeneza multiple skleroze**

Morfološka osnova neurološkog deficita u MS su plakovi demijelinizacije bele i sive mase mozga i kičmene moždine. Smatra se da plakovi nastaju posredstvom imunskog odgovora, pri čemu nije poznato da li taj imunski odgovor započinje u samom CNS ili na periferiji [12]. Prema intrinzičkom modelu bolesti, inicijalni događaj može da bude infekcija CNS ili neurodegenerativni proces koji je praćen akumulacijom inflamatornih ćelija. U ekstrinzičkom modelu autoreaktivni T-limfociti se aktiviraju na

periferiji nedovoljno istraženim mehanizmima, prolaze kroz krvno-moždanu barijeru (KMB) i dovode do oštećenja [37-39]. Fenomen molekulske mimikrije predstavlja jedan od mogućih mehanizama kojima se objašnjava zašto T-limfociti napadaju sopstveno tkivo [38].

Ekstrinzičkom modelu bolesti po načinu indukcije odgovara animalni model MS – eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE). EAE se indukuje davanjem antigena mijelina, koji na periferiji pokreću odgovor autoreaktivnih T-limfocita koji zatim prolaze kroz KMB. U CNS se akumuliraju pomoćnički CD4<sup>+</sup> T-limfociti (*engl.* T helper, Th), pre svega Th1 i Th17 subpopulacije [12]. Naivni Th se diferenciraju u Th1 pod dejstvom prevashodno interleukina (IL)-12, a Th17 nastaju pod dejstvom više citokina od kojih je IL-23 ključan za propagaciju ovih ćelija. Ovi efektorski pomoćnički T-limfociti u CNS proizvode citokine i aktiviraju rezidentne antigen-prezentujuće ćelije (APC), dovodeći do povećane produkcije reaktivnih oblika kiseonika (ROK) i azot monoksida (NO) i posledičnog oštećenja tkiva [17]. Ključni citokini Th1 limfocita su IFN- $\gamma$  i faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor, TNF), a Th17 sekretuju IL-17A-F, IL-21 i IL-22 [17]. Th17 predstavljaju heterogenu subpopulaciju ćelija koje mogu da eksprimiraju transkripcione faktore karakteristične za Th1 [40]. Identifikovana je i nova subpopulacija Th ćelija koja proizvode velike količine GM-CSF (*engl.* granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) [41]. Značaj ovog citokina ogleda se u akumulaciji i diferencijaciji monocita kao ključnih efektorskih ćelija u oštećenju tkiva [42]. Iako se tipično svrstavaju u proinflamatorne citokine, TNF i GM-CSF pokazuju i imunomodulatorna svojstva [43, 44], što otežava predviđanje efekata anti-citokinske terapije [45, 46].

Ispitivanje imunomodulatornog efekta pojedinih terapeutika, uključujući i IFN- $\beta$  u terapiji RRMS, pomaže u razumevanju patogeneze ove kompleksne bolesti. Pokazano je da IFN- $\beta$  preko dendritskih ćelija (DĆ) suprimira diferencijaciju Th17 [47]. Takođe, monoklonsko antitelo koje blokira IL-17 dovelo je do smanjenja aktivnosti lezija uočenih na magnetnoj rezonanci [48]. Neočekivano, monoklonsko antitelo na p40 subjedinicu zajedničku za IL-12 (ključan za diferencijaciju Th1) i IL-23 (odgovoran za propagaciju Th17) se nije pokazalo efikasnim u terapiji MS [49]. Kao objašnjenje za neuspeh anti-p40 terapije navodi se da 1) primena terapije u odmakloj fazi bolesti, kao što je učinjeno u ovoj studiji, nema efekat jer se inicijacija i diferencijacija Th1 i Th17 ćelija davno odigrala, nastalo je oštećenje CNS, pa blokiranje nastanka novih Th1 i Th17 nije imalo



uticaj na kliničku sliku; 2) blokada IL-12 ovim putem nije smanjila ekspresiju adhezivnih molekula ključnih za prelazak efektorskih T-limfocita u CNS; 3) anti-p40 nije prelazilo u CNS usled intaktne KMB kod 50% pacijenata, a IL-12 i IL-23 bi mogli da imaju dodatne uloge lokalno u plakovima [50].

Pored nesumnjivo značajne uloge CD4<sup>+</sup> T-limfocita u patogenezi MS, CD8<sup>+</sup> T-limfociti su brojčano dominantna populacija u tipičnim lezijama, likvoru i perifernoj krvi pacijenata sa MS [51, 52]. Efektorska uloga CD8<sup>+</sup> T-limfocita u autoimunskim fenomenima CNS kod EAE pokazala je više sličnosti sa MS u poređenju sa ulogom CD4<sup>+</sup> T-limfocita [53]. U EAE dendritske ćelije (unakrsno) i oligodendrociti (direktno) prezentuju epitope mijelina u sklopu MHC (*engl.* major histocompatibility complex) I klase CD8<sup>+</sup> T-limfocitima i aktiviraju ih [54]. Pokazano je da stepen oštećenja aksona, koje se karakteriše akumulacijom proteina prekursora amiloida, koreliše sa brojem CD8<sup>+</sup> T-limfocita i makrofaga, ali ne i sa ekspresijom TNF i inducibilne NO sintaze [55]. Specifična subpopulacija CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-limfocita pokazala je u *in vitro* uslovima imunomodulatorne efekte: smanjenu produkciju IFN- $\gamma$  i inhibiciju indukcije T-ćelijskog odgovora pomoću DĆ [56].

Regulatorne CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FoxP3<sup>+</sup> T-ćelije su veoma značajne za postizanje i održavanje homeostaze imunskog sistema, pri čemu njihovi mehanizmi supresije uglavnom zahtevaju direktan ćelijski kontakt [57]. Kod pacijenata sa MS pokazana je smanjena sposobnost supresije pomoću Treg, u kombinaciji sa povećanom rezistencijom efektorskih T-limfocita [58-60]. Tr1, vrsta regulatornih T-ćelija, pokazale su smanjenu produkciju antiinflamatornog citokina IL-10 kod obolelih od MS u poređenju sa zdravim kontrolama, pri čemu se značaj ovog citokina u progresiji MS ogleda u povezanosti aktivnosti bolesti sa sniženim koncentracijama IL-10 [61, 62].

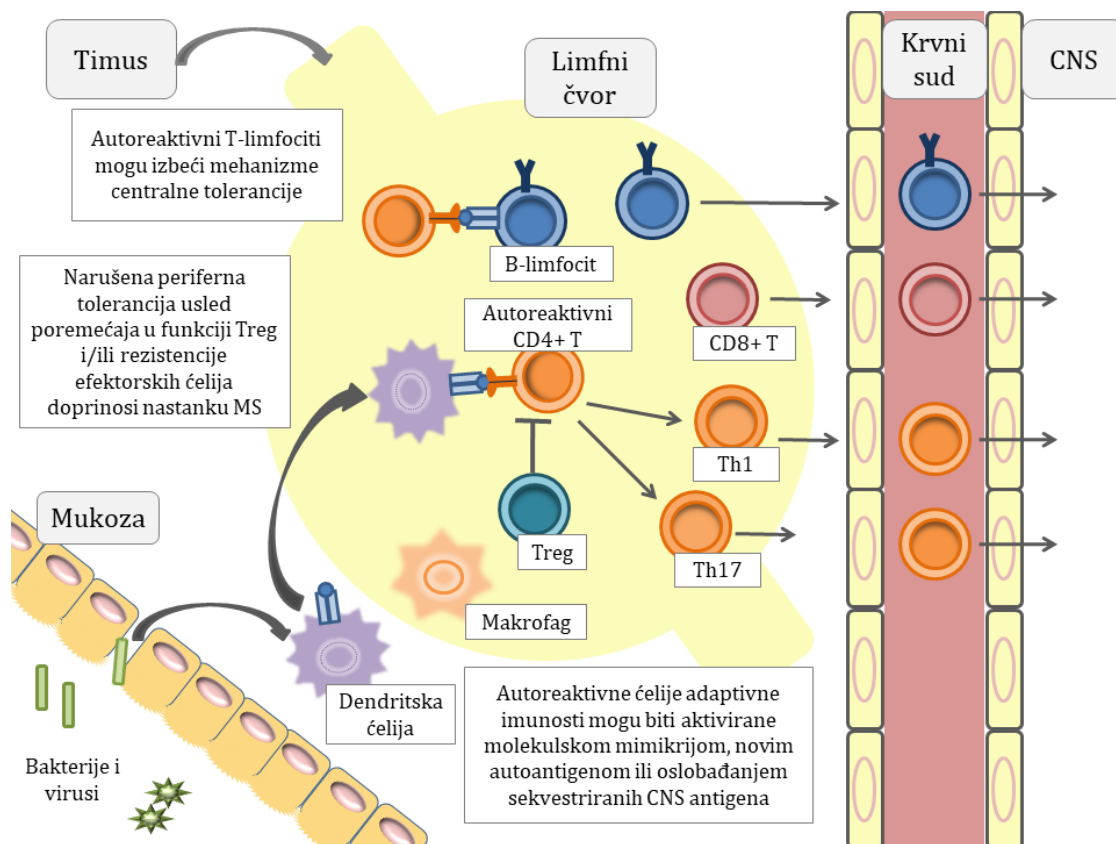
Iako T-limfociti imaju centralnu ulogu u patogenezi MS, sve više istraživanja ukazuje na funkciju B-limfocita u nastanku i održavanju patološkog procesa, uključujući i nove terapijske pristupe usmerene upravo na humoralnu komponentu adaptivnog imunskog odgovora. Uočena je povećana zastupljenost B-limfocita u likvoru koja koreliše sa bržom progresijom bolesti, kao i da ove ćelije u meningama mogu da formiraju strukture slične folikulima u limfnom čvoru, koje se kod SPMS dovode u vezu sa ranim početkom bolesti i teškim kortikalim oštećenjima [63, 64]. Tako se kao jedan od biomarkera za postavljanje dijagnoze bolesti koristi IgG u vidu oligoklonalnih traka u likvoru, prisutan kod većine obolelih od MS [65]. Antitela specifična za pojedine antigene

mijelina kao što je mijelinski oligodendrocitni glikorotein (MOG) povezana su sa procesom demijelinizacije u EAE i MS, dok novije studije ispituju značaj antitela na akvaporin-4, lociran na KMB, u patogenezi optičkog neuromijelitisa [66, 67]. Pokazano je da je uloga B-limfocita u patogenezi MS višestruka. B-limfociti utiču na T-limfocite produkcijom proinflamatornih (IL-6) ili antiinflamatornih citokina, kao što su IL-10 i faktor transformacije rasta- $\beta$  (*engl.* transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ) koji suprimiraju diferencijaciju Th1/Th17 [68, 69]. Ne sme se zanemariti ni funkcija B-limfocita u prezentaciji antigena u sklopu MHC molekula II klase, koja indukuje EAE, nezavisno od produkcije antitela [70]. U skladu sa prethodno navedenim, primena rituksimaba, monoklonskog antitela na CD20 koje izaziva depleciju B-limfocita, dovodi do značajne redukcije relapsa bolesti, kako radiološki tako i klinički, smanjujući broj B- i T-limfocita u likvoru u RRMS [71-73].

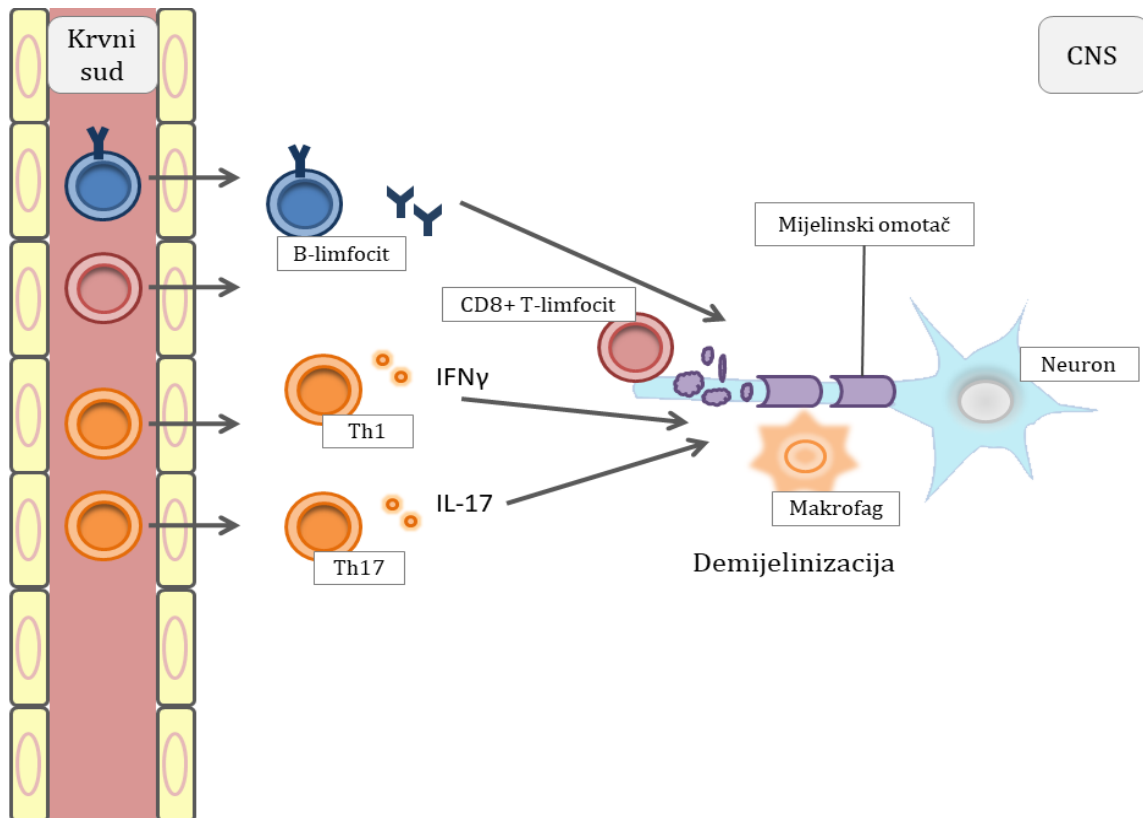
Istraživanja urođene imunosti rasvetlila su ulogu DĆ i makrofaga u aktivaciji T-limfocita i autoimunskom oštećenju tkiva u MS. Pokazano je da kod pacijenata sa MS konvencionalne DĆ eksprimiraju više kostimulatora i pojačano sekretuju IL-12 i TNF, dok plazmocitoidne DĆ karakteriše naglašena produkcija interferona tip I, što doprinosi stvaranju proinflamatornog okruženja [74, 75]. Makrofagi u CNS mogu biti poreklom od infiltrirajućih monocita sa proinflamatornom ulogom ili od rezidentnih ćelija mikroglije koje uklanjaju ćelijski debri [76]. Na početku MS i EAE dominira proinflamatorni M1 fenotip makrofaga i mikroglije, a zatim dolazi do konverzije u anti-inflamatorni M2 fenotip, stoga je M1/M2 balans potencijalna meta u prevenciji i terapiji MS [77].

Iako se smatra da T- i B-limfociti imaju ključnu ulogu u imunopatogenezi MS i druge ćelije imunskog sistema različitim i nedovoljno ispitanim mehanizmima doprinose inflamaciji i nastanku lezija u CNS. Urođenoubilačke ćelije (*engl.* natural killer, NK) i NKT ćelije ispoljavaju proinflamatornu i regulatornu ulogu u MS. Inflamatorne CD56<sup>dim</sup> NK ćelije su procentualno više zastupljene u perifernoj krvi pacijenata sa PPMS i SPMS u poređenju sa kontrolama [78]. Nasuprot tome, subpopulacija CD56<sup>bright</sup> NK ćelija sa regulatornim svojstvima je brojnija nakon terapije MS dimetil-fumaratom [79], IFN- $\beta$  [80] i daklizumabom (anti-CD25 monoklonsko antitelo) [81]. Potencijalni mehanizam kojim CD56<sup>bright</sup> NK ćelije suprimiraju patološki imunski odgovor u MS je indukcija apoptoze autoreaktivnih CD4<sup>+</sup> T-limfocita [82]. Tip I NKT limfocita u SPMS sekretuju proinflamatorne citokine karakteristične za Th1 (IFN- $\gamma$  i TNF) i Th17 (IL-17) [83]; tip II

NKT su prvi put identifikovane u inflamatornim lezijama obolelih od MS [84], dok su obe vrste NKT ćelija pokazale regulatorna svojstva u MS [85].



**Slika 1.** Zahvaljujući mehanizmima centralne tolerancije većina autoreaktivnih T-limfocita je eliminisana u timusu. Ipak, ovaj proces nije savršen, pa pojedini autoreaktivni T-limfociti odlaze na periferiju, gde mehanizmi periferne tolerancije kontrolišu ove ćelije. Ukoliko dođe do prekida u toleranciji, usled smanjene funkcije Treg i/ili povećane rezistencije efektorskih T- i B-limfocita, autoreaktivni T- i B-limfociti mogu biti aktivirani mehanizmima koji uključuju molekulska mimikriju, prezentaciju novih autoantigena i prepoznavanje sekvestriranih antigena CNS. Genetski i faktori spoljašnje sredine doprinose nastanku bolesti. Aktivirani CD8<sup>+</sup>T-limfociti, Th1 i Th17, B-limfociti i ćelije urođene imunosti infiltriraju CNS, dovode do inflamacije i oštećenja tkiva [12].



**Slika 2.** U ranom stadijumu bolesti ćelije imunskog sistema prolaze kroz KMB meningealnih krvnih sudova i infiltriraju parenhim CNS. Ćelije urođene i adaptivne imunosti sa periferije se mogu akumulirati u perivaskularnom prostoru i parenhimu CNS. Ove ćelije, zajedno sa aktiviranim rezidentnim ćelijama – mikroglijom i astrocitima, dovode do demijelinizacije i oštećenja neurona mehanizmima koji uključuju direktan ćelijski kontakt i oslobađanje solubilnih inflamatornih i neurotoksičnih medijatora [12].

## 1.2. Autofagija

### 1.2.1. Osnovni principi i mehanizmi regulacije

Autofagija podrazumeva sve procese u ćeliji kojima se citoplazmatski materijal doprema do lizozoma u kojima se razgrađuje. Može se podeliti na: mikroautofagiju, makroautofagiju i autofagiju posredovanu šaperonima [86]. Dok se u mikroautofagiji formira invaginacija membrane lizozoma, u autofagiji posredovanoj šaperonima ključnu ulogu imaju Hsc70 proteini (*engl.* heat shock cognate 70) [86]. Makroautofagija (u daljem tekstu - autofagija) je najznačajnija forma autofagije koja podrazumeva formiranje specifične vezikule - autofagozoma oko nepotrebnih i/ili oštećenih proteina i disfunkcionalnih ćelijskih organela i njihovu posledičnu razgradnju pomoću lizosomalnih enzima [87, 88]. Ovaj proces je vid adaptacije koji obezbeđuje energiju i omogućava preživljavanje ćelije u različitim nepovoljnim uslovima (nedostatak nutrijenata, oksidativni stres, hipoksija, oštećenje DNK). Novija istraživanja ukazuju na kompleksan odnos programirane ćelijske smrti - apoptoze, nekroze i autofagije koja može indukovati apoptozu ili predstavljati alternativni put ćelijske smrti, kako u fiziološkim, tako i u patološkim stanjima [89, 90]. Autofagija je regulisana produktima ATG gena (*engl.* autophagy related genes) [91] i može se opisati karakterističnim sledom faza: indukcija autofagije (u zavisnosti od stimulusa razlikujemo neselektivan i selektivan vid autofagije), stvaranje (nukleacija i elongacija) i sazrevanje autofagozoma, fuzija autofagozoma i lizozoma i razgradnja sadržaja [92].

**Indukcija.** U ćelijama sisara ključnu ulogu ima kompleks koji čine: homolog Atg1 - ULK (*engl.* Unc-51-like kinase) 1 ili 2, ATG13, RB1CC1/FIP200 (*engl.* RB1-inducible coiled-coil 1) i ATG101 koji se vezuje za ATG13 [93, 94]. ULK1/2-ATG13-RB1CC1 kompleks formira se nezavisno od nutritivnog statusa ćelije [95]. U uslovima dostupnosti nutrijenata glavni intracelularni metabolički senzor je MTORC1 (*engl.* mechanistic target of rapamycin complex 1) fosforiliše ULK1/2 i ATG13 i na taj način inhibira indukcionog kompleks. Deficit nutrijenata dovodi do disocijacije indukcionog kompleksa i MTORC1 čime se omogućava indukcija autofagije [95].

**Nukleacija.** Nukleacija vezikule podrazumeva nastajanje fosfatidilinozitol (PI) 3-fosfata pomoću kompleksa koji čine: katalitička subjedinica tipa 3 PI3 kinaze (PIK3C3)/VPS34, beclin-1 (BECN1), ATG14 i UVRAG (*engl.* UV irradiation resistance-associated tumor suppressor gene). U regulaciji nukleacije autofagozoma učestvuju

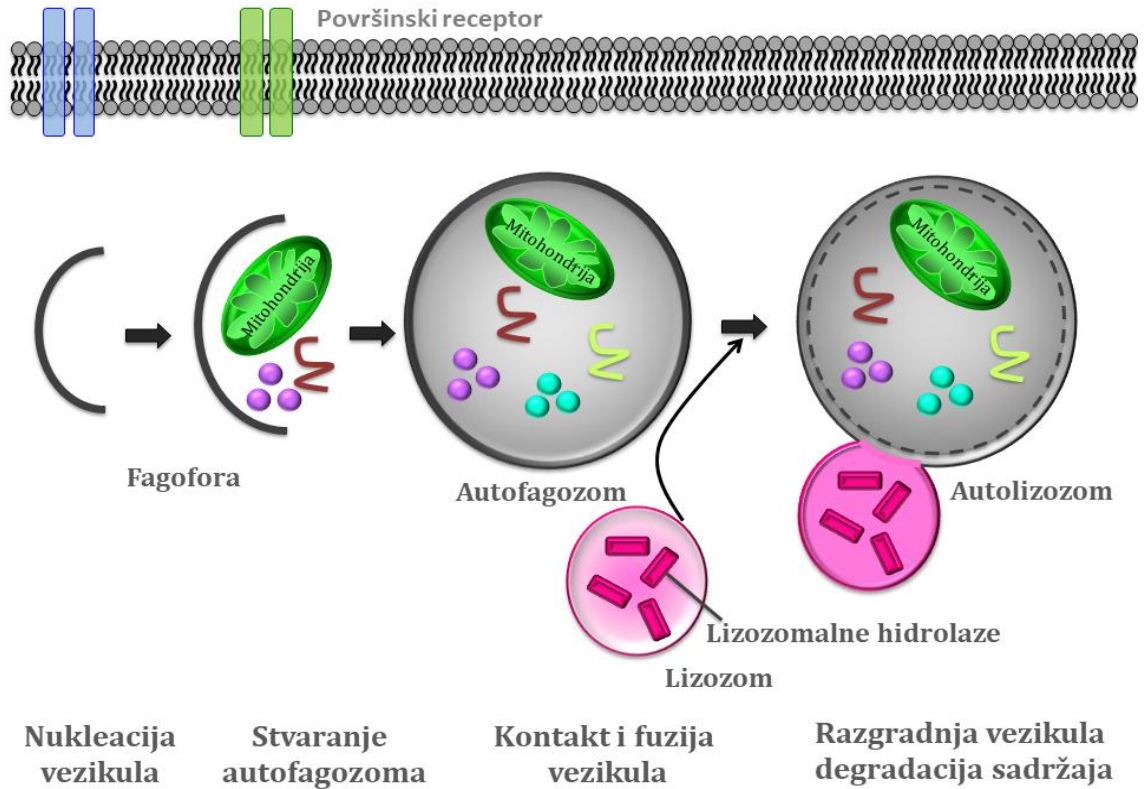
brojni proteini. Antiapoptotski protein BCL2 (*engl.* B-cell lymphoma 2) se vezuje za BECN1, dok Rubicon sprečava aktivnost PIK3C3 i na taj način inhibiraju autofagiju. Sa druge strane, BNIP 3 (*engl.* Bcl-2-related BH3-only protein) je inhibitor BCL2 koji u stanjima hipoksije indukuje autofagiju, a ovaj efekat se pojačava usled deficita nutrijenata [96]. AMBRA1 takođe pozitivno reguliše formiranje autofagozoma [97].

**Elongacija.** Ovaj korak zahteva aktivnost dva konjugaciona sistema slična enzimskim kompleksima koji učestvuju u ubikvitinaciji. Prvi sistem čine ATG7 koji ima funkciju E1 aktivirajućeg enzima i ATG10 koji funkcioniše kao E2 konjugujući enzim. Ova dva enzima omogućavaju kovalentno vezivanje ATG12 i ATG5 koji sa ATG16L1 formiraju kompleks sličan E3 ligazi. Sa druge strane, ATG4 seče LC3 (*engl.* microtubule-associated protein light chain 3) i nastaje LC3-I. LC3-I se potom preko ATG7 i ATG3 i E3 ligaze vezuje za fosfatidiletanolamin formirajući LC3-II koji se inkorporira u autofagozomalnu membranu. LC3 i GABARAP (*engl.* aminobutyric acid receptor-associated protein) koji učestvuje u maturaciji autofagozoma, su homolozi ATG8 kod sisara [98].

Fuzija autofagozoma i lizozoma nastaje nakon zatvaranja lipidne membrane zahvaljujući proteinu (sintaksin 17) koji se nalazi isključivo u spoljašnjem sloju membrane kompletno formiranih autofagozoma [99]. Fuzijom autofagozoma sa lizozomom nastaje autofagolizozom u kome se razgrađuje ubikvitinirani citoplazmatski materijal koji je u slučaju selektivne autofagije vezan za receptor – sekvastazom 1 (*engl.* sequestasome, SQSTM1/p62). Pošto je SQSTM1 specifični supstrat za autofagiju, postojanje defekta u autofagiji rezultira akumulacijom ovog proteina [86], koja se u neuronima može detektovati u formi inkluzionih tela [100]. SQSTM1 kao adapterski protein učestvuje u signalnim putevima koji omogućavaju preživljavanje ćelije, kao što je aktivacija nuklearnog faktora - kB (NF-kB), ali i u aktivaciji kaspaza i posledičnoj apoptozi [101]. Nivoi SQSTM1 se u kombinaciji sa analizom konverzije LC3-I u LC3-II koriste za procenu aktivnosti autofagije [102].

Ekspresija gena koji učestvuju u procesu autofagije regulisana je transkripcionim faktorima među kojima su najznačajniji FOXO (*engl.* Forkhead Box O) 1 i 3 i ATF4 (*engl.* activating transcription factor 4) [103]. Translokacija FOXO1 u nukleus povezana je sa transkripcionom aktivacijom ATG5, BECN1 [104], ATG14 [105] i PIK3C3 [106]. Pored toga, FOXO1 i u citosolnoj formi indukuje autofagiju, nezavisno od transkripcije [107]. U stanju hipoksije ATF4 direktno dovodi do povećane sinteze ULK1

iRNK [108], a indirektno povećava transkripciju ATG5 [109]. Ne treba zanemariti kontrolu autofagije na epigenetskom nivou koja pre svega podrazumeva modifikaciju histona [110].



**Slika 3.** Karakteristične faze u procesu autofagije [111].

### 1.2.2. Uloga autofagije u imunskom odgovoru i autoimunosti

Autofagija je značajna za adekvatno funkcionisanje kako urođenog tako i adaptivnog imunskog odgovora. Na nivou urođene imunosti autofagija predstavlja značajan efektorski mehanizam u odbrani od intracelularnih bakterija i virusa [112, 113]. U receptore za prepoznavanje molekulskih obrazaca patogena (*engl.* pattern recognition receptors, PRRs) pored TLR (*engl.* Toll-like receptors), NLR (*engl.* Nod-like receptors) i RLR (*engl.* RIG-like receptors) spadaju i autofagni adapterski proteini slični sekvostozomu-1 (sequestosome 1/ p62-like receptors, SLRs), koji predstavljaju vezu između autofagije i signalnih puteva u urođenoj imunosti [114]. Indukcija autofagije sprečava apoptozu monocita i dovodi do njihove diferencijacije u makrofage [115]. Autofagija ima potencijalno značajnu ulogu u M1/M2 polarizaciji makrofaga. Naime, ispitivanje makrofaga u aterosklerotskom plaku pokazalo je veći nivo autofagije u M2 tipu makrofaga [116]. Proces autofagije povezan je i sa produkcijom proinflamatornih citokina. Tako blok u autofagiji sa akumulacijom p62 u makrofagima aktivira inflamazom i produkciju IL-1 [117]. Tokom razvoja NK ćelija, autofagija indukovana vezivanjem FOXO1 za ATG7, omogućava eliminaciju oštećenih mitohondrija i preživljavanje nezrelih NK ćelija [118]. Ova funkcija autofagije je narušena delecijom ATG5 što rezultira akumulacijom oštećenih mitohondrija i ROK i apoptozom NK ćelija [119]. Delecija ATG5 ili ATG7 takođe negativno utiču na broj zrelih NKT ćelija, posebno onih koje proizvode IFN- $\gamma$  [120, 121].

Uloga autofagije u adaptivnoj imunosti je višestruka. U epitelnim ćelijama timusa visok konstitutivni nivo autofagije omogućava prezentaciju antigena CD4<sup>+</sup> T-limfocitima i selekciju klonova, što je centralni mehanizam u nastanku imunološke tolerancije [122]. Takođe, pokazano je da autofagija reguliše aktivaciju, preživljavanje i homeostazu T-limfocita [123]. U procesu autofagije razgrađuju se proapoptotski proteini čime se omogućava preživljavanje T-limfocita [124]. Jedan od ključnih proteina u elongaciji autofagozoma, ATG5, neophodan je ne samo za preživljavanje, već i adekvatnu proliferaciju T-limfocita nakon stimulacije T-ćelijskog receptora (TCR) [125]. Povećana ekspresija ATG5 gena i proteina u ćelijama krvi miševa sa EAE bila je u korelaciji sa stepenom onesposobljenosti [126]. Kod obolelih od MS detektovan je povišen nivo ATG5 iRNK i proteina u T-limfocitima izolovanim iz periferne krvi i u T-limfocitima moždanog tkiva imunohistochemijskom analizom post-mortem u odnosu na



zdrave kontrolne osobe. Međutim, ova razlika u ekspresiji iRNK za ATG5 se ne uočava u uzorcima pune krvi [126]. Pokazano je da stepen autofagije kod miša varira u različitim fazama nakon aktivacije CD8<sup>+</sup> T-limfocita: autofagija je snižena u fazi proliferacije, a indukovana neposredno pre kontrakcije imunskog odgovora. Iako delecija ATG5 i ATG7 u ovim ćelijama nije uticala na proliferativnu sposobnost i efektorske funkcije, bila je narušena diferencijacija u memorijske CD8<sup>+</sup> T-limfocite [127]. Smatra da je u osnovi disfunkcije memorijskih CD8<sup>+</sup> T-limfocita snižena autofagija. Snižen nivo autofagije i smanjen broj memorijskih ćelija karakteristični su za fenomen imunološkog starenja [128]. Autofagija ima značajnu ulogu u održavanju homeostaze regulatornih T-limfocita, čija funkcija je često narušena u autoimunskim bolestima [129, 130]. Delecija ATG7 ili ATG5 u Treg indukuje povećanu apoptozu i samim tim smanjenu stabilnost ove ćelijske linije [129]. Selektivna delecija ATG16L1 indukuje intestinalnu inflamaciju u odgovoru na mikrobiotu usled gubitka FoxP3<sup>+</sup> Treg i ekspanzije Th2 ćelija u mukozi. Razlika u odgovoru Treg i Th2 na blok u autofagiji objašnjava se specifičnostima metabolizma glukoze Th2 ćelija [131].

Novija istraživanja ukazuju na ulogu autofagije u T-limfocitima obolelih i od drugih autoimunskih bolesti. Autofagija ispoljava proinflamatorni efekat tako što dovodi do rezistencije na apoptozu i hiperaktivacije T-limfocita kod obolelih od reumatoidnog artritisa (RA) [132]. Sa druge strane, autofagija suprimira Th9 ćelije [133] koje indukuju kolitis kod miša [134] i detektovane su u povišenom broju u mukozi pacijenata sa inflamatornom bolešću creva (*engl.* inflammatory bowel diseases, IBD) [135]. Ne može se zanemariti ni uloga ATG5 u preživljavanju B-limfocita tokom sazrevanja u kostnoj srži i održavanju pojedinih subpopulacija B-limfocita na periferiji [136]. Pokazano je da EBV indukcijom autofagije u B-limfocitima sprečava proteolitičku razgradnju MOG epitopa i dovodi do njihove prezentacije u sklopu HLA-E molekula citotoksičnim T-limfocitima [137]. U ovom primeru autofagija predstavlja vezu između EBV, poznatog etiološkog faktora u nastanku MS i antigen-prezentujuće funkcije B-limfocita u indukciji celularnog imunskog odgovora na MOG, jednog od najznačajnijih antigena u indukciji demijelinizacije [138].

Dok povišen stepen autofagije korelira sa (neuro)inflamacijom, blok u ovom procesu doprinosi neurodegeneraciji, koja ima značajno mesto u patogenezi MS. Tako deficit ATG5 dovodi do abnormalne intracelularne akumulacije proteina i posledičnog gubitka neurona [100]. Podaci o ulozi autofagije u MS su vrlo oskudni. U T-limfocitima sa

periferije i u CNS pacijenata sa aktivnom RRMS pokazana je povišena ekspresija ATG5, koja u ovoj studiji nije uočena na nivou MNČPK [126]. Iako su Igci i sar. pokazali da je ekspresija pojedinih gena koji regulišu autofagiju u MNČPK povećana kod obolelih od MS u poređenju sa zdravim kontrolama, nije ustanovljeno koji ćelijski tip je odgovoran za tu razliku [139]. Takođe, do sada nije ispitivana povezanost ekspresije gena koji regulišu autofagiju i gena za citokine koji učestvuju u patogenezi MS.

## **2. Ciljevi**

1. Utvrditi nivoe ekspresije gena za regulatore autofagije (*ATG7, ATG10, ATG5, ATG4B, ATG3, ATG13, ATG8A, ATG14, SQSTM1, BCL2, ULK1, BNIP3, FOXO1, FOXO3, VPS34, BECN1, ATF4*) i proinflamatorne citokine (*TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17* i *GM-CSF*) u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i njihovim subpopulacijama (*CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> i CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>*) pacijenata sa multiplom sklerozom i zdravih kontrola.
2. Utvrditi aktivnost autofagije merenjem koncentracije proteina LC3 i SQSTM1 u mononuklearnim ćelijama periferne krvi i njihovim subpopulacijama pacijenata sa multiplom sklerozom i zdravih kontrola.
3. Utvrditi da li postoji povezanost između nivoa ekspresije ispitivanih gena i proteina sa demografskim parametarima pacijenata i kliničkim pokazateljima težine bolesti.

### **3.Materijal i metode**

### 3.1. Ispitanici

Grupu pacijenata su činili 50 uzastopnih novoobolelih od MS uzrasta iznad 18 godina lečenih na Klinici za neurologiju Kliničkog centra Srbije (KCS), sa potvrđenom dijagnozom MS prema McDonald-ovim kriterijumima (2001.) [5], koji nisu bili na terapiji imunomodulatornim i/ili imunosupresivnim lekovima. Kriterijum za uključenje - novooboleli pacijenti sa MS, dok je kriterijum za isključenje upotreba lekova koji modifikuju prirodni tok bolesti i steroidne terapije u protekla tri meseca od trenutka uzimanja uzorka periferne krvi. U trenutku uzimanja uzorka procenjivala se težina kliničke slike određivanjem EDSS skora [18]. Kontrolnu grupu je činilo 50 zdravih dobrovoljaca, uparenih po godinama i polu sa ispitanicima iz grupe pacijenata, koji imaju normalan nalaz na neurološkom pregledu, bez neuroloških deficita u medicinskoj dokumentaciji. Demografske i kliničke karakteristike pacijenata i zdravih kontrola prikazane su u Tabeli 1. Svaki od ispitanika je detaljno obavešten o cilju studije i potpisao je dobrovoljan pristanak za učestvovanje u njoj. Anonimnost i privatnost pacijenata i zdravih kontrola bila je zagarantovana u skladu sa lekarskom tajnom. Podaci o ispitanicima vođeni su anonimno u protokolima pod rednim brojem. Studija je izvedena u skladu sa etičkim standardima Helsinške deklaracije (revidirana verzija iz 1983. godine) i u skladu sa pravilima Etičkog komiteta Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (MFUB) (Odluka br. 29/VII-8).

**Tabela 1.** Demografske i kliničke karakteristike pacijenata i zdravih kontrola.

		MS	Kontrole
Pol	Ženski	35	37
	Muški	15	13
Starost (godine)		41,9± 11,3	38,6± 11,0
EDSS skor		2,5 (3,5)	

EDSS skor je prikazan kao medijana sa interkvartilnim opsegom.

### 3.2. Uzimanje uzoraka

Uzorci pune krvi (30 ml) su uzimani u Vacutainer® epruvete (Becton Dickinson, Plymouth, UK) sa EDTA kao antikoagulansom od svih ispitanika na Klinici za neurologiju KCS. Potom su transportovani do Laboratorije za imunologiju Instituta za mikrobiologiju i imunologiju MFUB gde su dalje obrađivani. Uzorci su uzeti pre uključivanja pacijenta u bilo koji terapijski protokol.

### 3.3. Izolacija mononuklearnih ćelija periferne krvi

Izolacija MNČPK vršena je centrifugiranjem na gustinskom gradijentu upotrebom Lymphoprep™ (Axis Shield, Oslo, Norway). Na 3 ml gustinskog gradijenta u staklenoj epruveti nanošeno je 10 ml krvi u kontinuiranom mlazu niz zid epruvete kako ne bi došlo do mešanja. Gradijent sa krvlju je centrifugiran na 800g 20 minuta na 21°C uz minimalno ubrzanje, bez kočnice. Izdvojene MNČPK su dalje oprane prvo PBS-om, potom RPMI medijumom. MNČPK su zatim korišćene za izolaciju RNK, pripremu za imunoblot analizu ili resuspendovane u puferu za bojenje (HBSS bez  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  sa dodatkom 2% fetalnog goveđeg seruma) u gustini do  $1 \times 10^7$  ćelija/ml za sortiranje na protočnom citofluorimetru.

### 3.4. Sortiranje ćelija

Za sortiranje ćelija na osnovu ekspresije površinskih markera korišćen je protočni citofluorimetar i sorter FACS Aria III (BD Biosciences, San Diego, USA) i komercijalno dostupna monoklonska antitela: anti-CD3 PerCP (Serotec, Puchheim, Germany), anti-CD4 FITC (BD Biosciences, San Diego, USA) i anti-CD19 PE (Serotec, Puchheim, Germany). Kalibracija instrumenta je izvršena korišćenjem CST kuglica (BD™ Cytometer Setup and Tracking beads, 1 kap iz bočice u 350µl PBS) i CST opcije u okviru FACSDiva softvera. Višestruko bojenje ćelija sa dva ili više fluorescentno obeležena monoklonska antitela zahtevalo je prethodnu kompenzaciju fluorescentnih signala zbog preklapanja emisionih spektara fluorescentnih boja korišćenih u eksperimentu. Nakon akvizicije signala dobijenih od ćelija obojenih pojedinačnim fluorescentnim antitelima, kompenzacija je izračunata pokretanjem opcije za automatsko kompenzovanje u okviru FACSDiva softvera. Za bojenje MNČPK (prosečno  $2 \times 10^7$  ćelija po ispitaniku) korišćeno je

0,2 µg/ml svakog antitela u 0,5 ml pufera za bojenje. Nakon 30 minuta inkubacije na 4°C ćelije su oprane i resuspendovane u puferu za bojenje (gustina  $1 \times 10^7$ /ml). Ćelije su sortirane na osnovu ekspresije površinskih markera koristeći FSC/SSC dijagram za identifikaciju MNĀPK, a FSC-A/FSC-W dijagram za isključenje dubleta, dok su različite subpopulacije limfocita određene kao CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> i CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>. Dobijene subpopulacije ćelija su korišćene za izolaciju RNK ili pripremu za imunoblot analizu.

### 3.5. Određivanje genske ekspresije

#### 3.5.1. Izolacija RNK

Ukupna RNK je izolovana iz MNĀPK i sortiranih subpopulacija MNĀPK (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>, CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) korišćenjem RNeasy Protect Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) prema uputstvu proizvođača. Ukratko, proces je podrazumevao sledeće korake: liziranje ćelija RLT puferom, precipitaciju RNK 70% etanolom, vezivanje RNK za silikatnu kolonu, uklanjanje soli i nečistoća RW1 i RPE puferom i eluciju sa kolone dodavanjem destilovane vode. Nakon izolacije RNK određena je čistoća i količina prečišćene RNK merenjem apsorbancije na 230, 260, 280 i 320 nm na Gene Quant spektrofotometru (ThermoFisher Scientific, Waltham, USA). Integritet izolovane RNK je proveren elektroforezom na 1% agaroznom gelusa dodatkom 0,5 µg/ml etidijumbromida (Gibco, ThermoFisher Scientific, Waltham, USA).

#### 3.5.2. Reverzna transkripcija

Za reverznu transkripciju korišćeno je 400 ng (CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup>), 500 ng (CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup>) i 1 µg (CD3<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>) RNK. Korišćena je reverzna transkriptaza Moloney mišjeg virusa leukemije (*engl.* Moloney Murine Leukemia Virus, M-MuLV) sa heksamerima nasumične sekvence, dezoksinukleotid-trifosfatima i inhibitorom RNKaze (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) prema uputstvu proizvođača u finalnoj zapremini od 20 µl. Po uzorku je dodavano 1,5 µl smeše koja je sadržala 1 µl heksamera nasumične sekvence i 0,5 µl 25 mM dezoksinukleotid-trifosfata. Uzorci su stavljeni u termoblok (Eppendorf, Hamburg, Germany) zagrejan na 70°C 10 minuta kako bi se eliminisale sekundarne strukture. Zatim je, nakon hlađenja i centrifugiranja uzoraka 2 minuta na ledu, dodato 4,5 µl smeše (4 µl pufera i 0,5 µl inhibitora RNKaze) i na kraju 1 µl reverzne transkriptaze po uzorku, pri čemu je nastavkom promešana cela reakciona



smeša. Uzorci su vraćani u termoblok na temperaturu od 25°C 15 minuta. Nastavak programa reverzne transkripcije je podrazumevao sledeće korake: 42°C 1h, 70°C 10 minuta i 95°C 3 minuta. Na ovaj način dobijena cDNK je čuvana na +4°C do upotrebe u reakciji lančanog umnožavanja.

### 3.5.3. Reakcija lančanog umnožavanja (PCR) u realnom vremenu (kvantitativni PCR, qPCR)

Za detekciju i analizu ekspresije gena za *ATF4*, *ATG3*, *ATG4B*, *ATG5*, *ATG7*, *ATG10*, *ATG13*, *ATG14*, *BCL2*, *BECN1*, *BNIP3*, *FOXO1*, *FOXO3*, *GABARAP*, *GM-CSF*, *IFN- $\gamma$* , *IL-17A*, *PIK3C3*, *SQSTM1*, *TNF*, *ULK1* i 18S ribozomalna RNK (*RN18S*) korišćen je TaqMan princip detekcije upotrebom komercijalno dostupnih smeša oligonukleotida i fluorescentno obeleženih proba (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA, Tabela 2). Amplifikacija cDNK qPCR metodom vršena je prema preporukama proizvođača testova. Amplifikacija je rađena u duplikatu u Realplex2 PCR aparatu (Eppendorf, Hamburg, Germany) pomoću komercijalnog reagensa (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) u finalnoj zapremini od 5  $\mu$ l u optičkim pločama sa 96 mesta (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Zapremina od 5  $\mu$ l se sastojala od 2,8  $\mu$ l reakcione smeše (2,5  $\mu$ l 2 x MasterMix i 0,3  $\mu$ l Taqman probe i prajmera za testirani gen) i 2,2  $\mu$ l odgovarajućeg uzorka. Reakcione smeše bez uzorka kao i uzorci su pipetirani upotrebom programabilnog automatskog dispnzera tečnosti epMotion 5070 (Eppendorf, Hamburg, Germany). Reakcija je započinjala inicijalnom denaturacijom na 95°C 4 min, zatim je sledilo 40 ciklusa: denaturacija na 95°C 15s, vezivanje prajmera za DNK i elongacija 1 min na 60°C. Prag analize ciklusa (*engl.* cycle of treshold, Ct) za sve gene osim referentnog je određen CalQplex algoritmom, dok je Ct za referentni gen određen manuelno tako što je prag detekcije fluorescence podešen na 600 jedinica. Relativna ekspresija gena je izražena kao kao  $2^{-\Delta Ct}$ , pri čemu se  $\Delta Ct$  dobija kada se od prosečne Ct vrednosti duplikata ciljnog gena oduzme prosečna Ct vrednost duplikata referentnog gena (18S ribozomalna RNK).

**Tabela 2.** Kataloški brojevi komercijalnih eseja.

Gen	Applied Biosystems® Assay kataloški broj
<i>ATF4</i>	Hs00909569_g1
<i>ATG3</i>	Hs 00223937_m1
<i>ATG4B</i>	Hs00367088_m1
<i>ATG5</i>	Hs00169468_m1
<i>ATG7</i>	Hs00197348_m1
<i>ATG10</i>	Hs009197718_m1
<i>ATG13</i>	Hs00207186_m1
<i>ATG14</i>	Hs00208732_m1
<i>BCL2</i>	Hs00608023_m1
<i>BECN1</i>	Hs00186838_m1
<i>BNIP3</i>	Hs00969291_m1
<i>FOXO1</i>	Hs01054576_m1
<i>FOXO3</i>	Hs00921424_m1
<i>GABARAP</i>	Hs00925899_g1
<i>GM-CSF</i>	Hs00929873_m1
<i>IFN-<math>\gamma</math></i>	Hs00174143_m1
<i>IL-17A</i>	Hs00174383_m1
<i>PIK3C3</i>	Hs00176908_m1
<i>SQSTM1</i>	Hs00177654_m1
<i>TNF</i>	Hs00174128_m1
<i>ULK1</i>	Hs00177504_m1
<i>RN18S</i>	Hs03928985_g1

### 3.6. Imunoblot analiza (Western blot)

Aktivnost autofagije je ispitivana imunoblot analizom, pomoću koje je detektovana promena nivoa ekspresije proteina karakterističnih za autofagiju (LC3, SQSTM1, ATG5) nakon elektroforetskog razdvajanja proteina. Kao primarna antitela (At) korišćena su zečja At specifična za LC3, SQSTM1 i ATG5, dok je kao sekundarno At korišćeno kozje At specifično za zečji IgG. Za vizualizaciju korišćen je ChemiDoc sistem i ImageLab softver (BioRad, Hercules, USA) [140]. Čelije su lizirane na ledu u sveže pripremljenom puferu za lizu ćelija uz dodatak inhibitora proteaza i fosfataza (RIPA, 1mM PMSF, 20 µl/ml koktela proteaznih inhibitora Roche, 2mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> i 50 mM NaF). Potpuno liziranje ćelija je postignuto inkubacijom ćelijske suspenzije 15 minuta na ledu, uz povremeno snažno mešanje na vorteksu. Lizati su zatim centrifugirani (14000g, 15 minuta, 4°C), a supernatanti, koji su predstavljali ukupan ćelijski ekstrakt, su čuvani na -80°C do upotrebe. Koncentracija totalnih proteina u lizatu ćelija iz kojih je rađena imunoblot analiza je određivana BCA metodom (Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Princip ovog testa zasniva se na redukciji Cu<sup>2+</sup> u Cu<sup>1+</sup> pod dejstvom cisteina, triptofana ili tirozina što se kolorimetrijski detektuje upotrebom alkalnog rastvora bikinoične kiseline. Test je izvođen mešanjem 190 µl smeše reagensa A i B (odnos 1:50) sa 10 µl uzorka (1:5 razblaženje proteina). Nakon 30 minuta očitavana je absorbanca na talasnoj dužini od 595 nm i koncentracija proteina u uzorku je izračunata u odnosu na standardnu krivu. Standardna kriva je dobijena korišćenjem rastvora poznatih koncentracija BSA u opsegu od 12,5 µg/ml do 2 mg/ml.

Uzorci za elektroforezu su pripremljeni kuvanjem (5 minuta, 100°C) određene zapremine ukupnog ćelijskog ekstrakta sa odgovarajućom zapreminom redukujućeg pufera za pripremu uzorka (finalne koncentracije sastojaka pufera nakon kuvanja uzorka su bile: 2% SDS, 10% glicerol, 2mM 2-merkaptetanol, 0,002% bromfenol plavo, 62,5mM Tris-HCl, pH 6,8). U ovom koraku proteini su denaturisani i obloženi negativno naelektrisanim SDS molekulima. Dodatkom 2-merkaptetanola u pufer sprečeno je formiranje disulfidnih veza u denaturisanim proteinima. Zahvaljujući SDS svi proteini u uzorku postali su negativno naelektrisani i razlikovali su se međusobno samo po molekulskim masama. Proteini iz skuvanih uzoraka su zatim razdvojeni na osnovu razlika u molekulskim masama elektroforezom u 12% poliakrilamidnom gelu. U bunare su sipane jednake količine proteina (20µg). Uzorci su nanošeni na gel za sabijanje

proteina (4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125M Tris-HCl, pH 6,8), koji je prethodno naslojen na gel za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0,34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0,41% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375M Tris-HCl, pH 8,8). Kao katalizatori polimerizacije gelova korišćeni su 0,05% amonijumpersulfat i 0,033% TEMED. Pufer za rezervoare u kojem je tekla elektroforeza se sastojao od 192 mM glicina, 0,1% SDS i 25mM Tris-HCl, pH 8,3. Elektroforetsko razdvajanje je trajalo oko 90 minuta pri konstantnom naponu. Prvih 20 minuta primenjivan je konstantni napon od 100 V, a nakon prolaska uzoraka kroz gel za sabijanje proteina, napon je povećan na 150 V. Uzorci su putovali kroz gel do izlaska fronta boje bromfenol plavo sa gela. U cilju određivanja molekulskih težina na svaki gel je naneta i smeša referentnih proteina poznatih molekulskih masa (10-250 kDa, Precision Plus Protein™ Dual Color Standards; BioRad, Hercules, USA). Po završetku elektroforeze proteini sa gela su odmah transferisani na nitrocelulozne membrane (Hybond C; GE Healthcare, Little Chalfont, UK) pomoću aparature za polusubi transfer (semi-dry transfer unit, BioRad, Hercules, USA). Nitrocelulozne membrane su inkubirane 1-2 minuta u anoda II puferu za transfer (25mM Tris pH 10,4) i postavljene u aparaturu na 3 visoko adsorbujuća filter papira, 2 prethodno natopljena u anoda I (300mM Tris pH 10,4) i 1 natopljen u anoda II transfer puferu. Gelovi su isprani malom količinom katodnog pufera (25mM Tris, 3% glicin pH 9,4) i postavljeni pažljivo na membrane, a preko gela su smeštena još tri visoko adsorbujućeg filter papira natopljena katodnim puferom. Membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi čime je omogućeno da pod dejstvom struje konstantne jačine (0,8mA/cm<sup>2</sup> membrane) negativno naelektrisani proteini putuju sa gela ka pozitivnoj elektrodi. Na putu ka anodi proteini su se vezivali za membranu. Transfer se odvijao na sobnoj temperaturi i trajao je ukupno 90 minuta. Po završetku transfera delovi membrane sa proteinima od interesa su inkubirani 60 minuta na sobnoj temperaturi u 5% rastvoru odmašćenog mleka u Tris puferu (20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6) sa 0,05% Tween 20 deterdženta (u kasnijem tekstu TBST). Na taj način su blokirana nespecifična mesta vezivanja proteina na membranama. Membrane su potom inkubirane sa odgovarajućim primarnim antitelom preko noći na temperaturi od 4 °C uz blago mešanje, pri čemu su se antitela vezivala za odgovarajuće proteinske epitope. Korišćena su sledeća razblaženja zečijih antitela u 5% rastvoru BSA u TBST: 1:500 za anti-LC3 i anti-ATG5, 1:2000 za SQSTM1 i 1:2000 za anti-β-aktin (svi iz Cell Signaling Technology, Beverly, MA, USA). Nakon 3 ispiranja u TBST-u trajanju od 5 minuta,

membrane su inkubirane sa sekundarnim antitelom, anti-zečijim IgG konjugovanim sa peroksidazom rena (Jackson IP Laboratories, West Grove, PA), 75 minuta na sobnoj temperaturi. Po isteku inkubacije membrane su ponovo isprane 3 puta i prelivane 1 minut sa poboljšanim hemiluminiscentnim reagensom (GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Peroksidaza, koja je vezana za sekundarno antitelo je razgrađivala  $H_2O_2$  iz supstrata do kiseonika i vode. Kiseonik je reagovao sa luminolom iz supstrata uz nastanak 3-aminofalata, koji je emitovao foton. Relativna optička gustina imunoreaktivnih traka LC3-II, ATG5 i SQSTM1 proteina u odnosu na aktin kvantifikovana je denzitometrijom korišćenjem ImageLab softvera.

### 3.7. Statistička analiza

Normalnost raspodele podataka je proverena Shapiro–Wilk testom. Pošto podaci nemaju normalnu raspodelu za utvrđivanje statistički značajne povezanosti primenjen je Spearman-ov koeficijent korelacije. Za testiranje nulte hipoteze primenjen je neparametarski Mann-Whitney test. Procena normalnosti distribucije podataka, mere deskriptivne statistike i Mann-Whitney test su urađeni primenom programa Statistical Package for the Social Sciences – SPSS (IBM, version 15.0, Armonk, NY, USA). U svim testovima vrednosti verovatnoće  $p$  manje od 0,05 smatrane su značajnima. Za pravljenje grafika su korišćeni SPSS i GraphPad Prism (GraphPad Software Inc, version 6 La Jolla, CA, USA).

## **4.Rezultati**

#### 4.1. **Razlika u ekspresiji gena koji regulišu autofagiju u MNČPK pacijenata sa MS i zdravih kontrola nije statistički značajna**

Kako bismo utvrdili ulogu autofagije i gena koji regulišu njeno odvijanje inicijalno smo u MNČPK pacijenata sa MS i zdravih kontrola analizirali ekspresiju iRNK koja kodira proteine značajne za različite faze procesa autofagije. Ispitali smo relativne nivoe ekspresije gena koji učestvuju u formiranju autofagozoma (ATG13, ULK1), nukleaciji (ATG14, BECN1, PIK3C3) i elongaciji vezikule (ATG3, ATG4B, ATG5, ATG7, ATG10, GABARAP), obeležavanju proteina za degradaciju u autofagolizozomima (SQSTM1), transkripcionoj aktivaciji (ATF4, FOXO1, FOXO3) i regulaciji autofagije (BCL2, BNIP3). Relativna ekspresija navedenih gena je ispitivana u MNČPK. Ove ćelije su nakon izdvajanja iz pune krvi korišćene za izolaciju RNK, koja je potom prevođena u cDNK u reakciji reverzne transkripcije. Relativni nivo ekspresije gena je određen PCR metodom u realnom vremenu.

Poređenjem relativne ekspresije gena koji regulišu autofagiju u MNČPK nije nađena statistički značajna razlika između pacijenata sa MS i zdravih kontrola (Tabela 3). Dakle, iz prikazanih rezultata možemo da zaključimo da autofagija i proteini koji regulišu njeno odvijanje nisu promenjeni u MNČPK pacijenata sa MS u odnosu na zdrave kontrole.

**Tabela 3.** Ekspresija gena koji regulišu autofagiju u MNČPK pacijenata sa MS (n=20) i zdravih kontrola (n=20).

iRNK	Kontrole	MS	p vrednost
<b>ATF4</b>	7,10 (10,32)	10,76 (8,92)	0,317
<b>ATG3</b>	1,21 (1,62)	1,21 (0,77)	0,834
<b>ATG4B</b>	1,87 (2,70)	2,36 (1,24)	0,417
<b>ATG5</b>	0,52 (0,72)	0,53 (0,45)	0,974
<b>ATG7</b>	2,25 (2,69)	2,45 (1,19)	0,753
<b>ATG10</b>	0,14 (0,16)	0,14 (0,11)	0,763
<b>ATG13</b>	1,25 (1,54)	1,76 (1,63)	0,304
<b>ATG14</b>	0,30 (0,34)	0,35 (0,33)	0,450
<b>BCL2</b>	1,66 (3,57)	1,75 (1,77)	0,960
<b>BECN1</b>	1,03 (1,48)	1,42 (1,42)	0,116
<b>BNIP3</b>	0,33 (0,61)	0,39 (0,40)	0,825
<b>FOXO1</b>	1,40 (2,49)	1,79 (1,48)	0,525
<b>FOXO3</b>	1,55 (1,83)	1,61 (1,79)	0,597
<b>GABARAP</b>	7,95 (10,60)	13,01 (10,52)	0,095
<b>PI3KC3</b>	0,52 (0,72)	0,58 (0,45)	0,960
<b>SQSTM1</b>	7,13 (8,20)	10,76 (8,92)	0,311
<b>ULK1</b>	0,81 (1,17)	0,78 (0,56)	0,918

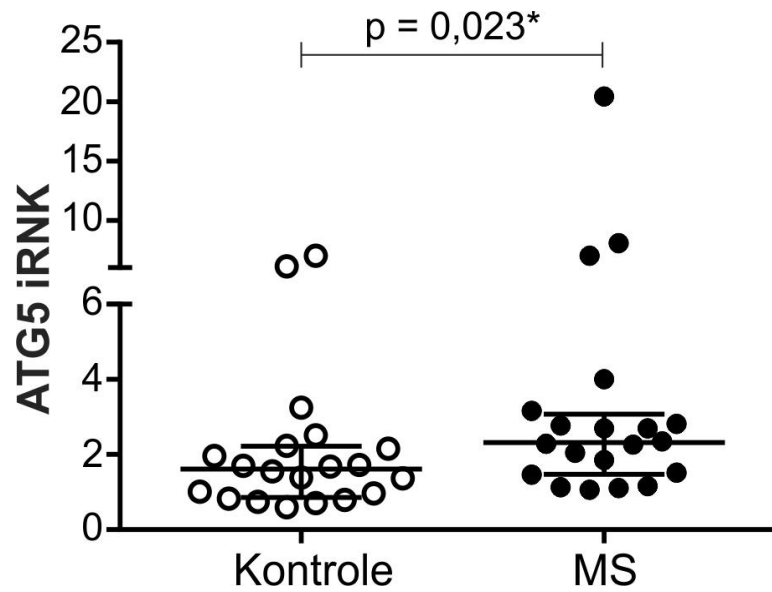
Relativna ekspresija gena koji regulišu autofagiju u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^6$ . Rezultati su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom.



#### 4.2. Ekspresija ATG5 iRNK je selektivno povišena u T-limfocitima obolelih od MS

Pretpostavili smo da subpopulacije MNČPK mogu da imaju različit nivo ekspresije gena koji regulišu autofagiju i da bi pacijenti mogli da imaju različitu ekspresiju u odnosu na kontrolne osobe na nivou pojedinih subpopulacija. Imajući u vidu da bi se razlika u ekspresiji gena koji regulišu autofagiju u pojedinačnim populacijama limfocita pacijenata sa MS i kontrola mogla izgubiti ukoliko se ekspresija gena analizira na nivou ukupnih MNČPK, dalje smo analizirali gensku ekspresiju navedenih regulatora autofagije u različitim subpopulacijama limfocita. Da bi se izdvojile subpopulacije limfocita, MNČPK izolovane iz pune krvi bile su obeležene antitelima za odgovarajuće površinske markere (anti-CD3, anti-CD4 i anti-CD19) i razdvojene na protočnom citometru kao sledeće subpopulacije: CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> i CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> ćelije. Nakon razdvajanja subpopulacije limfocita su korišćene za izolaciju RNK, koja je potom prevedena u cDNK reverznom transkripcijom. Usled procentualno manje zastupljenosti CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> T-limfocita i CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B-limfocita u perifernoj krvi uspeli smo da izolujemo dovoljno RNK za analizu svih 17 gena samo iz CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> subpopulacije T-limfocita.

Analiza relativne ekspresije gena koji kodiraju regulatore autofagije pokazala je da je, za razliku od MNČPK, u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima obolelih od MS ekspresija ATG5 bila statistički značajno povišena u poređenju sa zdravim kontrolama (Slika 4, Tabela 4), dok statistički značajna razlika u ekspresiji ostalih gena između dve grupe ispitanika nije uočena (Tabela 4). Analizom relativne ekspresije iRNK za ATG5 u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> T-limfocitima utvrđeno je da je nivo relativne ekspresije iRNK za ATG5 statistički visoko značajno viši kod obolelih od MS u poređenju sa zdravim kontrolama (Slika 5). Nasuprot tome, ekspresija iRNK za ATG5 u CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B-limfocitima MS pacijenata bila je nešto niža u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika (Slika 6). Iako ova razlika nije dostigla statističku značajnost, moguće je da doprinosi izostanku značajno povišene ekspresije u MNČPK. Na osnovu prikazanih rezultata možemo da zaključimo da je nivo ekspresije iRNK povišen u T-limfocitima pacijenata sa MS u odnosu na iste ćelije zdravih kontrolnih osoba.

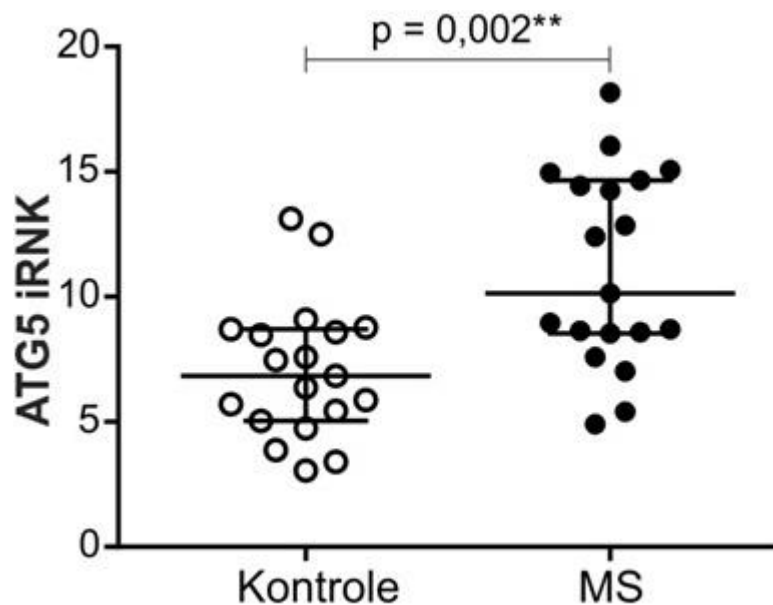


**Slika 4.** Ekspresija ATG5 iRNAK u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-ćelijama pacijenata sa MS (n=20) i kontrolnih ispitanika (n=20). Nivoi ATG5 iRNAK određeni su RT-qPCR metodom (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg). Relativna ekspresija ATG5 iRNAK u odnosu na 18S RNAK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^6$  (\*označava statističku značajnost  $p < 0,05$ ).

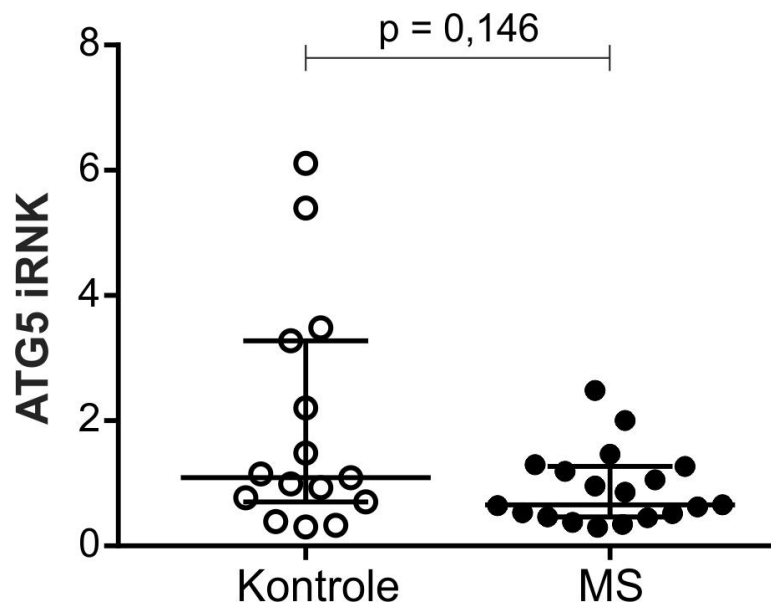
**Tabela 4.** Ekspresija gena koji regulišu autofagiju u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS (n=20) i zdravih kontrola (n=20).

iRNK	Kontrole	MS	p vrednost
<b>ATF4</b>	16,02 (42,21)	22,58 (25, 8)	0,449
<b>ATG3</b>	1,71 (1,19)	2,37 (3,99)	0,105
<b>ATG4B</b>	5,80 (3,86)	6,98 (7,46)	0,337
<b>ATG5</b>	1,67 (1,35)	2,32 (1,60)	0,023*
<b>ATG7</b>	1,08 (1,14)	1,53 (2,28)	0,250
<b>ATG10</b>	0,28 (0,20)	0,35 (0,48)	0,262
<b>ATG13</b>	2,67 (4,84)	3,31 (3,63)	0,425
<b>ATG14</b>	0,49 (0,26)	0,64 (0,76)	0,298
<b>BCL2</b>	8,02 (8,57)	12,53 (19,79)	0,140
<b>BECN1</b>	2,17 (1,38)	2,90 (1,37)	0,256
<b>BNIP3</b>	2,19 (2,37)	2,55 (4,55)	0,465
<b>FOXO1</b>	5,97 (8,90)	8,08 (6,32)	0,825
<b>FOXO3</b>	1,88 (2,07)	2,25 (2,83)	0,387
<b>GABARAP</b>	6,88 (5,03)	10,18 (4,59)	0,101
<b>VPS34</b>	1,07 (0,77)	1,40 (1,47)	0,268
<b>SQSTM1</b>	9,39 (7,02)	8,52 (3,80)	0,387
<b>ULK1</b>	1,25 (1,08)	1,82 (2,44)	0,155

Relativna ekspresija gena koji regulišu autofagiju u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^6$ . Rezultati su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom (\* označava statističku značajnost  $p < 0,05$ ).



**Slika 5.** Ekspresija ATG5 iRNK u CD3+CD4<sup>-</sup> T-ćelijama pacijenata sa MS (n=19) i kontrolnih ispitanika (n=19). Nivoi ATG5 iRNK određeni su RT-qPCR metodom (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg). Relativna ekspresija ATG5 iRNK u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^7$  (\*\* označava visoku statističku značajnost  $p < 0,01$ ).



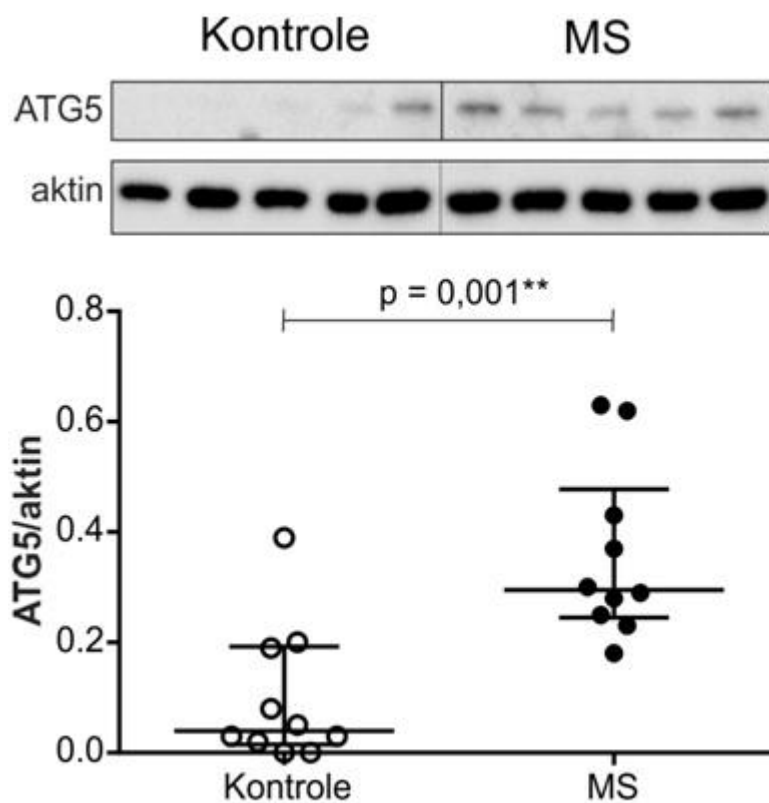
**Slika 6.** Ekspresija ATG5 iRNK u CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B-ćelijama pacijenata sa MS (n=19) i kontrolnih ispitanika (n=15). Nivoi ATG5 iRNK određeni su RT-qPCR metodom (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg). Relativna ekspresija ATG5 iRNK u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^6$ .

#### 4.3. Povišena ekspresija ATG5 u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS nije povezana sa indukcijom autofagije

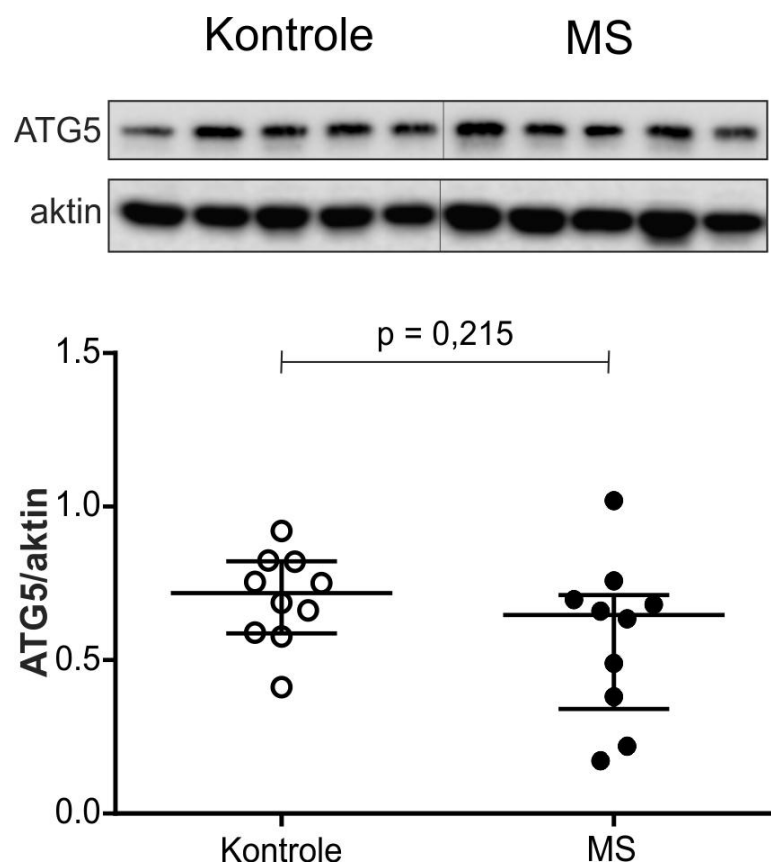
Imajući u vidu statistički visoko značajno povišenu ekspresiju iRNK za ATG5, jednog od glavnih regulatora formiranja autofagozoma, u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima obolelih od MS, analizirali smo ekspresiju ATG5 i na nivou proteina, kao i stepen aktivnosti bazalne autofagije u MNČPK i CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS i zdravih kontrola. MNČPK i CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfociti su nakon izolacije iz pune krvi pacijenata sa MS i zdravih kontrola lizirani i pripremljeni za imunoblot analizu. Kao markeri autofagije korišćeni su: konverzija solubilne, citosolne LC3-I u membransku LC3-II formu, deo autofagozoma, i ekspresija SQSTM1 koji se degradira u autofagolizozomima [141].

Primenom imunoblot tehnike, u skladu sa nalazom za iRNK za ATG5, nađen je i statistički visoko značajno povišen nivo ATG5 proteina u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima (Slika 7), ali ne i u MNČPK (Slika 8) obolelih od MS u poređenju sa zdravim kontrolama. Važno je napomenuti da nivo ATG5 proteina nismo bili u mogućnosti da odredimo zbog niskog prinosa u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima nakon sortiranja ćelija. Međutim, nivoi LC3-II i SQSTM1 se nisu značajno razlikovali u MNČPK (Slika 9) pacijenata sa MS i kontrola. Sličan rezultat je dobijen i analizom nivoa u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima (Slika 10). Dakle, prikazani rezultati nedvosmisleno ukazuju na sličnu aktivnost bazalne autofagije u ispitivanim populacijama ćelija.

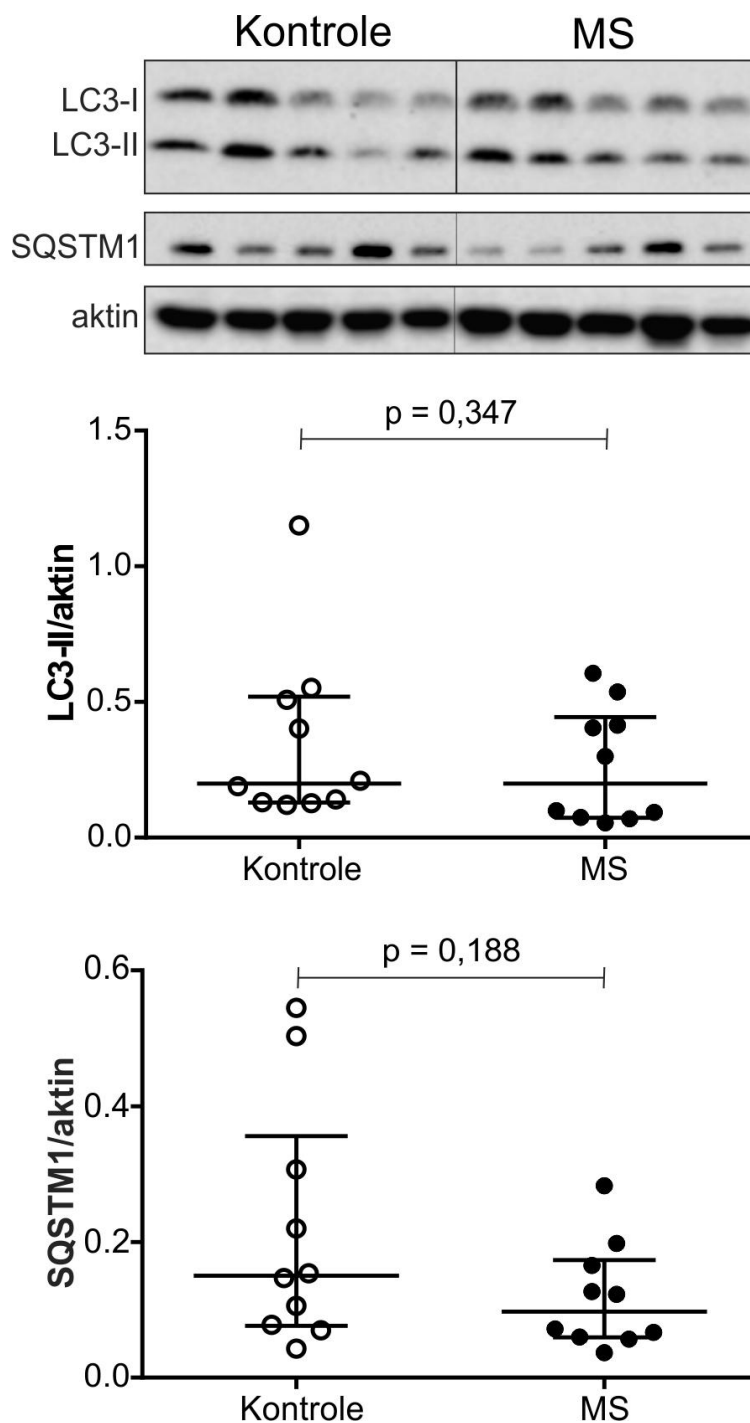
Ovi rezultati jasno ukazuju na povećanu ekspresiju ATG5 na nivou iRNK praćenu povećanom ekspresijom na nivou proteina u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima obolelih od MS, koja nije praćena porastom aktivnosti autofagije.



**Slika 7.** Ekspresija ATG5 proteina određena je imunoblot metodom u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>T-ćelijama pacijenata sa MS (n=10) i kontrola (n=10). Prikazani su reprezentativni blotovi i denzitometrijska analiza nivoa proteina izraženih u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg; \*\* označava visoku statističku značajnost,  $p < 0,01$ ).

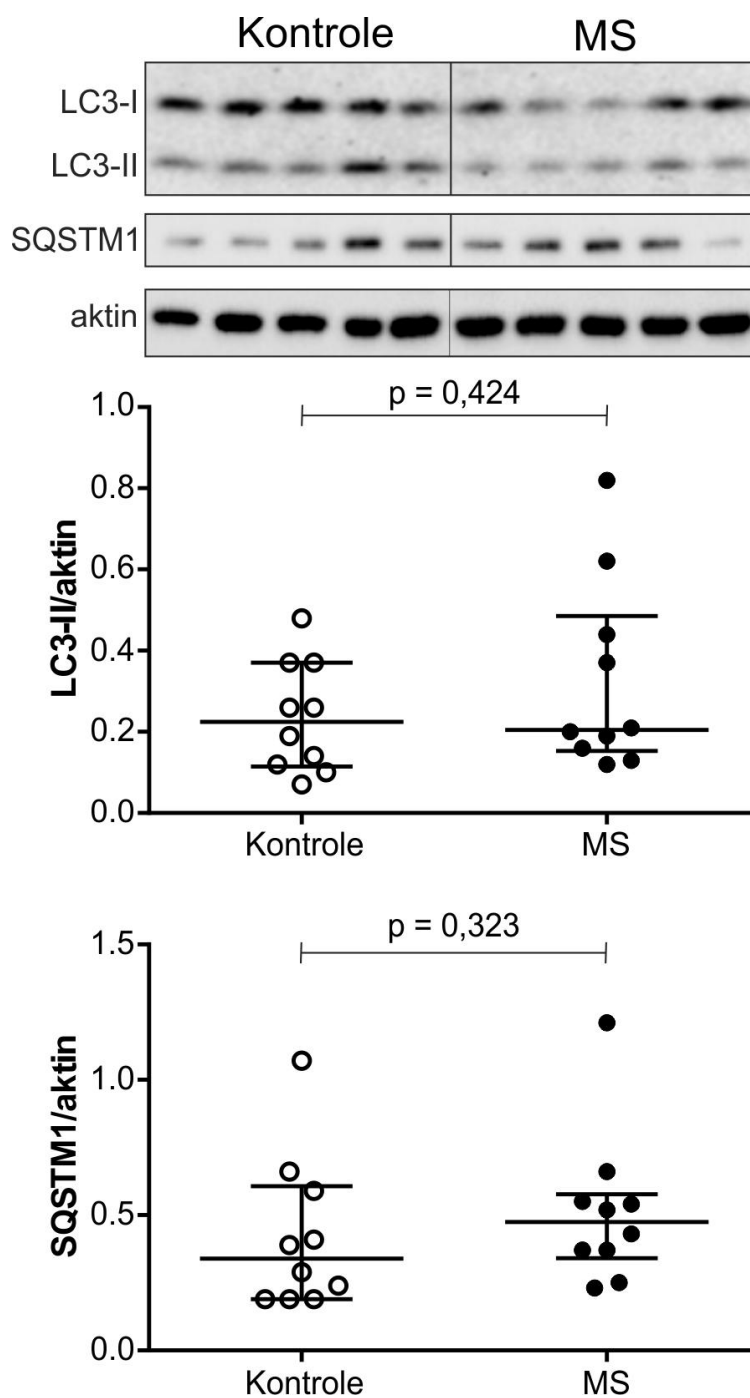


**Slika 8.** Ekspresija ATG5 proteina određena je imunoblot metodom u MNČPK pacijenata sa MS (n=10) i kontrola (n=10). Prikazani su reprezentativni blotovi i denzitometrijska analiza nivoa proteina izraženih u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg).



**Slika 9.** Nivoi bazalne autofagije u MNČPK pacijenata sa MS (n=10) i kontrolnih ispitanika (n=10). Konverzija LC3 i nivoi SQSTM1 određeni su imunoblot metodom. Prikazani su reprezentativni blotovi i denzitometrijska analiza nivoa proteina izraženih u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg).

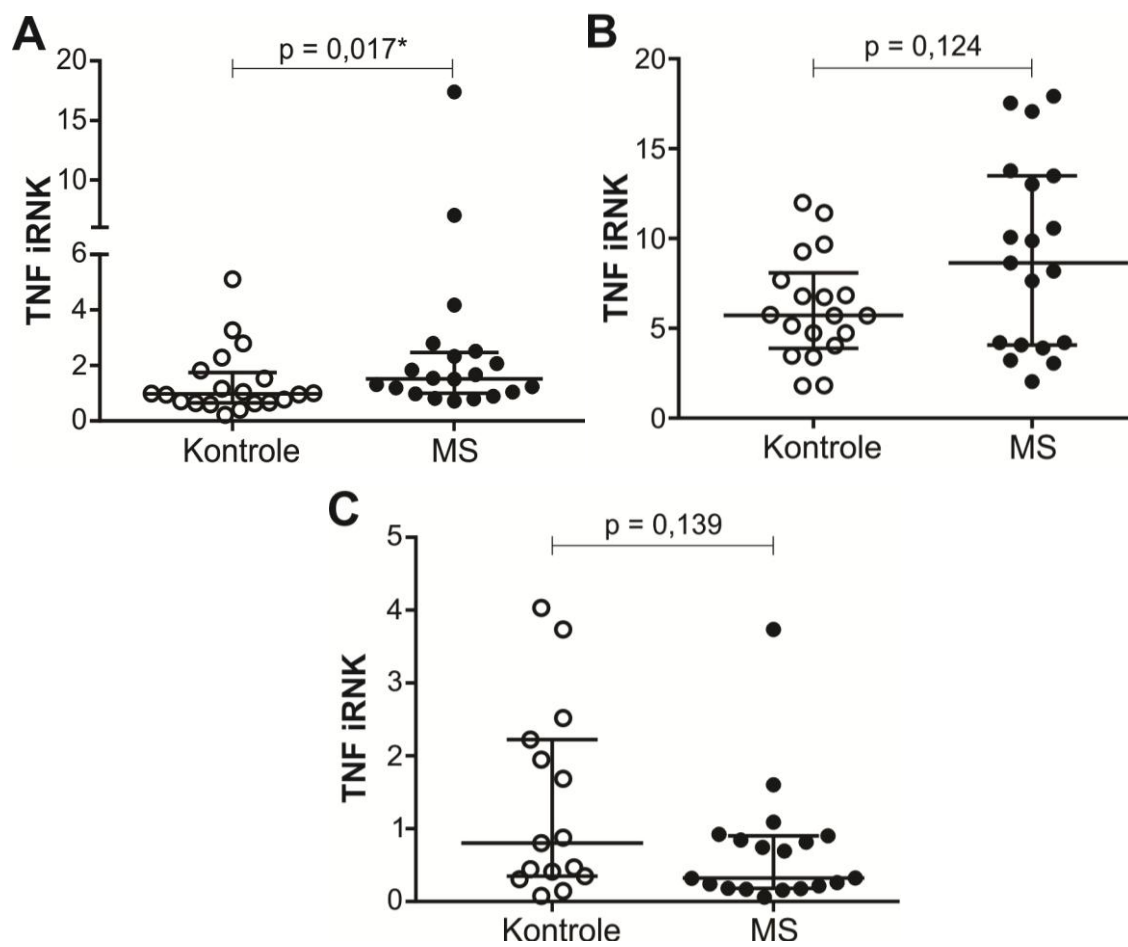




**Slika 10.** Nivoi bazalne autofagije u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-ćelijama pacijenata sa MS (n=10) i kontrolnih ispitanika (n=10). Konverzija LC3 i nivoi SQSTM1 određeni su imunoblot metodom. Prikazani su reprezentativni blotovi i denzitometrijska analiza nivoa proteina izraženih u odnosu na količinu aktina u odgovarajućem uzorku (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg).

#### 4.4. Ekspresija TNF iRNK je povišena u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima

Važna uloga CD4<sup>+</sup> T-limfocita u patogenezi MS ogleda se u produkciji citokina, među kojima se izdvajaju citokini sa dominantno proinflamatornim dejstvom: TNF, IFN- $\gamma$ , IL-17 [17] i GM-CSF [41]. U razdvojenim populacijama limfocita nakon izolacije RNK i prevođenja u cDNK, relativna ekspresija proinflamatornih citokina određena je RT-qPCR metodom. Pokazano je da su nivoi iRNK koja kodira TNF bili statistički značajno povišeni u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima (Slika 11A) kod pacijenata sa MS u odnosu na zdrave kontrolne osobe, dok u populacijama CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> T-limfocita (Slika 11B) i CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B-limfocita (Slika 11C) nije uočena statistički značajna razlika u nivoima relativne ekspresije iRNK za TNF između ove dve grupe ispitanika. Međutim, nivoi iRNK ( $2^{-\Delta Ct}$ ) za IFN- $\gamma$ , IL-17 i GM-CSF u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS nisu se značajno razlikovali od nivoa detektovanih kod kontrolnih ispitanika (Tabela 5).



**Slika 11.** Ekspresija TNF iRNA u sortiranim CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T (A), CD3<sup>+</sup>CD4<sup>-</sup> T-ćelijama (B) i CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B-ćelijama (C) iz MNČPK pacijenata sa MS (n=20, n=19, n=19, redom) i kontrola (n=20, n=19, n=15) kvantifikovana RT-qPCR metodom (linije predstavljaju medijanu i interkvartilni opseg). Relativna ekspresija TNF iRNA u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^7$  (\* označava statističku značajnost).

**Tabela 5.** Ekspresija gena za proinflamatorne citokine u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS i zdravih kontrola.

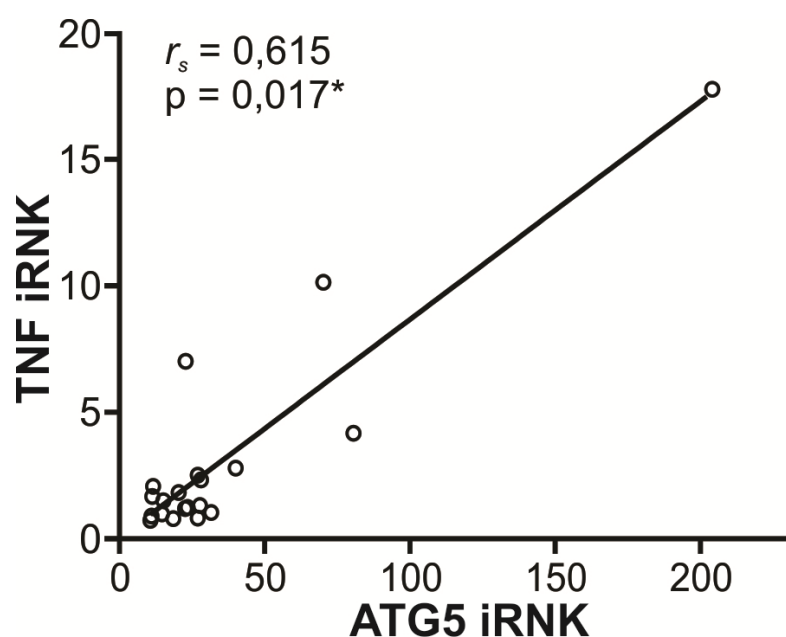
iRNA	Kontrole	MS	p vrednost
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	1,9 (0,5)	2,6 (2,1)	0,148
<b>IL-17</b>	3,5 (2,5)	2,5 (3,8)	0,705
<b>GM-CSF</b>	5,7 (3,5)	5,7 (7,8)	0,810

Relativna ekspresija gena za proinflamatorne citokine u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^6$ . Rezultati su prikazani kao medijana sa interkvartilnim opsegom.

#### 4.5. Korelacija ATG5 iRNK sa proinflamatornim citokinima

Poznato je da ATG proteini, pored regulacije procesa autofagije, mogu da imaju i druge plejotropne uloge. Pošto povišeni nivoi ATG5 iRNK nisu pokazali povezanost sa indukcijom autofagije, korišćenjem statističkih testova za analizu korelacije ispitali smo eventualnu povezanost sa ekspresijom proinflamatornih citokina značajnih u patogenezi MS.

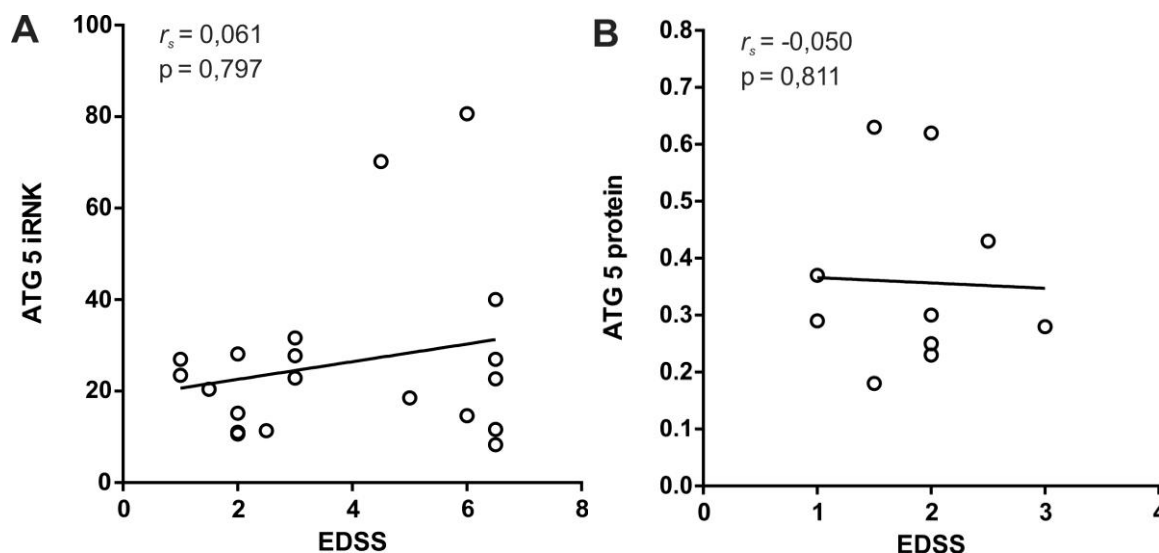
Rezultati su pokazali da postoji statistički značajna pozitivna korelacija između ekspresije iRNK za TNF i ATG5 u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T- limfocitima MS pacijenata (Slika 12). Nasuprot tome, u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS uočena je pozitivna korelacija nivoa iRNK za ATG5 i IFN- $\gamma$  koja nije dostigla nivo statističke značajnosti ( $r_s = 0,491$ ,  $p = 0,150$ ). Slično, u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima nije uočeno da nivoi iRNK za IL-17 ( $r_s = 0,357$ ,  $p = 0,385$ ), kao ni nivoi iRNK za GM-CSF ( $r_s = 0,353$ ,  $p = 0,318$ ) značajno korelišu sa nivoima iRNK za ATG5.



**Slika 12.** Korelacija između ekspresije iRNK za ATG5 i TNF u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-ćelijama pacijenata sa MS. Relativna ekspresija ATG5 i TNF iRNK u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^7$  (\* označava statističku značajnost).

#### 4.6. Korelacija ATG5 iRNK sa stepenom onesposobljenosti obolelih od MS

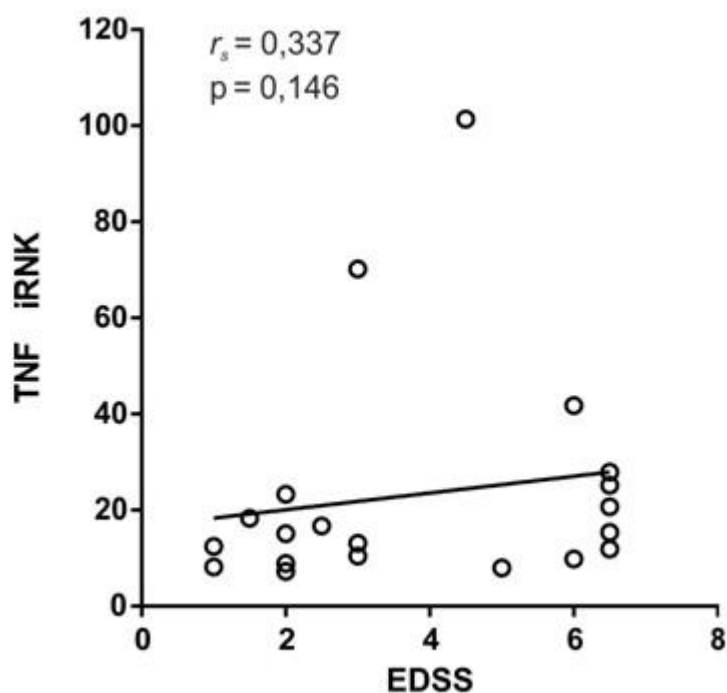
Pored analize povezanosti sa ekspresijom proinflammatoryh citokina, ispitavali smo i povezanost ekspresije ATG5 sa EDSS skorom, kao kliničkim pokazateljem stepena onesposobljenosti povezane sa MS. Nije nađena statistički značajna korelacija EDSS skora sa ekspresijom ATG5 na nivou iRNK (Slika 13A) i proteina u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS (Slika 13B).



**Slika 13.** Korelacija između EDSS i ekspresije ATG5 na nivou iRNK (A) i proteina (B) u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-ćelijama pacijenata sa MS. Relativna ekspresija ATG5 iRNK u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^7$ .

#### 4.7. Korelacija TNF iRNK sa stepenom onesposobljenosti obolelih od MS

S obzirom da nije uočena statistički značajna korelacija između EDSS skora kao pokazatelja težine bolesti i ekspresije ATG5 na nivou iRNK i proteina, analizirali smo eventualnu povezanost EDSS skora sa ekspresijom TNF iRNK u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-limfocitima obolelih od MS. Takođe, ni relativna ekspresija iRNK za TNF nije korelisala sa EDSS skorom (Slika 14).



**Slika 14.** Korelacija između EDSS i ekspresije iRNK za TNF u CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T-ćelijama pacijenata sa MS. Relativna ekspresija TNF iRNK u odnosu na 18S RNK prikazana je kao vrednost  $2^{-\Delta Ct}$  pomnožena sa  $10^7$ .

## **5.Diskusija**

U ovoj doktorskoj disertaciji je analizirana ekspresija gena za proteine koji regulišu autofagiju i za citokine za koje se pretpostavlja da imaju značajnu ulogu u patogenezi MS i to u MNČPK i subpopulacijama limfocita obolelih od MS i kontrolnih ispitanika. Pored toga, u MNČPK i CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS i kontrola ispitivana je aktivnost bazalne autofagije, odnosno konverzija LC3 i nivoi SQSTM1 i ATG5 proteina. Uobičajeni uzorci u studijama koje analiziraju ekspresiju gena i proteina kod obolelih od MS su periferna krv i likvor, iz kojih mogu da se izdvajaju MNČPK i ćelijske subpopulacije. Imajući u vidu da je jedan od ciljeva ovakvih analiza identifikacija potencijalnih biomarkera bolesti i posledično što šira primenljivost u neurološkoj praksi, dostupnost uzoraka i neinvazivnost u postupku uzimanja istih se ne sme zanemariti. U tom smislu, uzorci periferne krvi imaju prednost, iako likvor bliže oslikava procese u samom CNS. Iako je dosad za sve tipove imunskih ćelija periferne krvi pokazano da bar delom imaju ulogu u patogenezi MS, korišćenje mešovite populacije ćelija, kao što je MNČPK, može da ublaži razlike u obrascu ekspresije onih subpopulacija koje se smatraju ključnim u patogenezi i progresiji bolesti. Stoga je ispitivanje ekspresije gena i proteina u subpopulacijama limfocita značajna prednost dizajna naše studije. Ipak, usled smanjene procentualne zastupljenosti CD8<sup>+</sup> T-limfocita i B-limfocita u poređenju sa CD4<sup>+</sup> T-limfocitima u perifernoj krvi svih ispitanika, u ovim populacijama ćelija nije bilo moguće ispitati ekspresiju svih gena i proteina analiziranih u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima.

Igci i sar. detektovali su različitu ekspresiju nekoliko regulatora autofagije, uključujući ULK1, BCL2 i FOXO1 koji su ispitivani u našoj studiji, u MNČPK MS pacijenata i kontrola [139]. U našoj studiji nije uočena razlika u ekspresiji ovih gena, ni na nivou MNČPK, ni u sortiranim populacijama ćelija. Očigledno neslaganje u rezultatima se može pripisati razlikama u dizajnu studija, pri čemu u našem istraživanju oboleli od MS nisu bili uključeni u imunosupresivni/imunomodulatorni terapijski protokol i analiziran je manji broj ispitanika. Kriterijum isključivanja pacijenata pod terapijom značajan je zbog sposobnosti terapeutika (IFN- $\beta$ , metilprednizolon, dimetil fumarat i antidepresiva) da modulišu proces autofagije [142-148]. Pri tom, neki od lekova koji se koriste u terapiji MS mogu da indukuju, a neki da inhibiraju autofagiju. Interferon- $\beta$ , kao jedna od najznačajnijih terapijskih opcija u RRMS, indukuje autofagiju i posledično ima antiapoptotski efekat na tumorske ćelije [142]. Suprotno, metilprednizolon inhibicijom autofagije i apoptoze pokazuje neuroprotektivna svojstva [143, 144]. Dimetil fumarat pored inhibicije autofagije utiče na smanjenu produkciju ROS i apoptozu u



oligodendrocitima [146]. S obzirom na heterogenost pacijenata sa MS u pogledu primljene terapije (u cilju lečenja osnovne bolesti i depresije) postavlja se pitanje da li se razlika u ekspresiji ispitivanih gena koju navode Igci i sar. [139] može pripisati samoj bolesti i/ili dejstvu lekova na proces autofagije. Imajući u vidu uticaj lekova korišćenih u terapiji MS na modulaciju autofagije, poređenje ekspresije autofagnih gena pre i nakon različitih terapijskih protokola moglo bi doprineti boljem razumevanju ovih kompleksnih interakcija. Naši rezultati pokazuju slične nivoe SQSTM1 i stepena konverzije LC3 kod obolelih od MS i kontrola, pa se može zaključiti da bazalna autofagija ipak nije izmenjena u T-limfocitima MS pacijenata.

U našem istraživanju ekspresija ATG5 je bila povišena u CD4<sup>+</sup> i CD4<sup>-</sup> (CD8<sup>+</sup>) T-limfocitima, ali ne i u MNČPK i B-limfocitima pacijenata sa MS u poređenju sa zdravim kontrolama. Povišena ekspresija ATG5 u navedenim subpopulacijama limfocita najverovatnije nije bila povezana sa indukcijom autofagije, s obzirom da nisu uočene promene u ekspresiji ostalih gena koji regulišu autofagiju i proteina (LC3 i SQSTM1) koji se koriste kao eksperimentalni pokazatelji aktivnosti samog procesa. Da bi se precizno procenila aktivnost autofagije neophodno je da se odredi autofagni fluks koji je definisan kao stepen degradacije autofagozoma [141]. U našoj i velikom broju drugih studija, LC3 konverzija (LC3-I u LC3-II) detektovana imunoblot tehnikom korišćena je za monitoring autofagije zato što je količina LC3-II u korelaciji sa brojem autofagozoma. Međutim, LC3-II se razgrađuje u procesu autofagije, pa se povišen nivo LC3 može javiti ne samo zbog indukcije autofagije već i usled postojanja bloka u ovom procesu. Da bi se utvrdilo da li postoji indukcija ili blok u autofagiji, određuje se autofagni fluks poređenjem nivoa LC3-II sa i bez inhibitora lizolomalnih proteaza [149]. Iako postoje brojne metode za određivanje autofagnog fluksa u ćelijskim kulturama [150] (pri čemu svaka metoda ima svoje prednosti i ograničenja), u ovom trenutku ne postoji ni jedan metod za adekvatno merenje autofagnog fluksa i monitoring autofagije u humanim uzorcima ex vivo [141]. Takođe, za određivanje aktivnosti autofagije prati se i nivo ekspresije autofagnog receptora SQSTM1 koji se selektivno razgrađuje u autofagozomima. Odsustvo promene u intracelularnoj koncentraciji SQSTM1, kao što je to bio slučaj sa kontrolnim i MS uzorcima u našoj studiji, ukazuje na neizmenjenu aktivnost autofagnog fluksa [141].

Pokazano je da su povećano preživljavanje i proliferacija T-limfocita povezani sa pojavom relapsa i progresijom MS [151]. Imajući u vidu važnu ulogu autofagije u aktivaciji i homeostazi T-limfocita [152] ne iznenađuje podatak da deficit ATG5 (koji je

zajedno sa ATG12 i ATG16 ključan u formiranju autofagozoma [153]) u T-limfocitima miša dovodi do njihove smanjene proliferacije i preživljavanja u *in vivo* uslovima [154]. Povrh toga, povišena ekspresija ATG5 uočena je u T-limfocitima miša sa EAE, kao i u T-limfocitima sa periferije i u CNS pacijenata sa aktivnom RRMS [126]. Naši rezultati ističu selektivno povećanu ekspresiju ATG5 na nivou iRNK (CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfociti) i proteina (CD4<sup>+</sup> T-limfociti), pri čemu nije detektovan porast autofagije u ovim ćelijskim populacijama. Postoji sve više podataka o plejotropnoj ulozi ATG proteina koja nije direktno vezana za učesće u odvijanju procesa autofagije [155]. Imajući u vidu evolutivnu konzerviranost autofagije [97], opravdano je očekivati da uloge ATG proteina nezavisne od autofagije koje su otkrivene na animalnim modelima postoje i kod čoveka. Uloga ATG5 nezavisno od procesa autofagije je predmet brojnih istraživanja. Na primer, pokazano je da ATG5 CD4<sup>+</sup> T-limfocita ima ulogu u odbrani od patogena tako što utiče na produkciju IL-2 i IFN- $\gamma$  u odgovoru na *Toksoplazmu gondi* [156]. Pored toga, ATG5 u aktiviranim makrofagima omogućava eliminaciju ovog parazita, nezavisno od formiranja autofagozoma [157]. Takođe, deficit ATG5 u neutrofilima, nezavisno od uticaja na odvijanje autofagije, doveo je do povećane osetljivosti miševa na infekciju izazvanu *Mycobacterium tuberculosis*, dok je uticaj ostalih gena koji regulišu autofagiju na preživljavanje inficiranih miševa bio zanemarljiv [158]. Pored toga, ATG5 negativno reguliše signalne puteve nishodno od TLR i IL-1R tako što mehanizmima nezavisnim od autofagije sprečava formiranje agregata adapterskog proteina MyD88 (*engl.* myeloid differentiation primary response 88) [159]. U T-limfocitima, ali i u drugim ćelijskim tipovima, pod dejstvom lekova koji oštećuju DNK (npr. cisplatin), dolazi do povećane ekspresije ATG5. Ovako indukovana povećana ekspresija ATG5, nezavisno od autofagije, dovodi do brojnih posledica: zastoja u G2 ili M fazi ćelijskog ciklusa, abnormalne mitoze (sa formiranjem multijedarnih ćelija) i prolongirane smrti ćelije. Smatra se da ATG5 izaziva ove efekte nakon translokacije u nukleus i vezivanja za survivin i BIRC5 [160, 161]. Interesantno je da je survivin, anti-apoptotski protein, selektivno povišen u T-limfocitima obolelih od PPMS, ali ne i u drugim formama bolesti [162]. S obzirom da su u našoj studiji analizirani uzorci novodijagnostikovanih pacijenata bilo bi interesantno napraviti longitudinalnu studiju u kojoj bi se pratio odnos ATG5 i survivina u daljem toku razvoja bolesti kod istih pacijenata. Uloga ATG5 u indukciji apoptoze, nezavisno od autofagije, tipa ćelije i apoptotskog stimulusa, bazirana je na post-translacionoj modifikaciji ovog proteina. Naime, nakon modifikacije u citosolu (pod dejstvom proteaza

kalpain 1 i 2) fragment ATG5 ulazi u mitohondrije, vezuje se za antiapoptotski protein Bcl-xl, dovodi do oslobađanja citohroma C i aktivacije kaspaza [163]. Sa druge strane, pokazano je da inhibicija kalpaina i proteolitičke modifikacije ATG5 indukuje autofagiju [164]. Interesantno je da osim indukcije apoptoze preko citohroma C, ATG5 sa ATG12 i indukcijom autofagije može pokrenuti drugi oblik ćelijske smrti. Tako je vezivanje ATG5 za FADD (*engl.*Fas-associated protein with death domain) praćeno konverzijom LC3-I u LC3-II u ćelijskoj smrti koju indukuje IFN- $\gamma$  [165]. Dakle, imajući u vidu povišenu ekspresiju ATG5 u T-limfocitima pacijenata sa MS u našoj studiji i različite uloge ATG5 u citoplazmi (elongacija autofagozoma, signalni putevi), jedru (interakcije sa proteinima koji regulišu apoptozu) i mitohondrijama (oslobađanje citohroma C) potrebno je detaljnije ispitati potencijalne funkcije ATG5 u (auto)imunosti.

Ekspresija gena za transkripcione faktore FOXO1 i 3 i ATF4 u našoj studiji je bila nešto viša u MNČPK i CD4<sup>+</sup> T-limfocitima pacijenata sa MS u poređenju sa kontrolnim ispitanicima, ali ova razlika nije dostigla statističku značajnost. Aktivnost ovih transkripcioih faktora i njihova uloga u regulaciji autofagije nije određena isključivo na nivou iRNK koja je analizirana u našem istraživanju. Naime, aktivnost proteina iz FOXO familije zavisi od njihove lokalizacije u različitim ćelijskim odeljcima, npr. FOXO1 se nakon fosforilacije translocira u nukleus i utiče na ekspresiju ATG gena [104]. Pored toga, postoje i drugi transkripcioni faktori koji mogu uticati na ekspresiju ATG gena, a nisu bili predmet ispitivanja u našoj studiji. Pokazano je da na ekspresiju ATG5, osim FOXO1 i ATF4 [166] utiču i izoforma proteina p63 [167], GATA-1 [168] i drugi transkripcioni faktori. Iako je regulacija transkripcije, koja je ispitivana i u našoj studiji, ključna u modulaciji autofagije, ne treba zanemariti ni druge mehanizme kao što su: post-transkripciona kontrola (preko mikro-RNK), post-translacione modifikacije (fosforilacija i ubikvitinacija) i epigenetska kontrola autofagije (acetilacija i metilacija histona) [169]. U ATG5 identifikovano je više ciljnih mesta upravo za fosforilaciju i ubikvitinaciju ovog proteina [170].

Za razliku od T-limfocita, u našem istraživanju ekspresija iRNK za ATG5 u CD3<sup>-</sup>CD19<sup>+</sup> B-limfocitima MS pacijenata bila je nešto niža u poređenju sa kontrolnom grupom ispitanika. Pengo i sar. su takođe ukazali na niži nivo autofagije u CD19<sup>+</sup> B-limfocitima u poređenju sa plazmocitima (CD19<sup>-</sup>), koji predstavljaju terminalni stadijum u diferencijaciji ove populacije limfocita. Uočeno je da ATG5 omogućava održavanje homeostaze plazmocita prvenstveno na nivou endoplazmatskog retikuluma i da deficit

ATG5 dovodi do neadekvatne sekrecije antitela [171]. Osim toga, autofagija je, kao i kod T-limfocita, važna za preživljavanje memorijskih B-limfocita [172]. Snižena ekspresija ATG5 u B-limfocitima može oslikavati niži nivo bazalne autofagije, koji je već pokazan u CD19<sup>+</sup> ćelijama i/ili ukazivati na jedinstvenu ulogu povišenih nivoa ATG5 u T-limfocitima. Moguće je da u našim rezultatima snižena ekspresija ATG5 u B-limfocitima doprinosi izostanku značajno povišene ekspresije u MNČPK. Pored B-limfocita i druge populacije ćelija koje pripadaju MNČPK (monociti, NK i NKT ćelije), a nisu analizirane u našoj studiji, mogu uticati na ukupnu ekspresiju ATG5.

Analiza rezultata naše studije je pokazala da je ekspresija ATG5 u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima bila u pozitivnoj korelaciji sa ekspresijom TNF, ukazujući na potencijalni značaj ATG5 u proinflamatornoj ulozi T-limfocita u patogenezi MS. Ipak, nedovoljno ispitana protektivna uloga TNF u MS nameće oprez u tumačenju rezultata. Različiti efekti koji se pripisuju TNF delimično se mogu objasniti postojanjem solubilne forme citokina sa proinflamatornom, i transmembranske forme sa neuroprotektivnom ulogom [173]. TNF pokazuje anti-inflamatorna svojstva vezivanjem za odgovarajuće receptore (TNFR2) čime se pospešuje remijelinizacija [44]. Pored toga, neselektivna terapijska neutralizacija TNF dovodi do povećane demijelinizacije i egzacerbacije bolesti [174]. Novija istraživanja pokazala su da selektivna inhibicija solubilne forme TNF dovodi do poboljšanja u EAE modelu i samim tim predstavlja osnov za ispitivanje novih anti-TNF pristupa u terapiji MS [175]. Povezanost ATG5 i TNF na nivou genske ekspresije koja je detektovana u našoj studiji nameće potrebu za daljim ispitivanjem potencijalne uloge ATG5 u modulaciji pro- i anti-inflamatornih efekata TNF. Nedostatak povezanosti ekspresije ATG5 sa drugim proinflamatornim citokinima (IFN- $\gamma$ , IL-17 i GM-CSF), ističe značaj ATG5/TNF povezanosti, uz obazrivost zbog relativno malog uzorka u našoj studiji. Povezanost između ATG5 i TNF signalnog puta zapažena je i u Kronovoj bolesti (koja poseduje brojne karakteristike autoimunskih oboljenja), gde je pokazano da određeni polimorfizmi gena za ATG5 korelišu sa odgovorom na primenjenu anti-TNF terapiju [176]. Moguće je da TNF stimuliše ekspresiju ATG5 u T-limfocitima, kao što je već pokazano u drugim tipovima ćelija [177, 178] ili su TNF i ATG5 regulisani istim ekstracelularnim/intracelularnim signalima. Jedan od najznačajnijih intracelularnih signalnih molekula u T-limfocitima - NF- $\kappa$ B [179, 180] je potencijalni biomarker kliničkog toka MS [181]. Deficit NF- $\kappa$ B kod miša dovodi do rezistencije na EAE, pri čemu je ovaj transkripcioni faktor ključan za aktivaciju i diferencijaciju autoreaktivnih T-

limfocita specifičnih za MOG [182]. Pokazano je da je autofagija neophodna za aktivaciju NF- $\kappa$ B. Naime, usled deficita ATG5 i ATG7 onemogućena je translokacija NF- $\kappa$ B u jedro koju indukuje TNF [183]. Na ovom primeru se uočava povezanost TNF signalnog puta i ATG5 sa NF- $\kappa$ B koji, prvenstveno zbog svoje uloge u ćelijama imunskog sistema [184], predstavlja potencijalnu terapijsku metu u MS [185]. Potencijalni odnos ekspresije TNF i ATG5 u MS, kao i njegova uloga u nastanku i progresiji bolesti, vredan je daljeg istraživanja, ne samo sa ciljem boljeg razumevanja patogeneze MS već i zbog mogućnosti razvijanja novih terapeutika zasnovanih na modulaciji autofagije i TNF.

Analizom naših rezultata u CD4<sup>+</sup> T-limfocitima nije uočena razlika u ekspresiji IFN- $\gamma$ , IL-17A i GM-CSF kod obolelih od MS u poređenju sa kontrolnim ispitanicima. U skorijem istraživanju uočen je povećan broj GM-CSF<sup>+</sup> T-limfocita iz periferne krvi obolelih od MS koji nisu lečeni imunosupresivnom terapijom u poređenju sa zdravim kontrolama i obolelima na terapiji IFN- $\beta$  [186]. Razlika u rezultatima može se pripisati metodologiji imajući u vidu da su T-limfociti u pomenutoj studiji prethodno stimulisani, za razliku od T-limfocita analiziranih bez stimulacije u našem istraživanju. Osim toga, pokazano je da je znatno veći broj GM-CSF<sup>+</sup>T-limfocita prisutan u lezijama moždanog tkiva obolelih od MS u poređenju sa T-limfocitima iz periferne krvi [186]. U istoj studiji, GM-CSF<sup>+</sup> T-limfociti u moždanim lezijama ekspresirali su i IFN- $\gamma$  i IL-17A znatno više od ćelija izolovanih iz periferne krvi. Moguće je da se razlika u ekspresiji mRNA za GM-CSF, IFN- $\gamma$  i IL-17A između pacijenata sa MS i zdravih kontrola ne može uočiti analizom T-limfocita sa periferije ukoliko su T-limfociti obolelih od MS stimulisani da pojačano sekretuju ove citokine u samom CNS. Imajući u vidu potencijalno važne i nedovoljno ispitane uloge GM-CSF [42, 43], IFN- $\gamma$  i IL-17A [48, 187] u patogenezi MS, ne treba zanemariti ni ulogu drugih ćelija, pored T-limfocita, kao mogući izvor ovih citokina [188, 189].

U kliničkom radu sa pacijentima, biomarkeri koji bi se relativno lako određivali a pri tom imali prognostičku vrednost bili bi dragoceni. Često se u tom smislu biološki molekuli korelišu sa kliničkim parametrima bolesti, kao što je EDSS skor. EDSS skor je jedan od najčešće korišćenih mernih instrumenata za procenu onesposobljenosti pacijenata sa MS, što omogućava poređenje rezultata dobijenih u različitim studijama [190]. Pored ove očigledne prednosti, pojedini autori ističu nedostatke EDSS: akcenat na ambulantnom statusu, relativno smanjena senzitivnost u srednjim i visokim rangovima,

odsustvo adekvatnih kognitivnih i vizuelnih komponenti [191], što nameće potrebu za uvođenjem novih skala za procenu progresije bolesti [192]. Analiza naših rezultata nije pokazala korelaciju između ekspresije ATG5 i onesposobljenosti pacijenata izražene kroz EDSS skor. Obzirom da su u naše istraživanje uključeni novooboleli pacijenti sa MS, podaci o stepenu progresije bolesti, kao značajan klinički pokazatelj koji utiče na kvalitet života bolesnika i na odluku o daljoj terapiji, nisu obuhvaćeni dizajnom ove studije. Imajući to u vidu, iako u našoj studiji ekspresija ATG5 nije bila povezana sa EDSS obolelih od MS, neophodne su longitudinalne studije i detaljnija analiza koja će obuhvatiti veći broj kliničkih i parakliničkih parametara (nalaz na MRI) kako bi se ispitala potencijalna korelacija ekspresije ATG5 i progresije MS. Takođe su neophodna detaljnija istraživanja kako bi se utvrdila potencijalna uloga ATG5 u T-limfocitima u patogenezi MS i da li monitoring/modulacija ATG5 ima dijagnostički/terapijski potencijal u ovoj bolesti.

## **6.Zaključci**

1. Povišena ekspresija ATG5 na nivou gena i proteina u T-limfocitima pacijenata sa MS nije praćena transkripcionom indukcijom autofagije i stimulacijom proteolitičke aktivnosti zavisne od autofagije.
2. Korelacija ekspresije ATG5 i TNF ukazuje na moguću ulogu ATG5 u proinflamatornoj aktivnosti T-limfocita u MS.



## **7.Literatura**

1. Compston A, Coles A, 2008. **Multiple sclerosis**. *Lancet (London, England)* 372, 1502-1517. [[PubMed](#)]
2. Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF, 2013. **Pathology of multiple sclerosis: where do we stand?** *Continuum (Minneapolis, Minn)* 19, 901-921. [[PubMed](#)]
3. Calabrese M, Filippi M, Gallo P, 2010. **Cortical lesions in multiple sclerosis**. *Nature reviews Neurology* 6, 438-444. [[PubMed](#)]
4. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H, 2009. **The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains**. *Brain : a journal of neurology* 132, 1175-1189. [[PubMed](#)]
5. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC *et al*, 2001. **Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis**. *Annals of neurology* 50, 121-127. [[PubMed](#)]
6. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW *et al*, 2005. **Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria"**. *Annals of neurology* 58, 840-846. [[PubMed](#)]
7. Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, Fujihara K, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L *et al*, 2011. **Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria**. *Annals of neurology* 69, 292-302. [[PubMed](#)]
8. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS *et al*, 2018. **Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria**. *The Lancet Neurology* 17, 162-173. [[PubMed](#)]
9. Bezzini D, Battaglia MA, 2017. **Multiple Sclerosis Epidemiology in Europe**. *Advances in experimental medicine and biology* 958, 141-159. [[PubMed](#)]
10. Toncev G, Miletic Drakulic S, Knezevic Z, Boskovic Matic T, Gavrilovic A, Toncev S, Drulovic J, Pekmezovic T, 2011. **Prevalence of multiple sclerosis in the Serbian district Sumadija**. *Neuroepidemiology* 37, 102-106. [[PubMed](#)]
11. Cheng Y, Sun L, Xie Z, Fan X, Cao Q, Han J, Zhu J, Jin T, 2017. **Diversity of immune cell types in multiple sclerosis and its animal model: Pathological and therapeutic implications**. *Journal of neuroscience research* 95, 1973-1983. [[PubMed](#)]
12. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA, 2015. **Immunopathology of multiple sclerosis**. *Nature reviews Immunology* 15, 545-558. [[PubMed](#)]
13. Miller D, Barkhof F, Montalban X, Thompson A, Filippi M, 2005. **Clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis, part I: natural history, pathogenesis, diagnosis, and prognosis**. *The Lancet Neurology* 4, 281-288. [[PubMed](#)]
14. Lebrun C, Bensa C, Debouverie M, Wiertlevski S, Brassat D, de Seze J, Rumbach L, Pelletier J, Labauge P, Brochet B *et al*, 2009. **Association between clinical conversion to multiple sclerosis in radiologically isolated syndrome and magnetic resonance imaging, cerebrospinal fluid, and visual evoked potential: follow-up of 70 patients**. *Archives of neurology* 66, 841-846. [[PubMed](#)]
15. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F *et al*, 2014. **Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions**. *Neurology* 83, 278-286. [[PubMed](#)]
16. Lublin FD, 2014. **New multiple sclerosis phenotypic classification**. *European neurology* 72 Suppl 1, 1-5. [[PubMed](#)]
17. Baecher-Allan C, Kaskow BJ, Weiner HL, 2018. **Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy**. *Neuron* 97, 742-768. [[PubMed](#)]
18. Kurtzke JF, 1983. **Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS)**. *Neurology* 33, 1444-1452. [[PubMed](#)]

19. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, Achiti I, Confavreux C, Coustans M, le Page E *et al*, 2005. **Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity.** *Neurology* 64, 1144-1151. [[PubMed](#)]
20. Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Canadian Collaborative Study G, 2003. **Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 12877-12882. [[PubMed](#)]
21. Pravica V, Popadic D, Savic E, Markovic M, Drulovic J, Mostarica-Stojkovic M, 2012. **Single nucleotide polymorphisms in multiple sclerosis: disease susceptibility and treatment response biomarkers.** *Immunologic research* 52, 42-52. [[PubMed](#)]
22. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, Shah TS, Patsopoulos NA, Alfredsson L, Anderson CA *et al*, 2015. **Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis.** *Nature genetics* 47, 1107-1113. [[PubMed](#)]
23. International Multiple Sclerosis Genetics C, Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D *et al*, 2013. **Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis.** *Nature genetics* 45, 1353-1360. [[PubMed](#)]
24. Aranow C, 2011. **Vitamin D and the immune system.** *Journal of investigative medicine : the official publication of the American Federation for Clinical Research* 59, 881-886. [[PubMed](#)]
25. Wingerchuk DM, 2012. **Smoking: effects on multiple sclerosis susceptibility and disease progression.** *Therapeutic advances in neurological disorders* 5, 13-22. [[PubMed](#)]
26. Hedstrom AK, Baarnhielm M, Olsson T, Alfredsson L, 2011. **Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis.** *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 17, 788-793. [[PubMed](#)]
27. Annibali V, Mechelli R, Romano S, Buscarinu MC, Fornasiero A, Umeton R, Ricigliano VA, Orzi F, Coccia EM, Salvetti M *et al*, 2015. **IFN-beta and multiple sclerosis: from etiology to therapy and back.** *Cytokine & growth factor reviews* 26, 221-228. [[PubMed](#)]
28. Pender MP, 2011. **The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis.** *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry* 17, 351-367. [[PubMed](#)]
29. Pender MP, Csurhes PA, Burrows JM, Burrows SR, 2017. **Defective T-cell control of Epstein-Barr virus infection in multiple sclerosis.** *Clinical & translational immunology* 6, e126. [[PubMed](#)]
30. Fierz W, 2017. **Multiple sclerosis: an example of pathogenic viral interaction?** *Virology journal* 14, 42. [[PubMed](#)]
31. Olsson T, Barcellos LF, Alfredsson L, 2017. **Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis.** *Nature reviews Neurology* 13, 25-36. [[PubMed](#)]
32. Matarese G, Carrieri PB, 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, 5150-5155. [[PubMed](#)]
33. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF, 2000. **Decreased bioavailability of vitamin D in obesity.** *The American journal of clinical nutrition* 72, 690-693. [[PubMed](#)]
34. Jangi S, Gandhi R, Cox LM, Li N, von Glehn F, Yan R, Patel B, Mazzola MA, Liu S, Glanz BL *et al*, 2016. **Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis.** *Nature communications* 7, 12015. [[PubMed](#)]
35. Tankou SK, Regev K, Healy BC, Cox LM, Tjon E, Kivisakk P, Vanande IP, Cook S, Gandhi R, Glanz B *et al*, 2018. **Investigation of probiotics in multiple sclerosis.** *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 24, 58-63. [[PubMed](#)]

36. Alkanani AK, Hara N, Gottlieb PA, Ir D, Robertson CE, Wagner BD, Frank DN, Zipris D, 2015. **Alterations in Intestinal Microbiota Correlate With Susceptibility to Type 1 Diabetes.** *Diabetes* 64, 3510-3520. [[PubMed](#)]
37. Trapp BD, Nave KA, 2008. **Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder?** *Annual review of neuroscience* 31, 247-269. [[PubMed](#)]
38. Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD, 2001. **A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis.** *The Journal of clinical investigation* 108, 311-318. [[PubMed](#)]
39. Malpass K, 2012. **Multiple sclerosis: 'Outside-in' demyelination in MS.** *Nature reviews Neurology* 8, 61. [[PubMed](#)]
40. Sundrud MS, Trivigno C, 2013. **Identity crisis of Th17 cells: many forms, many functions, many questions.** *Seminars in immunology* 25, 263-272. [[PubMed](#)]
41. Zhang J, Roberts AI, Liu C, Ren G, Xu G, Zhang L, Devadas S, Shi Y, 2013. **A novel subset of helper T cells promotes immune responses by secreting GM-CSF.** *Cell death and differentiation* 20, 1731-1741. [[PubMed](#)]
42. Croxford AL, Spath S, Becher B, 2015. **GM-CSF in Neuroinflammation: Licensing Myeloid Cells for Tissue Damage.** *Trends in immunology* 36, 651-662. [[PubMed](#)]
43. Bhattacharya P, Budnick I, Singh M, Thirupathi M, Alharshawi K, Elshabrawy H, Holterman MJ, Prabhakar BS, 2015. **Dual Role of GM-CSF as a Pro-Inflammatory and a Regulatory Cytokine: Implications for Immune Therapy.** *Journal of interferon & cytokine research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research* 35, 585-599. [[PubMed](#)]
44. Probert L, 2015. **TNF and its receptors in the CNS: The essential, the desirable and the deleterious effects.** *Neuroscience* 302, 2-22. [[PubMed](#)]
45. Hamilton JA, 2015. **GM-CSF as a target in inflammatory/autoimmune disease: current evidence and future therapeutic potential.** *Expert review of clinical immunology* 11, 457-465. [[PubMed](#)]
46. Kaltsonoudis E, Voulgari PV, Konitsiotis S, Drosos AA, 2014. **Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy.** *Autoimmunity reviews* 13, 54-58. [[PubMed](#)]
47. Ramgolam VS, Markovic-Plese S, 2010. **Interferon-beta inhibits Th17 cell differentiation in patients with multiple sclerosis.** *Endocrine, metabolic & immune disorders drug targets* 10, 161-167. [[PubMed](#)]
48. Havrdova E, Belova A, Goloborodko A, Tisserant A, Wright A, Wallstroem E, Garren H, Maguire RP, Johns DR, 2016. **Activity of secukinumab, an anti-IL-17A antibody, on brain lesions in RRMS: results from a randomized, proof-of-concept study.** *Journal of neurology* 263, 1287-1295. [[PubMed](#)]
49. Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH, Ustekinumab MSI, 2008. **Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study.** *The Lancet Neurology* 7, 796-804. [[PubMed](#)]
50. Longbrake EE, Racke MK, 2009. **Why did IL-12/IL-23 antibody therapy fail in multiple sclerosis?** *Expert review of neurotherapeutics* 9, 319-321. [[PubMed](#)]
51. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S *et al*, 2000. **Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction.** *The Journal of experimental medicine* 192, 393-404. [[PubMed](#)]
52. Friese MA, Fugger L, 2005. **Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy?** *Brain : a journal of neurology* 128, 1747-1763. [[PubMed](#)]

53. Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J, 2001. **A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis.** *The Journal of experimental medicine* 194, 669-676. [[PubMed](#)]
54. Ji Q, Castelli L, Goverman JM, 2013. **MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells.** *Nature immunology* 14, 254-261. [[PubMed](#)]
55. Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W, 2000. **Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation.** *Brain : a journal of neurology* 123 ( Pt 6), 1174-1183. [[PubMed](#)]
56. Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Houry SJ, 2003. **Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model.** *The Journal of clinical investigation* 112, 1037-1048. [[PubMed](#)]
57. Lu LF, Rudensky A, 2009. **Molecular orchestration of differentiation and function of regulatory T cells.** *Genes & development* 23, 1270-1282. [[PubMed](#)]
58. Costantino CM, Baecher-Allan C, Hafler DA, 2008. **Multiple sclerosis and regulatory T cells.** *Journal of clinical immunology* 28, 697-706. [[PubMed](#)]
59. Schneider A, Long SA, Cerosaletti K, Ni CT, Samuels P, Kita M, Buckner JH, 2013. **In active relapsing-remitting multiple sclerosis, effector T cell resistance to adaptive T(regs) involves IL-6-mediated signaling.** *Science translational medicine* 5, 170ra115. [[PubMed](#)]
60. Bhela S, Kampsell C, Manohar M, Dominguez-Villar M, Griffin R, Bhatt P, Kivisakk-Webb P, Fuhlbrigge R, Kupper T, Weiner H *et al*, 2015. **Nonapoptotic and extracellular activity of granzyme B mediates resistance to regulatory T cell (Treg) suppression by HLA-DR-CD25hiCD127lo Tregs in multiple sclerosis and in response to IL-6.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 194, 2180-2189. [[PubMed](#)]
61. Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA, 2006. **Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis.** *The Journal of clinical investigation* 116, 3252-3257. [[PubMed](#)]
62. van Boxel-Dezaire AH, Hoff SC, van Oosten BW, Verweij CL, Drager AM, Ader HJ, van Houwelingen JC, Barkhof F, Polman CH, Nagelkerken L, 1999. **Decreased interleukin-10 and increased interleukin-12p40 mRNA are associated with disease activity and characterize different disease stages in multiple sclerosis.** *Annals of neurology* 45, 695-703. [[PubMed](#)]
63. Cepok S, Jacobsen M, Schock S, Omer B, Jaekel S, Boddeker I, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B, 2001. **Patterns of cerebrospinal fluid pathology correlate with disease progression in multiple sclerosis.** *Brain : a journal of neurology* 124, 2169-2176. [[PubMed](#)]
64. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F, 2007. **Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology.** *Brain : a journal of neurology* 130, 1089-1104. [[PubMed](#)]
65. Abraira V, Alvarez-Cermeno JC, Arroyo R, Camara C, Casanova B, Cubillo S, de Andres C, Espejo C, Fernandez O, Ferrer J *et al*, 2011. **Utility of oligoclonal IgG band detection for MS diagnosis in daily clinical practice.** *Journal of immunological methods* 371, 170-173. [[PubMed](#)]
66. Lalive PH, 2008. **Autoantibodies in inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system.** *Swiss medical weekly* 138, 692-707. [[PubMed](#)]
67. Alves Do Rego C, Collongues N, 2018. **Neuromyelitis optica spectrum disorders: Features of aquaporin-4, myelin oligodendrocyte glycoprotein and double-seronegative-mediated subtypes.** *Revue neurologique* 174, 458-470. [[PubMed](#)]



68. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V, Roch T, Lawrie S, Fan B, O'Connor RA, Anderton SM, Bar-Or A *et al*, 2012. **B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells.** *The Journal of experimental medicine* 209, 1001-1010. [[PubMed](#)]
69. Han J, Sun L, Fan X, Wang Z, Cheng Y, Zhu J, Jin T, 2016. **Role of regulatory b cells in neuroimmunologic disorders.** *Journal of neuroscience research* 94, 693-701. [[PubMed](#)]
70. Molnarfi N, Schulze-Topphoff U, Weber MS, Patarroyo JC, Prod'homme T, Varrin-Doyer M, Shetty A, Linington C, Slavina AJ, Hidalgo J *et al*, 2013. **MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies.** *The Journal of experimental medicine* 210, 2921-2937. [[PubMed](#)]
71. Castillo-Trivino T, Braithwaite D, Bacchetti P, Waubant E, 2013. **Rituximab in relapsing and progressive forms of multiple sclerosis: a systematic review.** *PloS one* 8, e66308. [[PubMed](#)]
72. Gasperi C, Stuve O, Hemmer B, 2016. **B cell-directed therapies in multiple sclerosis.** *Neurodegenerative disease management* 6, 37-47. [[PubMed](#)]
73. Cross AH, Stark JL, Lauber J, Ramsbottom MJ, Lyons JA, 2006. **Rituximab reduces B cells and T cells in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients.** *Journal of neuroimmunology* 180, 63-70. [[PubMed](#)]
74. Mackern-Oberti JP, Llanos C, Vega F, Salazar-Onfray F, Riedel CA, Bueno SM, Kalergis AM, 2015. **Role of dendritic cells in the initiation, progress and modulation of systemic autoimmune diseases.** *Autoimmunity reviews* 14, 127-139. [[PubMed](#)]
75. von Glehn F, Santos LM, Balashov KE, 2012. **Plasmacytoid dendritic cells and immunotherapy in multiple sclerosis.** *Immunotherapy* 4, 1053-1061. [[PubMed](#)]
76. Yamasaki R, Lu H, Butovsky O, Ohno N, Rietsch AM, Cialic R, Wu PM, Doykan CE, Lin J, Cotleur AC *et al*, 2014. **Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system.** *The Journal of experimental medicine* 211, 1533-1549. [[PubMed](#)]
77. Chu F, Shi M, Zheng C, Shen D, Zhu J, Zheng X, Cui L, 2018. **The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis.** *Journal of neuroimmunology* 318, 1-7. [[PubMed](#)]
78. Plantone D, Marti A, Frisullo G, Iorio R, Damato V, Nociti V, Patanella AK, Bianco A, Mirabella M, Batocchi AP, 2013. **Circulating CD56dim NK cells expressing perforin are increased in progressive multiple sclerosis.** *Journal of neuroimmunology* 265, 124-127. [[PubMed](#)]
79. Smith MD, Calabresi PA, Bhargava P, 2018. **Dimethyl fumarate treatment alters NK cell function in multiple sclerosis.** *European journal of immunology* 48, 380-383. [[PubMed](#)]
80. Saraste M, Irjala H, Airas L, 2007. **Expansion of CD56Bright natural killer cells in the peripheral blood of multiple sclerosis patients treated with interferon-beta.** *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 28, 121-126. [[PubMed](#)]
81. Bielekova B, 2018. **Daclizumab Therapy for Multiple Sclerosis.** *Cold Spring Harbor perspectives in medicine.* [[PubMed](#)]
82. Nielsen N, Odum N, Urso B, Lanier LL, Spee P, 2012. **Cytotoxicity of CD56(bright) NK cells towards autologous activated CD4+ T cells is mediated through NKG2D, LFA-1 and TRAIL and dampened via CD94/NKG2A.** *PloS one* 7, e31959. [[PubMed](#)]
83. De Biasi S, Simone AM, Nasi M, Bianchini E, Ferraro D, Vitetta F, Gibellini L, Pinti M, Del Giovane C, Sola P *et al*, 2016. **iNKT Cells in Secondary Progressive Multiple Sclerosis Patients Display Pro-inflammatory Profiles.** *Frontiers in immunology* 7, 555. [[PubMed](#)]

84. Illes Z, Shimamura M, Newcombe J, Oka N, Yamamura T, 2004. **Accumulation of Valpha7.2-Jalpha33 invariant T cells in human autoimmune inflammatory lesions in the nervous system.** *International immunology* 16, 223-230. [[PubMed](#)]
85. Bianchini E, De Biasi S, Simone AM, Ferraro D, Sola P, Cossarizza A, Pinti M, 2017. **Invariant natural killer T cells and mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis.** *Immunology letters* 183, 1-7. [[PubMed](#)]
86. Mizushima N, Komatsu M, 2011. **Autophagy: renovation of cells and tissues.** *Cell* 147, 728-741. [[PubMed](#)]
87. Wang K, Klionsky DJ, 2011. **Mitochondria removal by autophagy.** *Autophagy* 7, 297-300. [[PubMed](#)]
88. Yang Z, Klionsky DJ, 2010. **Eaten alive: a history of macroautophagy.** *Nature cell biology* 12, 814-822. [[PubMed](#)]
89. White E, 2008. **Autophagic cell death unraveled: Pharmacological inhibition of apoptosis and autophagy enables necrosis.** *Autophagy* 4, 399-401. [[PubMed](#)]
90. Fitzwalter BE, Thorburn A, 2015. **Recent insights into cell death and autophagy.** *The FEBS journal* 282, 4279-4288. [[PubMed](#)]
91. Nakatogawa H, Suzuki K, Kamada Y, Ohsumi Y, 2009. **Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast.** *Nature reviews Molecular cell biology* 10, 458-467. [[PubMed](#)]
92. Kundu M, Thompson CB, 2008. **Autophagy: basic principles and relevance to disease.** *Annual review of pathology* 3, 427-455. [[PubMed](#)]
93. Ganley IG, Lam du H, Wang J, Ding X, Chen S, Jiang X, 2009. **ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy.** *The Journal of biological chemistry* 284, 12297-12305. [[PubMed](#)]
94. Hosokawa N, Sasaki T, Iemura S, Natsume T, Hara T, Mizushima N, 2009. **Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13.** *Autophagy* 5, 973-979. [[PubMed](#)]
95. Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N *et al*, 2009. **Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy.** *Molecular biology of the cell* 20, 1981-1991. [[PubMed](#)]
96. Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P, Macleod KF, 2007. **BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy.** *Molecular and cellular biology* 27, 6229-6242. [[PubMed](#)]
97. Parzych KR, Klionsky DJ, 2014. **An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation.** *Antioxidants & redox signaling* 20, 460-473. [[PubMed](#)]
98. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z, 2010. **LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis.** *The EMBO journal* 29, 1792-1802. [[PubMed](#)]
99. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N, 2012. **The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes.** *Cell* 151, 1256-1269. [[PubMed](#)]
100. Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H *et al*, 2006. **Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice.** *Nature* 441, 885-889. [[PubMed](#)]
101. Moscat J, Diaz-Meco MT, 2009. **p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, and cancer.** *Cell* 137, 1001-1004. [[PubMed](#)]
102. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K *et al*, 2016. **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition).** *Autophagy* 12, 1-222. [[PubMed](#)]
103. Fullgrabe J, Ghislat G, Cho DH, Rubinsztein DC, 2016. **Transcriptional regulation of mammalian autophagy at a glance.** *Journal of cell science* 129, 3059-3066. [[PubMed](#)]

104. Xu P, Das M, Reilly J, Davis RJ, 2011. **JNK regulates FoxO-dependent autophagy in neurons.** *Genes & development* 25, 310-322. [[PubMed](#)]
105. Xiong X, Tao R, DePinho RA, Dong XC, 2012. **The autophagy-related gene 14 (Atg14) is regulated by forkhead box O transcription factors and circadian rhythms and plays a critical role in hepatic autophagy and lipid metabolism.** *The Journal of biological chemistry* 287, 39107-39114. [[PubMed](#)]
106. Liu HY, Han J, Cao SY, Hong T, Zhuo D, Shi J, Liu Z, Cao W, 2009. **Hepatic autophagy is suppressed in the presence of insulin resistance and hyperinsulinemia: inhibition of FoxO1-dependent expression of key autophagy genes by insulin.** *The Journal of biological chemistry* 284, 31484-31492. [[PubMed](#)]
107. Medema RH, Jaattela M, 2010. **Cytosolic FoxO1: alive and killing.** *Nature cell biology* 12, 642-643. [[PubMed](#)]
108. Pike LR, Singleton DC, Buffa F, Abramczyk O, Phadwal K, Li JL, Simon AK, Murray JT, Harris AL, 2013. **Transcriptional up-regulation of ULK1 by ATF4 contributes to cancer cell survival.** *The Biochemical journal* 449, 389-400. [[PubMed](#)]
109. Rouschop KM, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW *et al*, 2010. **The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5.** *The Journal of clinical investigation* 120, 127-141. [[PubMed](#)]
110. Fullgrave J, Klionsky DJ, Joseph B, 2014. **The return of the nucleus: transcriptional and epigenetic control of autophagy.** *Nature reviews Molecular cell biology* 15, 65-74. [[PubMed](#)]
111. Kirkegaard K, Taylor MP, Jackson WT, 2004. **Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms.** *Nature reviews Microbiology* 2, 301-314. [[PubMed](#)]
112. Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V, 2004. **Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages.** *Cell* 119, 753-766. [[PubMed](#)]
113. Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, Munz C, 2005. **Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy.** *Science (New York, NY)* 307, 593-596. [[PubMed](#)]
114. Deretic V, 2012. **Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors.** *Current opinion in immunology* 24, 21-31. [[PubMed](#)]
115. Zhang Y, Morgan MJ, Chen K, Choksi S, Liu ZG, 2012. **Induction of autophagy is essential for monocyte-macrophage differentiation.** *Blood* 119, 2895-2905. [[PubMed](#)]
116. Chen WN, Guo SN, Wang JY, Jia LQ, Li DY, Tian Y, 2016. **[Correlation between autophagy and polarization of macrophages in atherosclerosis plaque in arteriosclerosis obliterans amputees].** *Yao xue xue bao = Acta pharmaceutica Sinica* 51, 68-74. [[PubMed](#)]
117. Aflaki E, Moaven N, Borger DK, Lopez G, Westbroek W, Chae JJ, Marugan J, Patnaik S, Maniwang E, Gonzalez AN *et al*, 2016. **Lysosomal storage and impaired autophagy lead to inflammasome activation in Gaucher macrophages.** *Aging cell* 15, 77-88. [[PubMed](#)]
118. Wang S, Xia P, Huang G, Zhu P, Liu J, Ye B, Du Y, Fan Z, 2016. **FoxO1-mediated autophagy is required for NK cell development and innate immunity.** *Nature communications* 7, 11023. [[PubMed](#)]
119. Lopez-Soto A, Bravo-San Pedro JM, Kroemer G, Galluzzi L, Gonzalez S, 2017. **Involvement of autophagy in NK cell development and function.** *Autophagy* 13, 633-636. [[PubMed](#)]



120. Pei B, Zhao M, Miller BC, Vela JL, Bruinsma MW, Virgin HW, Kronenberg M, 2015. **Invariant NKT cells require autophagy to coordinate proliferation and survival signals during differentiation.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 194, 5872-5884. [[PubMed](#)]
121. Salio M, Puleston DJ, Mathan TS, Shepherd D, Stranks AJ, Adamopoulou E, Veerapen N, Besra GS, Hollander GA, Simon AK *et al*, 2014. **Essential role for autophagy during invariant NKT cell development.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E5678-5687. [[PubMed](#)]
122. Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L, 2008. **Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance.** *Nature* 455, 396-400. [[PubMed](#)]
123. Jia W, He YW, 2011. **Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 186, 5313-5322. [[PubMed](#)]
124. Kovacs JR, Li C, Yang Q, Li G, Garcia IG, Ju S, Roodman DG, Windle JJ, Zhang X, Lu B, 2012. **Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery.** *Cell death and differentiation* 19, 144-152. [[PubMed](#)]
125. Pua HH, He YW, 2007. **Maintaining T lymphocyte homeostasis: another duty of autophagy.** *Autophagy* 3, 266-267. [[PubMed](#)]
126. Alirezaei M, Fox HS, Flynn CT, Moore CS, Hebb AL, Frausto RF, Bhan V, Kiosses WB, Whitton JL, Robertson GS *et al*, 2009. **Elevated ATG5 expression in autoimmune demyelination and multiple sclerosis.** *Autophagy* 5, 152-158. [[PubMed](#)]
127. Xu X, Araki K, Li S, Han JH, Ye L, Tan WG, Konieczny BT, Bruinsma MW, Martinez J, Pearce EL *et al*, 2014. **Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation.** *Nature immunology* 15, 1152-1161. [[PubMed](#)]
128. Puleston DJ, Zhang H, Powell TJ, Lipina E, Sims S, Panse I, Watson AS, Cerundolo V, Townsend AR, Klenerman P *et al*, 2014. **Autophagy is a critical regulator of memory CD8(+) T cell formation.** *eLife* 3. [[PubMed](#)]
129. Wei J, Long L, Yang K, Guy C, Shrestha S, Chen Z, Wu C, Vogel P, Neale G, Green DR *et al*, 2016. **Autophagy enforces functional integrity of regulatory T cells by coupling environmental cues and metabolic homeostasis.** *Nature immunology* 17, 277-285. [[PubMed](#)]
130. Le Texier L, Lineburg KE, Cao B, McDonald-Hyman C, Leveque-El Mouttie L, Nicholls J, Melino M, Nalkurthi BC, Alexander KA, Teal B *et al*, 2016. **Autophagy-dependent regulatory T cells are critical for the control of graft-versus-host disease.** *JCI insight* 1, e86850. [[PubMed](#)]
131. Kabat AM, Harrison OJ, Riffelmacher T, Moghaddam AE, Pearson CF, Laing A, Abeler-Dorner L, Forman SP, Grecnis RK, Sattentau Q *et al*, 2016. **The autophagy gene Atg16l1 differentially regulates Treg and TH2 cells to control intestinal inflammation.** *eLife* 5, e12444. [[PubMed](#)]
132. van Loosdregt J, Rossetti M, Spreafico R, Moshref M, Olmer M, Williams GW, Kumar P, Copeland D, Pischel K, Lotz M *et al*, 2016. **Increased autophagy in CD4(+) T cells of rheumatoid arthritis patients results in T-cell hyperactivation and apoptosis resistance.** *European journal of immunology* 46, 2862-2870. [[PubMed](#)]
133. Benoit-Lizon I, Jacquin E, Apetoh L, 2018. **Selective autophagy restricts IL-9 secretion from TH9 cells: relevance in cancer growth.** *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 17, 391-392. [[PubMed](#)]
134. Dardalhon V, Awasthi A, Kwon H, Galileos G, Gao W, Sobel RA, Mitsdoerffer M, Strom TB, Elyaman W, Ho IC *et al*, 2008. **IL-4 inhibits TGF-beta-induced Foxp3+ T cells and, together with TGF-beta, generates IL-9+ IL-10+ Foxp3(-) effector T cells.** *Nature immunology* 9, 1347-1355. [[PubMed](#)]

135. Gerlach K, Hwang Y, Nikolaev A, Atreya R, Dornhoff H, Steiner S, Lehr HA, Wirtz S, Vieth M, Waisman A *et al*, 2014. **TH9 cells that express the transcription factor PU.1 drive T cell-mediated colitis via IL-9 receptor signaling in intestinal epithelial cells.** *Nature immunology* 15, 676-686. [[PubMed](#)]
136. Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, Cadwell K, Pua HH, Lee HK, Mizushima NN, Iwasaki A, He YW, Swat W *et al*, 2008. **The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development.** *Autophagy* 4, 309-314. [[PubMed](#)]
137. Morandi E, Jagessar SA, Hart BA, Gran B, 2017. **EBV Infection Empowers Human B Cells for Autoimmunity: Role of Autophagy and Relevance to Multiple Sclerosis.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 199, 435-448. [[PubMed](#)]
138. Weber MS, Derfuss T, Metz I, Bruck W, 2018. **Defining distinct features of anti-MOG antibody associated central nervous system demyelination.** *Therapeutic advances in neurological disorders* 11, 1756286418762083. [[PubMed](#)]
139. Igci M, Baysan M, Yigiter R, Ulasli M, Geyik S, Bayraktar R, Bozgeyik I, Bozgeyik E, Bayram A, Cakmak EA, 2016. **Gene expression profiles of autophagy-related genes in multiple sclerosis.** *Gene* 588, 38-46. [[PubMed](#)]
140. Bradford MM, 1976. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.** *Analytical biochemistry* 72, 248-254. [[PubMed](#)]
141. Yoshii SR, Mizushima N, 2017. **Monitoring and Measuring Autophagy.** *International journal of molecular sciences* 18. [[PubMed](#)]
142. Ambjorn M, Ejlerskov P, Liu Y, Lees M, Jaattela M, Issazadeh-Navikas S, 2013. **IFNB1/interferon-beta-induced autophagy in MCF-7 breast cancer cells counteracts its proapoptotic function.** *Autophagy* 9, 287-302. [[PubMed](#)]
143. Chen HC, Fong TH, Lee AW, Chiu WT, 2012. **Autophagy is activated in injured neurons and inhibited by methylprednisolone after experimental spinal cord injury.** *Spine* 37, 470-475. [[PubMed](#)]
144. Gao W, Chen SR, Wu MY, Gao K, Li YL, Wang HY, Li CY, Li H, 2016. **Methylprednisolone exerts neuroprotective effects by regulating autophagy and apoptosis.** *Neural regeneration research* 11, 823-828. [[PubMed](#)]
145. Li Y, Zhu H, Zeng X, Fan J, Qian X, Wang S, Wang Z, Sun Y, Wang X, Wang W *et al*, 2013. **Suppression of autophagy enhanced growth inhibition and apoptosis of interferon-beta in human glioma cells.** *Molecular neurobiology* 47, 1000-1010. [[PubMed](#)]
146. Zarrouk A, Nury T, Karym EM, Vejux A, Sghaier R, Gondcaille C, Andreoletti P, Trompier D, Savary S, Cherkaoui-Malki M *et al*, 2017. **Attenuation of 7-ketocholesterol-induced overproduction of reactive oxygen species, apoptosis, and autophagy by dimethyl fumarate on 158N murine oligodendrocytes.** *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* 169, 29-38. [[PubMed](#)]
147. Xia D, Zhang YT, Xu GP, Yan WW, Pan XR, Tong JH, 2017. **Sertraline exerts its antitumor functions through both apoptosis and autophagy pathways in acute myeloid leukemia cells.** *Leukemia & lymphoma* 58, 1-10. [[PubMed](#)]
148. Gassen NC, Hartmann J, Schmidt MV, Rein T, 2015. **FKBP5/FKBP51 enhances autophagy to synergize with antidepressant action.** *Autophagy* 11, 578-580. [[PubMed](#)]
149. Mizushima N, Yoshimori T, 2007. **How to interpret LC3 immunoblotting.** *Autophagy* 3, 542-545. [[PubMed](#)]
150. Orhon I, Reggiori F, 2017. **Assays to Monitor Autophagy Progression in Cell Cultures.** *Cells* 6. [[PubMed](#)]
151. Haegert DG, 2011. **Multiple sclerosis: a disorder of altered T-cell homeostasis.** *Multiple sclerosis international* 2011, 461304. [[PubMed](#)]
152. Bronietzki AW, Schuster M, Schmitz I, 2015. **Autophagy in T-cell development, activation and differentiation.** *Immunology and cell biology* 93, 25-34. [[PubMed](#)]

153. Kim JH, Hong SB, Lee JK, Han S, Roh KH, Lee KE, Kim YK, Choi EJ, Song HK, 2015. **Insights into autophagosome maturation revealed by the structures of ATG5 with its interacting partners.** *Autophagy* 11, 75-87. [[PubMed](#)]
154. Pua HH, Dzhalgalov I, Chuck M, Mizushima N, He YW, 2007. **A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation.** *The Journal of experimental medicine* 204, 25-31. [[PubMed](#)]
155. Bestebroer J, V'Kovski P, Mauthe M, Reggiori F, 2013. **Hidden behind autophagy: the unconventional roles of ATG proteins.** *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 14, 1029-1041. [[PubMed](#)]
156. Liu E, Van Grol J, Subauste CS, 2015. **Atg5 but not Atg7 in dendritic cells enhances IL-2 and IFN-gamma production by Toxoplasma gondii-reactive CD4+ T cells.** *Microbes and infection* 17, 275-284. [[PubMed](#)]
157. Zhao Z, Fux B, Goodwin M, Dunay IR, Strong D, Miller BC, Cadwell K, Delgado MA, Ponpuak M, Green KG *et al*, 2008. **Autophagosome-independent essential function for the autophagy protein Atg5 in cellular immunity to intracellular pathogens.** *Cell host & microbe* 4, 458-469. [[PubMed](#)]
158. Kimmey JM, Huynh JP, Weiss LA, Park S, Kambal A, Debnath J, Virgin HW, Stallings CL, 2015. **Unique role for ATG5 in neutrophil-mediated immunopathology during M. tuberculosis infection.** *Nature* 528, 565-569. [[PubMed](#)]
159. Inomata M, Into T, Niida S, Murakami Y, 2013. **Atg5 regulates formation of MyD88 condensed structures and MyD88-dependent signal transduction.** *Biochemical and biophysical research communications* 437, 509-514. [[PubMed](#)]
160. Maskey D, Yousefi S, Schmid I, Zlobec I, Perren A, Friis R, Simon HU, 2013. **ATG5 is induced by DNA-damaging agents and promotes mitotic catastrophe independent of autophagy.** *Nature communications* 4, 2130. [[PubMed](#)]
161. Simon HU, Friis R, 2014. **ATG5: a distinct role in the nucleus.** *Autophagy* 10, 176-177. [[PubMed](#)]
162. Hebb AL, Moore CS, Bhan V, Campbell T, Fisk JD, Robertson HA, Thorne M, Lacasse E, Holcik M, Gillard J *et al*, 2008. **Expression of the inhibitor of apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination.** *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)* 14, 577-594. [[PubMed](#)]
163. Yousefi S, Perozzo R, Schmid I, Ziemiecki A, Schaffner T, Scapozza L, Brunner T, Simon HU, 2006. **Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis.** *Nature cell biology* 8, 1124-1132. [[PubMed](#)]
164. Xia HG, Zhang L, Chen G, Zhang T, Liu J, Jin M, Ma X, Ma D, Yuan J, 2010. **Control of basal autophagy by calpain1 mediated cleavage of ATG5.** *Autophagy* 6, 61-66. [[PubMed](#)]
165. Pyo JO, Jang MH, Kwon YK, Lee HJ, Jun JI, Woo HN, Cho DH, Choi B, Lee H, Kim JH *et al*, 2005. **Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death.** *The Journal of biological chemistry* 280, 20722-20729. [[PubMed](#)]
166. Pietrocola F, Izzo V, Niso-Santano M, Vacchelli E, Galluzzi L, Maiuri MC, Kroemer G, 2013. **Regulation of autophagy by stress-responsive transcription factors.** *Seminars in cancer biology* 23, 310-322. [[PubMed](#)]
167. Huang Y, Guerrero-Preston R, Ratovitski EA, 2012. **Phospho-DeltaNp63alpha-dependent regulation of autophagic signaling through transcription and micro-RNA modulation.** *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 11, 1247-1259. [[PubMed](#)]
168. Kang YA, Sanalkumar R, O'Geen H, Linnemann AK, Chang CJ, Bouhassira EE, Farnham PJ, Keles S, Bresnick EH, 2012. **Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis.** *Molecular and cellular biology* 32, 226-239. [[PubMed](#)]
169. Feng Y, Yao Z, Klionsky DJ, 2015. **How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy.** *Trends in cell biology* 25, 354-363. [[PubMed](#)]

170. Vij A, Randhawa R, Parkash J, Changotra H, 2016. **Investigating regulatory signatures of human autophagy related gene 5 (ATG5) through functional in silico analysis.** *Meta gene* 9, 237-248. [[PubMed](#)]
171. Pengo N, Scolari M, Oliva L, Milan E, Mainoldi F, Raimondi A, Fagioli C, Merlini A, Mariani E, Pasqualetto E *et al*, 2013. **Plasma cells require autophagy for sustainable immunoglobulin production.** *Nature immunology* 14, 298-305. [[PubMed](#)]
172. Chen M, Hong MJ, Sun H, Wang L, Shi X, Gilbert BE, Corry DB, Kheradmand F, Wang J, 2014. **Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection.** *Nature medicine* 20, 503-510. [[PubMed](#)]
173. Taoufik E, Tseveleki V, Chu SY, Tselios T, Karin M, Lassmann H, Szymkowski DE, Probert L, 2011. **Transmembrane tumour necrosis factor is neuroprotective and regulates experimental autoimmune encephalomyelitis via neuronal nuclear factor-kappaB.** *Brain : a journal of neurology* 134, 2722-2735. [[PubMed](#)]
174. Group TLMSSGaTUoBCMMA, 1999. **TNF neutralization in MS: results of a randomized, placebo-controlled multicenter study. The Lenercept Multiple Sclerosis Study Group and The University of British Columbia MS/MRI Analysis Group.** *Neurology* 53, 457-465. [[PubMed](#)]
175. Brambilla R, Ashbaugh JJ, Magliozzi R, Dellarole A, Karmally S, Szymkowski DE, Bethea JR, 2011. **Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination.** *Brain : a journal of neurology* 134, 2736-2754. [[PubMed](#)]
176. Dezelak M, Repnik K, Koder S, Ferkolj I, Potocnik U, 2016. **A Prospective Pharmacogenomic Study of Crohn's Disease Patients during Routine Therapy with Anti-TNF-alpha Drug Adalimumab: Contribution of ATG5, NFKB1, and CRP Genes to Pharmacodynamic Variability.** *Omics : a journal of integrative biology* 20, 296-309. [[PubMed](#)]
177. Cha HH, Hwang JR, Kim HY, Choi SJ, Oh SY, Roh CR, 2014. **Autophagy induced by tumor necrosis factor alpha mediates intrinsic apoptosis in trophoblastic cells.** *Reproductive sciences (Thousand Oaks, Calif)* 21, 612-622. [[PubMed](#)]
178. Chen Z, Jin T, Lu Y, 2016. **AntimiR-30b Inhibits TNF-alpha Mediated Apoptosis and Attenuated Cartilage Degradation through Enhancing Autophagy.** *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology* 40, 883-894. [[PubMed](#)]
179. Silva A, Cornish G, Ley SC, Seddon B, 2014. **NF-kappaB signaling mediates homeostatic maturation of new T cells.** *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, E846-855. [[PubMed](#)]
180. Gerondakis S, Fulford TS, Messina NL, Grumont RJ, 2014. **NF-kappaB control of T cell development.** *Nature immunology* 15, 15-25. [[PubMed](#)]
181. Satoh J, Misawa T, Tabunoki H, Yamamura T, 2008. **Molecular network analysis of T-cell transcriptome suggests aberrant regulation of gene expression by NF-kappaB as a biomarker for relapse of multiple sclerosis.** *Disease markers* 25, 27-35. [[PubMed](#)]
182. Hilliard B, SamoiloVA EB, Liu TS, Rostami A, Chen Y, 1999. **Experimental autoimmune encephalomyelitis in NF-kappa B-deficient mice: roles of NF-kappa B in the activation and differentiation of autoreactive T cells.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 163, 2937-2943. [[PubMed](#)]
183. Criollo A, Chereau F, Malik SA, Niso-Santano M, Marino G, Galluzzi L, Maiuri MC, Baud V, Kroemer G, 2012. **Autophagy is required for the activation of NFkappaB.** *Cell cycle (Georgetown, Tex)* 11, 194-199. [[PubMed](#)]
184. Mc Guire C, Prinz M, Beyaert R, van Loo G, 2013. **Nuclear factor kappa B (NF-kappaB) in multiple sclerosis pathology.** *Trends in molecular medicine* 19, 604-613. [[PubMed](#)]
185. Srinivasan M, Lahiri DK, 2015. **Significance of NF-kappaB as a pivotal therapeutic target in the neurodegenerative pathologies of Alzheimer's disease and multiple sclerosis.** *Expert opinion on therapeutic targets* 19, 471-487. [[PubMed](#)]



186. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, Gonnella P, Hwang D, Mahajan K, Mari ER, Safavi F, Leist TP, Zhang GX *et al*, 2015. **Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN-beta Therapy.** *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 194, 5085-5093. [[PubMed](#)]
187. Wing AC, Hygino J, Ferreira TB, Kasahara TM, Barros PO, Sacramento PM, Andrade RM, Camargo S, Rueda F, Alves-Leon SV *et al*, 2016. **Interleukin-17- and interleukin-22-secreting myelin-specific CD4(+) T cells resistant to corticoids are related with active brain lesions in multiple sclerosis patients.** *Immunology* 147, 212-220. [[PubMed](#)]
188. Li R, Rezk A, Miyazaki Y, Hilgenberg E, Touil H, Shen P, Moore CS, Michel L, Althekair F, Rajasekharan S *et al*, 2015. **Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy.** *Science translational medicine* 7, 310ra166. [[PubMed](#)]
189. Schlegel PM, Steiert I, Kotter I, Muller CA, 2013. **B cells contribute to heterogeneity of IL-17 producing cells in rheumatoid arthritis and healthy controls.** *PloS one* 8, e82580. [[PubMed](#)]
190. Amato MP, Portaccio E, 2007. **Clinical outcome measures in multiple sclerosis.** *Journal of the neurological sciences* 259, 118-122. [[PubMed](#)]
191. Balcer LJ, 2001. **Clinical outcome measures for research in multiple sclerosis.** *Journal of neuro-ophthalmology : the official journal of the North American Neuro-Ophthalmology Society* 21, 296-301. [[PubMed](#)]
192. Weideman AM, Barbour C, Tapia-Maltos MA, Tran T, Jackson K, Kosa P, Komori M, Wichman A, Johnson K, Greenwood M *et al*, 2017. **New Multiple Sclerosis Disease Severity Scale Predicts Future Accumulation of Disability.** *Frontiers in neurology* 8, 598. [[PubMed](#)]

## Spisak skraćenica:

- APC - antigen-prezentujuće ćelije (*engl.* antigen-presenting cells)
- ATF4 - (*engl.* activating transcription factor 4)
- ATG - (*engl.* autophagy related genes)
- BCL2 - (*engl.* B-cell lymphoma 2)
- BCR – B-ćelijski receptor
- BECN1 - beclin-1
- BNIP - (*engl.* Bcl-2-related BH3-only protein)
- cDNK - komplementarna DNK
- CIS - klinički izolovani sindrom (*engl.* clinically isolated syndrome)
- CMV - citomegalovirus
- CNS - centralni nervni sistem
- DĆ - dendritske ćelije
- DNK - dezoksiribonukleinska kiselina
- EAE - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis
- EBV - Epštajn Bar virus
- EDSS - proširena skala statusa onesposobljenosti (*engl.* expanded disability status scale)
- FADD - (*engl.* Fas-associated protein with death domain)
- FOXO - (*engl.* Forkhead Box O)
- FoxP3 - (*engl.* forkhead box P3)
- GABARAP - (*engl.* aminobutyric acid receptor-associated protein)
- GM-CSF - faktor stimulacije kolonija granulocita i monocita (*engl.* granulocyte macrophage colony stimulating factor)
- HLA - humani leukocitni antigen (*engl.* human leukocyte antigen)
- Hsc70 - (*engl.* heat shock cognate 70)
- IBD - inflamatorna bolest creva (*engl.* inflammatory bowel disease)
- IFN - interferon
- IL - interleukin
- iRNK - informaciona ribonukleinska kiselina
- KCS - Klinički centar Srbije
- KMB - krvno-moždana barijera
- LC3 - (*engl.* microtubule-associated protein light chain 3)
- MBP - bazni protein mijelina (*engl.* myelin basic protein)

MFUB - Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu

MHC - glavni kompleks gena tkivne podudarnosti (*engl.* major histocompatibility complex)

M-MuLV - (*engl.* Moloney Murine Leukemia Virus)

MNĀPK - mononuklearne ćelije periferne krvi

MOG - mijelin oligodendrocitni glikoprotein

MRI - magnetna rezonanca (*engl.* magnetic resonance imaging, MRI)

MS - multipla skleroza

MSSS - skor težine multiple skleroze (*engl.* multiple sclerosis severity score)

MTORC1 - (*engl.* mechanistic target of rapamycin complex 1)

MyD88 - (*engl.* myeloid differentiation primary response 88)

NF-kB - nuklearni faktor - kB

NK - urođenoubilačke ćelije (*engl.* natural killer cells)

NLR - (*engl.* Nod-like receptors)

NO - azot monoksid

PCR - polimerazna reakcija lančanog umnožavanja

PI - fosfatidilinozitol

PIK3C3 - katalitička subjedinica tipa 3 PI3 kinaze

PPMS - primarno progresivna multipla skleroza

PRRs - (*engl.* pattern recognition receptors)

qPCR - kvantitativna polimerazna reakcija lančanog umnožavanja

RA - reumatoidni artritis

RB1CC1 - (*engl.* RB1-inducible coiled-coil 1)

RLR - (*engl.* RIG-like receptors)

RNK - ribonukleinska kiselina

ROK - reaktivni oblici kiseonika

RRMS - relapsno-remitentna multipla skleroza

SD - standardna devijacija

SLR - (sequestosome 1/ p62-like receptors)

SNP - polimorfizam pojedinačnih nukleotida (*engl.* single nucleotide polymorphism)

SPMS - sekundarno-progresivna multipla skleroza

SQSTM1 - sekvestazom 1 (*engl.* sequestasome)

TCR - T-ćelijski receptor (*engl.* T cell receptor)

TGF- $\beta$  - faktor transformacije rasta- $\beta$  (*engl.* transforming growth factor- $\beta$ )

Th - pomoćnički T-limfociti (*engl.* T helper)

TLR - receptor sličan Toll-u (*engl.* Toll-like receptor)

TNF - faktor nekroze tumora (*engl.* tumor necrosis factor)

Treg - regulatorni T-limfociti

ULK - (*engl.* Unc-51-like kinase)

UVRAG - (*engl.* UV irradiation resistance-associated tumor suppressor gene)

$\Delta$ Ct - ciklus praga detekcije (*engl.* treshold cycle)



## Biografija

Dr Irena Vuković Petrović je rođena 23. 01. 1988. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu upisala je školske 2007/2008. godine, a diplomirala je 2013. godine sa prosečnom ocenom 9,85.

Doktorske studije smeru Molekularna medicina upisala je 2013. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Za saradnika u nastavi za užu naučnu oblast imunologija na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu izabrana je 2015. godine, reizabrana 2016. godine, a u zvanje asistenta izabrana je 2017. godine.

Specijalizaciju iz imunologije je započela je u oktobru 2015. godine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu.

Od 2014. godine je istraživač saradnik na projektu Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, broj III 41025, pod rukovodstvom prof. dr Vladimira Trajkovića, na Institutu za mikrobiologiju i imunologiju.

Dr Irena Vuković Petrović dobitnik je stipendija za pohađanje škole iz oblasti translacione imunologije (*School for Translational Immunology*) u organizaciji COST (*European Cooperation in Science and Technology*), 2014. godine i Škole imunologije (*7th EFIS-EJI South East European Immunology School*) u organizaciji EFIS (*European Federation of Immunological Societies*) 2015. godine. Autor je ili koautor tri publikacije objavljene u celini u časopisima indeksiranim u Institute of Science Index bazi podataka (SCI) i većeg broja saopštenja na kongresima u zemlji i inostranstvu.

**Prilog 1.**

## **Izjava o autorstvu**

Potpisan: **Irena Vuković Petrović**

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**„Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 09. 01. 2019. godine

---

**Prilog 2.**

# **Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada**

Potpisan: **Irena Vuković Petrović**

Naslov rada „**Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom**“

Mentor: **Prof. dr Jelena Drulović**

Komentori: **Doc. dr Emina Milošević**  
**N. saradnik dr Verica Paunović**

Potpisani Irena Vuković Petrović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu **Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.**

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada.

Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 09. 01. 2019. godine

---

## Prilog 3.

# Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom“**

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

**Potpis doktoranda**

U Beogradu, 09. 01. 2019. godine

---



## Izjava o autorstvu

Potpisan: **Irena Vuković Petrović**

**Izjavljujem**

da je doktorska disertacija pod naslovom:

**„Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom“**

- rezultat sopstvenog istraživačkog rada,
- da predložena disertacija u celini ni u delovima nije bila predložena za dobijanje bilo koje diplome prema studijskim programima drugih visokoškolskih ustanova,
- da su rezultati korektno navedeni i
- da nisam kršio autorska prava i koristio intelektualnu svojinu drugih lica.

**Potpis doktoranda**

*Irena Vuković Petrović*



prilog 2.

# Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Potpisan: Irena Vuković Petrović

Naslov rada „Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom“

Mentor: Prof. dr Jelena Drulović

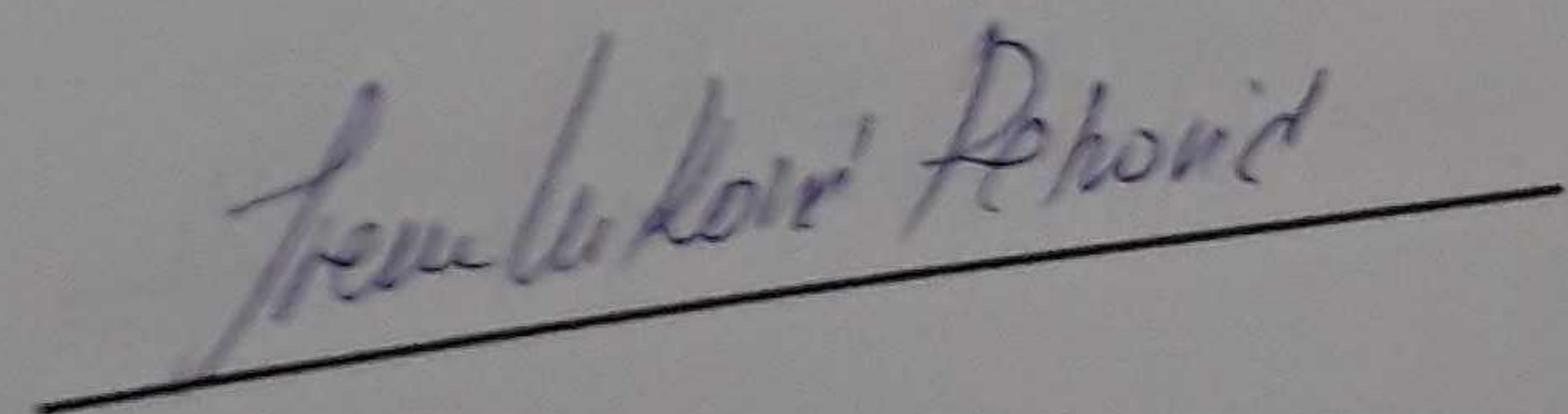
Komentori: Doc. dr Emina Milošević  
N. saradnik dr Verica Paunović

Potpisani Irena Vuković Petrović

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predao za objavljivanje na portalu Digitalnog repozitorijuma Univerziteta u Beogradu.

Dozvoljavam da se objave moji lični podaci vezani za dobijanje akademskog zvanja doktora nauka, kao što su ime i prezime, godina i mesto rođenja i datum odbrane rada. Ovi lični podaci mogu se objaviti na mrežnim stranicama digitalne biblioteke, u elektronskom katalogu i u publikacijama Univerziteta u Beogradu.

Potpis doktoranda



U Beogradu, 09. 01. 2019. godine



## Izjava o korišćenju

Ovlašćujem Univerzitetsku biblioteku „Svetozar Marković“ da u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu unese moju doktorsku disertaciju pod naslovom:

**„Ekspresija gena i proteina koji regulišu autofagiju u mononuklearnim ćelijama periferne krvi pacijenata sa multiplom sklerozom“**  
koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim priložima predao sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

Moju doktorsku disertaciju pohranjenu u Digitalni repozitorijum Univerziteta u Beogradu mogu da koriste svi koji poštuju odredbe sadržane u odabranom tipu licence Kreativne zajednice (Creative Commons) za koju sam se odlučio.

1. Autorstvo
2. Autorstvo – nekomercijalno
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerade
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima
5. Autorstvo – bez prerade
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima

Potpis doktoranda

Trambukić Petar

U Beogradu, 09. 01. 2019. godine