

UNIVERZITET U BEOGRADU

BIOLOŠKI FAKULTET

Ljiljana S. Stojković

Uloga polimorfizama i ekspresije gena za  
hemokine CX3C ligand 1 i CXC ligand 16 i  
njihove receptore u nastanku i progresiji  
multiple skleroze u Srbiji

doktorska disertacija

Beograd, 2013

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF BIOLOGY

Ljiljana S. Stojković

**Roles of Polymorphisms and Expression  
of Genes Coding for Chemokines  
CX3C Ligand 1 and CXC Ligand 16  
and Their Receptors in the Development  
and Progression of Multiple Sclerosis  
in Serbia**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2013

## **Mentori**

dr Maja Živković, viši naučni saradnik Instituta za nuklearne nauke “Vinča”

dr Dušanka Savić Pavićević, vanredni profesor Biološkog fakulteta Univerziteta u Beogradu

## **Članovi komisije**

dr Evica Dinčić, vanredni profesor Medicinskog fakulteta Vojnomedicinske akademije Univerziteta odbrane u Beogradu

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

*Ova doktorska disertacija je urađena u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, kao deo projekata čiji su rukovodioci dr Dragan Alavantić i dr Aleksandra Stanković, kojima se zahvaljujem što su mi pružili priliku da se bavim istraživanjima u oblasti molekularne genetike. Dr Aleksandri Stanković se zahvaljujem na entuzijazmu, stručnoj pomoći i pruženoj podršci u toku izrade doktorske disertacije.*

*Mentoru dr Maji Živković se zahvaljujem na osmišljavanju i realizaciji ove doktorske disertacije, na stručnim savetima i sugestijama koje mi je davala prilikom izrade disertacije.*

*Mentoru dr Dušanki Savić Pavićević se zahvaljujem na pregledu i oceni doktorske disertacije.*

*Zahvaljujem se dr Tamari Đurić Delić na saradnji i pomoći u statističkoj obradi rezultata. Mr Olji Stančić hvala na pomoći u eksperimentalnom delu izrade disertacije.*

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

*Svim kolegama iz Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku se zahvaljujem na podršci i uspešnom timskom radu.*

*Porodici i prijateljima hvala što su uz mene.*

*Mojim roditeljima hvala za sve što mi pružaju.*

# **Uloga polimorfizama i ekspresije gena za hemokine CX3C ligand 1 i CXC ligand 16 i njihove receptore u nastanku i progresiji multiple skleroze u Srbiji**

## **Rezime**

Multipla skleroza je hronična inflamatorna, autoimunska, demijelinizaciona i neurodegenerativna bolest centralnog nervnog sistema (CNS-a). Hemokini i njihovi receptori predstavljaju značajne medijatore inflamacije koji učestvuju u patogenezi određenih hroničnih inflamatornih i autoimunskih bolesti među kojima je i multipla skleroza. Ciljni hemokini u ovoj studiji, CX3C ligand 1 (CX3CL1) i CXC ligand 16 (CXCL16), specifični su po tome što postoje u dve forme - kao transmembranski adhezivni molekuli i kao solubilni hemoatraktanti koji nastaju nakon proteolitičkog sečenja vanćelijskih hemokinskih domena njihovih transmembranskih formi. U toku inflamatornog odgovora, na membrani endotelnih vaskularnih ćelija eksprimirani su CX3CL1 i CXCL16, a na membrani leukocita receptori za CX3CL1 (CX3CR1) i CXCL16 (CXCR6), te ovi hemokini i njihovi receptori posreduju u prodiranju leukocita iz krvi u tkivo zahvaćeno inflamacijom, podsticanjem hemotaksije i adhezije leukocita za aktivirani endotel krvnog suda.

Ova studija obuhvata genetsko-epidemiološku analizu polimorfizama zamena pojedinačnih nukleotida u kodirajućim regionima gena, koje rezultuju zamenama aminokiselina. To su polimorfizmi V249I i T280M u genu za CX3CR1, i I123T i A181V u genu za CXCL16. U prethodnim studijama je pokazano da ovi genski polimorfizmi menjaju funkcionalna svojstva CX3CR1 i CXCL16, kao i da su asocirani sa patogenezi određenih hroničnih inflamatornih bolesti. Uzimajući to u obzir, ova studija je imala za cilj da po prvi put ispita asocijaciju navedenih polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 sa nastankom i progresijom multiple skleroze. Primenom alel-specifične PCR metode i PIRA PCR-RFLP metode detektovani su genotipovi polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1, kod zdravih kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom. Utvrđeno je da haplotip I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> u genu za CX3CR1 ima značajno veću učestalost kod pacijenata sa relapsno-remitentnom (RR) formom, u

odnosu na pacijente sa sekundarno-progresivnom (SP) formom multiple skleroze, što znači da ovaj haplotip ima protektivni efekat na progresiju RR u SP formu bolesti. U bioinformatičkoj analizi informacionih spektara CX3CL1 i CX3CR1 je utvrđeno da upravo haplotip I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> kodira varijantu CX3CR1 koja može značajno da menja interakciju receptora sa CX3CL1, u odnosu na najčešću, referentnu varijantu (V<sub>249</sub>T<sub>280</sub>) CX3CR1. Metodom real-time PCR koja podrazumeva primenu *TaqMan*<sup>®</sup> eseja za diskriminaciju alela detektovani su genotipovi polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16. Pokazano je da su frekvencije alela T i V, genotipova koji sadrže alele T i V, kao i haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>, značajno više u grupi pacijenata u odnosu na kontrolnu grupu, a takođe i u grupi obolelih žena kada je ona upoređena sa grupom žena kontrola. To znači da su ređi aleli, T i V, i haplotip T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 genetski faktori rizika za nastanak multiple skleroze i da je ova asocijacija genetskih faktora sa nastankom bolesti polno specifična. Bioinformatička analiza informacionih spektara CXCL16 i CXCR6 pokazala je da haplotip T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>, koji predstavlja genetski faktor rizika za nastanak multiple skleroze, kodira varijantu CXCL16 koja može značajno menjati njegovu interakciju sa CXCR6, u poređenju sa referentnom varijantom (I123A181) CXCL16.

Ekspresija CX3CL1 i CXCL16 i njihovih receptora može biti konstitutivna ili inducibilna u neuronima i glijalnim ćelijama CNS-a. To ukazuje na značaj ovih molekula za normalno funkcionisanje CNS-a u bazalnim uslovima, a takođe i na njihovu moguću ulogu u patogenezi neuroinflamatornih bolesti. Dosadašnje studije ukazuju na ulogu hemokina CX3CL1 i CXCL16 i njihovih receptora u patogenezi životinjskog eksperimentalnog modela multiple skleroze. Stoga, pretpostavljeno je da je obrazac ekspresije humanih gena koji kodiraju ove molekule, kako u ćelijama tkiva CNS-a tako i u leukocitima periferne krvi, asociran sa patogeneзом multiple skleroze. U odnosu na ciljno tkivo humanog CNS-a, periferna krv je lako dostupna i predstavlja izvor potencijalnih sistemskih markera. U skladu sa tim, cilj ove studije je bio da se utvrdi da li obrazac genske ekspresije ispitivanih hemokina i hemokinskih receptora u mononuklearnim leukocitima periferne krvi može biti molekularni pokazatelj nastanka i progresije multiple skleroze. Metodom Real-time PCR, u uzorcima perifernih mononuklearnih leukocita zdravih kontrola i pacijenata sa RR formom multiple skleroze detektovana je i kvantifikovana ekspresija gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6, na

nivou njihovih iRNK, dok ekspresija gena za CX3CL1 nije detektovana u ispitivanim uzorcima. Utvrđeno je da postoji značajno povišena ekspresija gena za CX3CR1 u celoj analiziranoj grupi pacijenata sa RR formom multiple skleroze i u svakoj pojedinačnoj podgrupi pacijenata (u fazi relapsa tj. fazi remisije), u odnosu na grupu zdravih kontrola. To znači da povišeni nivo CX3CR1 iRNK u perifernim mononuklearnim leukocitima može biti molekularni marker nastanka RR forme multiple skleroze. U poređenju sa pacijentima u fazi relapsa, pacijenti u fazi remisije su imali značajno višu ekspresiju gena za CXCL16 i značajno nižu ekspresiju gena za CXCR6. Ovaj rezultat ukazuje da promene nivoa CXCL16 i CXCR6 iRNK u perifernim mononuklearnim leukocitima mogu biti molekularni markeri za razlikovanje faza relapsa i remisije u kliničkom toku RR forme multiple skleroze.

**Ključne reči:** multipla skleroza, gen, polimorfizam, ekspresija, hemokin, CX3CL1, CXCL16, CX3CR1, CXCR6

**Naučna oblast:** Molekularna biomedicina

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

**UDK broj:** [575.113::[612.112:612.124]]:616.83-004 (043.3)

# **Roles of Polymorphisms and Expression of Genes Coding for Chemokines CX3C Ligand 1 and CXC Ligand 16 and Their Receptors in the Development and Progression of Multiple Sclerosis in Serbia**

## **Abstract**

Multiple sclerosis is a chronic inflammatory, autoimmune, demyelinating and neurodegenerative disease of the central nervous system (CNS). Chemokines and their receptors are important mediators of inflammation, which are involved in pathogenesis of certain chronic inflammatory and autoimmune diseases including multiple sclerosis. Chemokines of interest in this study, CX3C ligand 1 (CX3CL1) and CXC ligand 16 (CXCL16), are specific in that they can exist either as transmembrane adhesion molecules or soluble chemoattractants being generated by proteolytic cleavage of their transmembrane forms' extracellular domains. During the inflammatory response, CX3CL1 and CXCL16 are expressed on the surface of vascular endothelium, while the leukocytes produce membrane receptors for CX3CL1 (CX3CR1) and CXCL16 (CXCR6). Therefore, these chemokines and their receptors mediate the infiltration of leukocytes from blood into the inflamed tissue areas, by stimulation of both chemotaxis and adhesion of leukocytes to the activated endothelium of blood vessels.

This study is based on genetic epidemiological analysis of single nucleotide polymorphisms, which are located in the coding regions of genes and result in amino acids' substitutions. These are V249I and T280M substitutions in the gene coding for CX3CR1, and I123T and A181V substitutions in the gene coding for CXCL16. In previous studies these polymorphisms have been associated with the functional properties of CX3CR1 and CXCL16 as well as the pathogenesis of certain chronic inflammatory diseases. Therefore, this study aimed to investigate the association of the polymorphisms in CX3CR1 and CXCL16 genes with the development and progression of multiple sclerosis. Using the allele-specific PCR and PIRA PCR-RFLP methods, genotypes of CX3CR1 V249I and T280M polymorphisms were detected in healthy controls and patients with multiple sclerosis. Following statistical analysis showed significantly higher frequency of CX3CR1 I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> haplotype in patients with relapsing-remitting (RR) form, compared to patients with secondary-progressive (SP) form of



multiple sclerosis, so this haplotype had a protective effect on progression of RR to SP form of the disease. By bioinformatic analysis of CX3CL1 and CX3CR1 information spectra, a CX3CR1 variant encoded by the I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> haplotype was shown to significantly alter CX3CL1-CX3CR1 interaction, compared to the most common, referent (V249T280) CX3CR1 variant. Real-time PCR method based on use of *TaqMan*® allelic discrimination assays enabled detection of genotypes of CXCL16 I123T and A181V polymorphisms. Statistical analysis pointed out the significantly higher frequencies of: T and V alleles, genotypes containing T and V alleles, and T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> haplotype, in patients' group compared to controls' group as well as in subgroup of female patients compared to female controls. Thus, the rare T and V alleles and T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> haplotype of I123T and A181V polymorphisms in CXCL16 gene represent genetic risk factors for multiple sclerosis, whereby the association of these genetic factors with disease onset is gender-specific. Bioinformatic analysis of CXCL16 and CXCR6 information spectra showed that the T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> haplotype encoded a CXCL16 variant, which could significantly change CXCL16-CXCR6 interaction, compared with the referent (I123A181) CXCL16 variant.

Expression of CX3CL1 and CXCL16 and their receptors may be constitutive or inducible in neurons and glial cells of the CNS. This indicates importance of these molecules for normal functioning of the CNS in basal conditions as well as their possible roles in pathogenesis of neuroinflammatory diseases. Previous studies indicated the roles of chemokines CX3CL1 and CXCL16 and their receptors in pathogenesis of the animal experimental model of multiple sclerosis. Therefore, it was assumed that the expression patterns of human genes coding for these molecules, in the cells of CNS as well as in peripheral leukocytes, were associated with pathogenesis of multiple sclerosis. In contrast to human CNS tissue, peripheral blood is available and represents the source of potential systemic markers. Accordingly, the aim of this study was to determine whether the gene expression patterns of the chemokines and chemokine receptors in peripheral blood mononuclear leukocytes might be associated with the onset and progression of multiple sclerosis. By Real-time PCR method, the expression of CX3CR1, CXCL16 and CXCR6 mRNAs was detected and quantified whereas expression of CX3CL1 gene was not detected, in peripheral mononuclear leukocytes of healthy controls and patients with RR form of multiple sclerosis. Significant increase in

CX3CR1 gene expression was found in patients with RR form of multiple sclerosis and also in each subgroup of patients (in relapse/remission), compared to healthy controls. This means that the elevated level of CX3CR1 mRNA in peripheral mononuclear leukocytes may be a molecular marker of the onset of RR multiple sclerosis. In comparison with patients in phase of relapse, patients in remission phase had significantly higher CXCL16 gene expression level and significantly lower CXCR6 gene expression level. This result suggests that changes in CXCL16 and CXCR6 mRNAs' levels in peripheral mononuclear leukocytes may represent molecular markers for distinguishing between phases of relapse and remission in the clinical course of RR form of multiple sclerosis.

**Keywords:** multiple sclerosis, gene, polymorphism, expression, chemokine, CX3CL1, CXCL16, CX3CR1, CXCR6

**Scientific field:** Molecular biomedicine

**Special topic:** Molecular genetics of multiple sclerosis

**UDC number:** [575.113::[612.112:612.124]]:616.83-004 (043.3)

## SKRAĆENICE

**1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>** - 1,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub>

**18S rRNK** - 18S ribozomalna RNK

**25(OH)D<sub>3</sub>** - 25-hidroksi vitamin D<sub>3</sub>

**A181V (Ala181Val)** - polimorfizam zamene alanina u valin na poziciji 181 u polipeptidnom lancu

**ADAM** (*engl.* Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein) - protein koji sadrži domene disintegrina i metaloproteinaza

**AIDS** (*engl.* Acquired Immuno-Deficiency Syndrome) - stečeni sindrom imunodeficijencije

**AK** - aminokiselina

**ANOVA** (*engl.* Analysis Of Variance) - analiza varijanse

**AP-1 (c-Jun)** - aktivatorni protein-1

**APC** (*engl.* Antigen Presenting Cell) - antigen-prezentujuća ćelija

**ApoE** - apolipoprotein E

**ApoE<sup>-/-</sup>** - jedinka sa izbačenim genom za ApoE

**ARMS** (*engl.* Amplification Refractory Mutation System) - PCR metoda zasnovana na korišćenju alel-specifičnih amplimera koji omogućavaju amplifikaciju sekvence DNK samo kada je ciljani alel prisutan u toj sekvenci

**bp** - bazni par

**c** (*engl.* complementary) DNK - jednolančana komplementarna DNK

**Ca<sup>++</sup>** - jon kalcijuma

**CCL** - CC ligandi (podfamilija hemokina sa CC- strukturnim motivom)

**CCR** - receptori za podfamiliju hemokina CCL

**CD** (*engl.* Cluster of Differentiation) - klaster diferencijacije

**CI** (*engl.* Confidence Interval) - interval pouzdanosti

**c-Jun (AP-1)** - aktivatorni protein-1

**CL** - C ligandi (podfamilija hemokina sa C- strukturnim motivom)

**CLEC16A** (*engl.* C-type Lectin domain family 16) - C-tip lektina 16A

**CNS** - centralni nervni sistem

**CNTF** (*engl.* Ciliary Neurotrophic Factor) - cilijarni neurotrofni faktor

**CR** - receptori za podfamiliju hemokina CL

**CS** (*engl.* Cross-Spectrum) - „kros-spektralni” (označava ukrštanje spektara)

**Ct** (*engl.* treshold Cycle) - broj ciklusa PCR na kome se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag

**CX3CL** - CX3C ligandi (podfamilija hemokina sa CX3C- strukturnim motivom)

**CX3CL1** - CX3C ligand 1

**CX3CR** - receptori za podfamiliju hemokina CX3CL

**CX3CR1** - CX3C receptor 1; receptor za CX3CL1

**CXCL** - CXC ligandi (podfamilija hemokina sa CXC- strukturnim motivom)

**CXCL16** - CXC ligand 16

**CXCR** - receptori za podfamiliju hemokina sa CXC- strukturnim motivom

**CXCR6** - CXC receptor 6; receptor za CXCL16

**CYCLA (PPIA)** (*engl.* Cyclophilin A) - ciklofilin A

**CYP27B1** (*engl.* Cytochrome P450 family 27 subfamily B peptide 1) - 25-OHD<sub>3</sub>-1alfa hidroksilaza

**DAG** - diacilglicerol

**DARC** (*engl.* Duffy blood group, Chemokine receptor) - nespecifični receptor za hemokine

**DEPC** (*engl.* Diethylpyrocarbonate) - dietilpirokarbonat

**DNK** - dezoksiribonukleinska kiselina

**DNKazaI** - dezoksiribonukleaza I

**dNTP** (*engl.* deoxyribonucleotide triphosphate) - dezoksiribonukleotid-trifosfat

**dUTP** (*engl.* deoxyuridine triphosphate) - dezoksiuridin-trifosfat

**E** - efikasnost

**EAE** (*engl.* Experimental Autoimmune Encephalomyelitis) - eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

**EBV** - Epstein-Barr virus

**EDSS** (*engl.* Expanded Disability Status Scale) - klinički parametar stepena invaliditeta

**EDTA** (*engl.* Ethylenediaminetetraacetic acid) - etilen-diamin-tetra-sirćetna kiselina

**EIIP** (*engl.* Electron-Ion Interaction Potential) - potencijal interakcije elektron-jon

**EM** (*engl.* Expectation Maximization) - makismalno predviđanje

**EtBr** - etidijum bromid

**FI** (*engl.* Forward Inner) primer - sens unutrašnji amplimer

**FO** (*engl.* Forward Outer) primer - sens spoljašnji amplimer

**GABA** (*engl.* Gamma-Aminobutyric Acid) - gama-aminobuterna kiselina

**GAPDH** (*engl.* Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase) - gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza

**gDNK** - genomska DNK

**GDP** (*engl.* Guanosine Diphosphate) - guanozin-difosfat

**GPCR** (*engl.* G-Protein-Coupled Receptor) - receptor kuplovan/spregnut sa G-proteinom

**GR** - glukokortikoidni receptor

**GTP** (*engl.* Guanosine Triphosphate) - guanozin-trifosfat

**GWAS** (*engl.* Genome Wide Association Study) - studija asocijacije na osnovu pretraživanja sekvenci celog genoma

**HIF1** (*engl.* Hypoxia Inducible Factor 1) - faktor 1 indukovano hipoksijom

**HIV** (*engl.* Human Immunodeficiency Virus) - humani virus imunodeficijencije

**HLA** - humani leukocitni antigeni

**HSP** (*engl.* Heat Shock Protein) - protein toplotnog stresa

**HW** - Hardy-Weinberg

**I123T (Ile123Thr)** - polimorfizam zamene izoleucina u treonin na poziciji 123 u polipeptidnom lancu

**ICAM-1** (*engl.* Intercellular Adhesion Molecule-1) - intercelularni adhezivni molekul-1

**IFNG** - interferon-gama

**IgG** - imunoglobulin G

**IL** - interleukin

**IL2RA** - alfa-lanac receptora za IL-2

**IL7R** - receptor za IL-7

**IP** - indeks progresije

**IP3** (*engl.* Inositol trisphosphate) - inozitol trifosfat

**IRAK1** (*engl.* Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase) - kinaza asociirana sa receptorom za IL-1

**IRF** - interferonski regulatorni faktor

**iRNK** - informaciona ribonukleinska kiselina

**IS** - informacioni spektar

**ISM** (*engl.* Information Spectrum Method) - metod informacionih spektara

**JAK1** - Janus kinaza 1

**JNK** (*engl.* c-Jun N-terminal Kinase) - c-Jun N-terminalna kinaza

**kDa** - kilodalton

**KMB** - krvno-moždana barijera

**LD** (*engl.* Linkage Disequilibrium) - neravnoteža vezanosti

**LDL** (*engl.* Low Density Lipoprotein) - lipoprotein male gustine

**LDLR<sup>-/-</sup>** - jedinka sa izbačenim genom za receptor za LDL

**LPS** - lipopolisaharid

**LSM** (*engl.* Lymphocyte Separation Medium) - medijum za razdvajanje limfocita

**MAPK** - mitogenom aktivirana protein-kinaza

**MBP** - mijelinski bazni protein

**MCP** (*engl.* Monocyte Chemotactic Protein) - protein koji stimuliše hemotaksiju monocita

**Mg<sup>++</sup>** - jon magnezijuma

**MHC** (*engl.* Main Histocompatibility Complex) - glavni kompleks histokompatibilnosti

**misRFLP** (*engl.* mismatch Restriction Fragment Length Polymorphism) primer - amplimer sa nekomplementarnom bazom, koji uvodi novo restrikciono mesto, u analizi RFLP

**MMP** (*engl.* Matrix Metalloproteinase) - metaloproteinaza matriksa

**MNE** (*engl.* Mean Normalized Expression) - srednja normalizovana ekspresija

**MOG** - mijelinski oligodendrocitni glikoprotein

**MS** - multipla skleroza

**MSSS** (*engl.* Multiple Sclerosis Severity Score) - parametar težine kliničke slike multiple skleroze

**MYD88** (*engl.* Myeloid Differentiation primary response 88) - faktor 88 primarne diferencijacije ćelija mijeloidne loze

**n** - broj

**Na<sup>+</sup>** - jon natrijuma

**NEAT1** (*engl.* Nuclear Enriched Abundant Transcript 1) - jedarni obilni transkript 1  
(duga nekodirajuća jedarna RNK)

**NFAT** - nuklearni faktor aktiviranih T-limfocita

**NF- $\kappa$ B** - nuklearni faktor- $\kappa$ B

**NINJ1** (*engl.* Nerve Injury-induced Protein-1) - neuronski faktor rasta indukovan povredom

**NK** (*engl.* Natural Killer) cells - ćelije prirodne ubice

**NMRI** (*engl.* Nuclear Magnetic Resonance Imaging) - nuklearno-magnetna rezonanca

**NO** - azot-oksidi

**O<sub>2</sub>** - molekularni kiseonik

**oligo(dT)<sub>18</sub>** - oligonukleotid koji se sastoji od 18 timinskih nukleotida

**OR** (*engl.* Odds Ratio) - odnos šansi

**oxLDL** (*engl.* oxidized Low Density Lipoprotein) - oksidovani lipoprotein male gustine

**p** (*engl.* probability) - verovatnoća

**PAA** - poliakrilamid

**PCR** (*engl.* Polymerase Chain Reaction) - lančana reakcija polimeraze

**PI** (*engl.* Phosphoinositide) - fosfoinozitol

**PIP2** (*engl.* Phosphatidylinositol bisphosphate) - fosfatidil-inozitol difosfat

**PIRA** (*engl.* Primer-Introduced Restriction Analysis) - analiza amplimerom uvedenog restrikcionog mesta

**PKC** - protein-kinaza C

**PLA<sub>2</sub>** (*engl.* Phospholipase A<sub>2</sub>) - fosfolipaza A<sub>2</sub>

**PLC** (*engl.* Phospholipase C) - fosfolipaza C

**PLD** (*engl.* Phospholipase D) - fosfolipaza D

**PLP** - proteolipidni protein

**poli(A)<sup>+</sup>** - 3' terminalni niz od 100-200 adeninskih nukleotida (u molekulima iRNK)

**PP MS** - primarno-progresivna forma multiple skleroze

**PPAR** (*engl.* Peroxisome Proliferator-Activated Receptor) - receptor aktiviran proliferatorom peroksizoma

**PPIA (CYCLA)** - peptidilprolil izomeraza A

**PTK** - protein-treonin-kinaza

**PTX** (*engl.* Pertussis Toxin) - pertuzijski toksin

**RFLP** (*engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism) - polimorfizam dužine restrikcionog fragmenta

**RFX4\_v3** (*engl.* Regulatory Factor X4 variant transcript 3) - transkripciona varijanta 3 regulatornog faktora X4

**RI** (*engl.* Reverse Inner) primer - antisens unutrašnji amplimer

**RIN** (*engl.* RNA Integrity Number) - numerički parametar integriteta RNK

**Rn** - normalizovani reporter

**RNK** - ribonukleinska kiselina

**RO** (*engl.* Reverse Outer) primer - antisens spoljašnji amplimer

**RR MS** - relapsno-remitentna forma multiple skleroze

**RT** - reverzna transkripcija

**SD** - standardna devijacija

**SDS** (*engl.* Sodium Dodecyl Sulfate) - natrijum dodecil sulfat

**SE** (*engl.* Standard Error) - standardna greška

**SEM** (*engl.* Stochastic Expectation Maximization) - stohastičko maksimalno predviđanje

**SNP** (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism) - polimorfizam pojedinačnog nukleotida

**SP MS** - sekundarno-progresivna forma multiple skleroze

**Sr** - srednja vrednost

**SR-PSOX** (*engl.* Scavenger Receptor that binds Phosphatidyl-Serine and Oxidized lipids) - receptor "čistač" koji vezuje fosfatidil-serin i oksidovane lipide

**STAT** (*engl.* Signal Transducer and Activator of Transcription) - transduktor signala i aktivator transkripcije

**Stdev** - Standardna devijacija

**Stgr** - Standardna greška

**T280M (Thr280Met)** - polimorfizam zamene treonina u metionin na poziciji 280 u polipeptidnom lancu

**TAE** - tris baza-acetat-EDTA

**TaiI (MaeII)** - naziv restrikcionog enzima dobijenog iz bakterije *Thermus aquaticus*

**Taq** - *lat.* *Thermus aquaticus*

**TBE** - tris baza-borat-EDTA

**Tc** (*engl.* T-cytotoxic) cells - citotoksični T-limfociti



**TCR** (*engl.* T-Cell Receptor) - T-ćelijski receptor

**TE** - tris-EDTA

**TEMED** - tetrametiletilendiamin

**TGFB** (*engl.* Transforming Growth Factor Beta) - transformišući faktor rasta beta

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

**TIMP1** (*engl.* Tissue Inhibitor of Metalloproteinases1) - tkivni inhibitor metaloproteinaza 1

**TLR** (*engl.* Toll-Like Receptor) - receptor sličan Toll-u

**TM** - transmembranski domen

**Tm** (*engl.* Temperature of melting) - temperatura topljenja

**TNF(A)** (*engl.* Tumor Necrosis Factor (Alpha)) - faktor nekroze tumora(-alfa)

**TNFR** (*engl.* Tumor Necrosis Factor Receptor) - receptor za faktor nekroze tumora

**TNFRSF1A** (*engl.* Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily member 1A) - receptor p55 za TNFA

**TRAF6** (*engl.* Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6) - faktor 6 asociran sa receptorom za faktor nekroze tumora

**T<sub>REG</sub>** - regulatorni T-limfociti

**TRI** (*engl.* Total RNA Isolation) - izolacija ukupne ćelijske RNK

**Tris** - tris(hidroksimetil)aminometan

**TWEAK** (*engl.* Tumor necrosis factor-like Weak inducer of apoptosis) - faktoru nekroze tumora sličan slabi induktor apoptoze

**TX527** - analog vitamina D

**TYK2** - tirozin-kinaza 2

**UNG** - uracil-N-glikozilaza

**UV zračenje** - ultravioletno zračenje

**V249I (Val249Ile)** - polimorfizam zamene valina u izoleucin na poziciji 249 u polipeptidnom lancu

**V28** receptor - CX3CR1

**VCAM-1** (*engl.* Vascular Cell Adhesion Molecule-1) - vaskularni adhezivni molekul-1

**ΔA** - razlika vrednosti amplitude

**ΔCt** - razlika vrednosti Ct

# SADRŽAJ

<b>1. UVOD .....</b>	<b>1</b>
1.1. Patogeneza multiple skleroze .....	1
1.2. Klinički tok multiple skleroze .....	7
1.3. Faktori rizika za nastanak multiple skleroze .....	11
1.3.1. Faktori sredine .....	12
1.3.1.1. Geografski faktori i vitamin D .....	12
1.3.1.2. Infekcije .....	13
1.3.2. Individualni faktori rizika: starost i pol .....	14
1.3.2.1. Starost .....	14
1.3.2.2. Pol .....	14
1.3.3. Genetski faktori rizika .....	15
1.3.3.1. Genski polimorfizmi u patogenezi multiple skleroze .....	16
1.3.3.2. Genska ekspresija u patogenezi multiple skleroze .....	18
1.4. Uloga hemokina i hemokinskih receptora u patogenezi multiple skleroze .....	21
1.4.1. Klasifikacija hemokina i hemokinskih receptora .....	21
1.4.2. Hemokini u mehanizmu inflamacije .....	23
1.4.3. Strukturno-funkcionalne karakteristike krvno-moždane barijere .....	23
1.4.4. Hemokini i hemokinski receptori u krvno-moždanoj barijeri, leukocitima i ćelijama centralnog nervnog sistema tokom patogeneze multiple skleroze .....	25
1.5. Hemokin CX3CL1 (CX3C ligand 1) i njegov receptor CX3CR1 (CX3C receptor 1) .....	28
1.5.1. Dve forme hemokina CX3CL1: struktura i funkcija .....	28
1.5.2. Regulacija odnosa nivoa transmembranske i solubilne forme CX3CL1 .....	31
1.5.3. Struktura gena za CX3CL1 .....	32
1.5.4. Polimorfizmi u genu za CX3CL1 .....	32

1.5.5. Regulacija transkripcije gena za CX3CL1 .....	33
1.5.6. Receptor CX3CR1: struktura i funkcija .....	34
1.5.7. Struktura gena za CX3CR1 .....	38
1.5.8. Polimorfizmi V249I i T280M u genu za CX3CR1 .....	38
1.5.9. Regulacija transkripcije gena za CX3CR1 .....	40
1.6. Hemokin CX3CL1 i njegov receptor CX3CR1 u centralnom nervnom sistemu i patogenezi neuroinflamatornih bolesti .....	40
1.7. Hemokin CXCL16 (CXC ligand 16) i njegov receptor CXCR6 (CXC receptor 6) .....	43
1.7.1. Dve forme hemokina CXCL16: struktura i funkcija .....	43
1.7.2. Struktura gena za CXCL16 .....	46
1.7.3. Polimorfizmi I123T i A181V u genu za CXCL16 .....	46
1.7.4. Regulacija transkripcije gena za CXCL16 .....	48
1.7.5. Receptor CXCR6: struktura i funkcija .....	48
1.7.6. Struktura gena za CXCR6 .....	50
1.7.7. Polimorfizmi u genu za CXCR6 .....	50
1.7.8. Regulacija transkripcije gena za CXCR6 .....	51
1.8. Hemokin CXCL16 i njegov receptor CXCR6 u centralnom nervnom sistemu i patogenezi neuroinflamatornih bolesti .....	51
<b>2. HIPOTEZA I CILJEVI .....</b>	<b>53</b>
<b>3. MATERIJAL I METODE .....</b>	<b>54</b>
3.1. Materijal .....	54
3.1.1. Uzorak .....	54
3.1.2. Aparatura .....	55
3.2. Metode .....	56
3.2.1. Izolacija DNK iz ćelija krvi, metodom po Kunkel-u i saradnicima .....	56
3.2.2. Izolacija DNK iz ćelija pune krvi, na aparatu ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation .....	58
3.2.3. Merenje koncentracije i provera kvaliteta izolovane DNK .....	60

3.2.4. Genotipizacija polimorfizama DNK, V249I i T280M, u genu za CX3CR1 reakcijom amplifikacije DNK <i>in vitro</i> (PCR) .....	60
3.2.5. Alel-specifična metoda PCR za detekciju polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 .....	61
3.2.6. Provera sinteze i veličine sintetisanih fragmenata DNK elektroforezom na agaroznom gelu .....	64
3.2.7. Metoda za determinaciju genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1, zasnovana na PIRA PCR-RFLP analizi .....	65
3.2.7.1. Protokol za PIRA PCR .....	66
3.2.7.2. Restrikciona analiza PIRA PCR produkta (RFLP analiza) .....	67
3.2.8. Analiza digestiranih fragmenata DNK elektroforezom na poliakrilamidnom (PAA) gelu .....	69
3.2.9. Genotipizacija polimorfizama DNK, I123T i A181V, u genu za CXCL16 lančanom reakcijom polimeraze (PCR) uz primenu <i>TaqMan</i> ® eseja za diskriminaciju alela .....	70
3.2.10. Izdvajanje mononuklearnih leukocita iz pune periferne krvi .....	74
3.2.11. Izolacija ukupne RNK iz mononuklearnih leukocita krvi primenom reagensa TRI Reagent Solution .....	75
3.2.12. Merenje koncentracije i provera kvaliteta izolovane RNK .....	76
3.2.13. Obrada uzoraka RNK dezoksiribonukleazom I (DNKazaI) .....	77
3.2.14. Reverzna transkripcija (RT) uzoraka RNK, nakon tretmana DNKazomI .....	78
3.2.15. Određivanje nivoa relativne ekspresije gena za hemokine CX3CL1 i CXCL16 i njihove receptore, CX3CR1 i CXCR6, metodom PCR u realnom vremenu (Real-time PCR) .....	80
3.2.16. Statistička obrada podataka .....	83
<b>4. REZULTATI .....</b>	<b>88</b>
4.1. Asocijacija polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 sa nastankom i progresijom multiple skleroze .....	88
4.1.1. Detekcija genotipova polimorfizama V249I i T280M	

u genu za CX3CR1 .....	88
4.1.2. Analiza efekata genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na nastanak i progresiju multiple skleroze .....	90
4.1.3. Analiza efekata haplotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na nastanak i progresiju multiple skleroze .....	94
4.1.4. Bioinformatička analiza predviđanja efekata polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na interakciju CX3CR1-CX3CL1 .....	96
4.1.5. Detekcija genotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 .....	98
4.1.6. Analiza efekata genotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 na nastanak i progresiju multiple skleroze .....	100
4.1.7. Analiza efekata haplotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 na nastanak i progresiju multiple skleroze .....	105
4.1.8. Bioinformatička analiza predviđanja efekata polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 na interakciju CXCL16-CXCR6 .....	107
4.2. Ekspresija gena za CX3CL1, CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima, u patogenezi multiple skleroze .....	109
4.2.1. Izbor optimalne endogene kontrole za normalizaciju rezultata ekspresije ispitivanih ciljnih gena .....	109
4.2.2. Određivanje relativne ekspresije gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima kontrola i pacijenata sa relapsno-remitentnom formom multiple skleroze .....	117
<b>5. DISKUSIJA .....</b>	<b>125</b>
5.1. Polimorfizmi u genima za CX3CR1 i CXCL16 u nastanku i progresiji multiple skleroze .....	125
5.1.1. Polimorfizmi V249I i T280M u genu za CX3CR1 .....	125
5.1.2. Polimorfizmi I123T i A181V u genu za CXCL16 .....	128
5.2. Relativna ekspresija gena za CX3CL1 i CXCL16 i njihove receptore, CX3CR1 i CXCR6, u patogenezi relapsno-remitentne forme	

multiple skleroze .....	133
5.2.1. Relativna ekspresija gena za CX3CL1 i CX3CR1 u perifernim mononuklearnim leukocitima kontrola i pacijenata .....	133
5.2.2. Relativna ekspresija gena za CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima kontrola i pacijenata .....	137
<b>6. ZAKLJUČCI .....</b>	<b>141</b>
<b>7. LITERATURA .....</b>	<b>143</b>

# 1. UVOD

## 1.1. Patogeneza multiple skleroze

Multipla skleroza (MS) je hronična inflamatorna i autoimunska bolest centralnog nervnog sistema (CNS) i jedan od najčešćih uzročnika neurološkog deficita kod mladih odraslih osoba (Compston i Coles, 2002). Francuski neurolog J. Charcot prvi je opisao multiplu sklerozu, 1868. godine, primetivši akumulaciju inflamatornih ćelija u perivaskularnim delovima nervnog tkiva mozga i kičmene moždine pacijenata sa periodičnim epizodama neurološke disfunkcije. Tada je uveden termin *skleroza diseminovanih plakova*, ili multipla skleroza (Charcot, 1868). E. Kabat je 1948. godine otkrio povišeni nivo imunoglobulina u cerebrospinalnoj tečnosti (likvoru) pacijenata sa multiplom sklerozom, što je predstavljalo još jedan dokaz inflamatorne prirode bolesti (Kabat i sar., 1948). Danas se u svetu multipla skleroza javlja sa učestalošću od oko 2-150 na 100 000 osoba, najčešće započinje u periodu između 20. i 40. godine života i značajno je učestalija kod žena nego kod muškaraca (Compston i Coles, 2002).

Ključni procesi u nastanku i progresiji multiple skleroze su: inflamacija, demijelinizacija, neurodegeneracija i glijoza (stvaranje ožiljaka) u tkivu CNS-a (Hauser i sar., 2001). Histopatološko obeležje multiple skleroze su plakovi koji predstavljaju inflamatorne lezije bele mase CNS-a i koji dinamično evoluiraju tokom progresije bolesti (Lucchinetti i sar., 2000). Usled narušavanja krvno-moždane barijere, koje između ostalih činilaca mogu prouzrokovati i neke vrste infekcija, leukociti periferne krvi prodiru kroz zid krvnih sudova u nervno tkivo i indukuju inflamaciju i demijelinizaciju (Feuerstein i sar., 1994; Raine, 1994). Na ovaj način nastaju plakovi koji predstavljaju akutne inflamatorne i demijelinizacione lezije u multiploj sklerozi.

Studije na životinjskim modelima multiple skleroze pokazale su da autoreaktivni T-limfociti (CD4+ ili CD8+) specifični za određene antigene mijelina imaju ključnu ulogu u inflamatornoj demijelinizaciji u CNS-u (Pettinelli i McFarlin, 1981; Ando i sar., 1989; Huseby i sar., 2001). Patogeneza inflamatornih plakova u multiploj sklerozi prevashodno je posredovana proinflamatornim CD4+ pomoćničkim T-limfocitima tipa 1 (Th1) koji produkuju interferon-gama (Ando i sar., 1989; Crawford i sar., 2004;

Traugott i Lebon, 1988; Olsson i sar., 1990; Link i sar., 1992). Interferon-gama (IFNG) ima višestruke proinflamatorne i patogene efekte u CNS-u, a to su: indukcija molekula humanih leukocitnih antigena (HLA) (opšti naziv za HLA: proteini glavnog kompleksa histokompatibilnosti - od *engl.* Main Histocompatibility Complex, *skr.* MHC; prisutni kod svih sisara) i stimulacija produkcije azot-oksida (NO) od strane makrofaga (Misko i sar., 1995), stimulacija transporta T-limfocita u tkivo CNS-a (Navikas i Link, 1996) i inicijacija ćelijske smrti oligodendrocita (Vartanian i sar., 1975). Th1 limfociti imaju jedinstvenu sposobnost da prodiru u delove zdravog tkiva CNS-a, učestvuju u iniciranju inflamacije i potpomažu naknadnu infiltraciju Th17 limfocita u nervno tkivo (O'Connor i sar., 2008). Th17 limfociti produkuju interleukin-17 (IL-17) koji ima važnu ulogu u indukciji eksperimentalnog modela multiple skleroze - eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (EAE) (Komiyama i sar., 2006). U lezijama pacijenata sa multiplom sklerozom pokazana je povišena ekspresija IL-17, što je potvrda učešća Th17 limfocita u mehanizmu inflamatorne demijelinizacije (Lock i sar., 2002). Posle susreta sa antigenom, u limfnim organima, neki autoreaktivni T-limfociti mogu da se diferenciraju u regulatorne T-limfocite (T<sub>REG</sub>) čija je funkcija da spreče ili suprimiraju aktivaciju drugih potencijalno štetnih autoreaktivnih T-limfocita. Pretpostavka da T<sub>REG</sub> limfociti sprečavaju oštećenje struktura u CNS-u tokom inflamacije i autoimunskog odgovora podržana je značajnim brojem studija na modelu EAE-a (McGeachy i sar., 2005; Yu i sar., 2005; Zhang i sar., 2004; Hori i sar., 2002). Kod pacijenata sa multiplom sklerozom je utvrđeno da CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> mogu biti funkcionalno deficitarni, imati poremećenu maturaciju ili migraciju iz timusa (Haas i sar., 2005; Viglietta i sar., 2004; Hug i sar., 2003; Kumar i sar., 2006). Kod zdravih osoba, autoreaktivni T-limfociti specifični za antigene mijelina se nalaze pod kontrolom regulatornih T-limfocita. Jedna od vodećih hipoteza koja objašnjava narušavanje ove imunološke regulacije i neadekvatnu aktivaciju naivnih autoreaktivnih T-limfocita u autoimunskim bolestima, zasnovana je na "molekularnoj mimikriji" (Abbas i Lichtman, 2006). Infekcija tkiva može da indukuje urođeni imunski odgovor koji je posredovan fagocitozom mikroba od strane antigen-prezentujućih ćelija (*engl.* Antigen Presenting Cells, *skr.* APC) - makrofaga i dendritskih ćelija. Aktivirane tkivne APC, putem prezentacije mikrobnog antigena, mogu da aktiviraju naivne autoreaktivne T-limfocite koji prepoznaju sopstveni antigen u tom tkivu. To se dešava kada postoji sličnost između peptidnog antigena

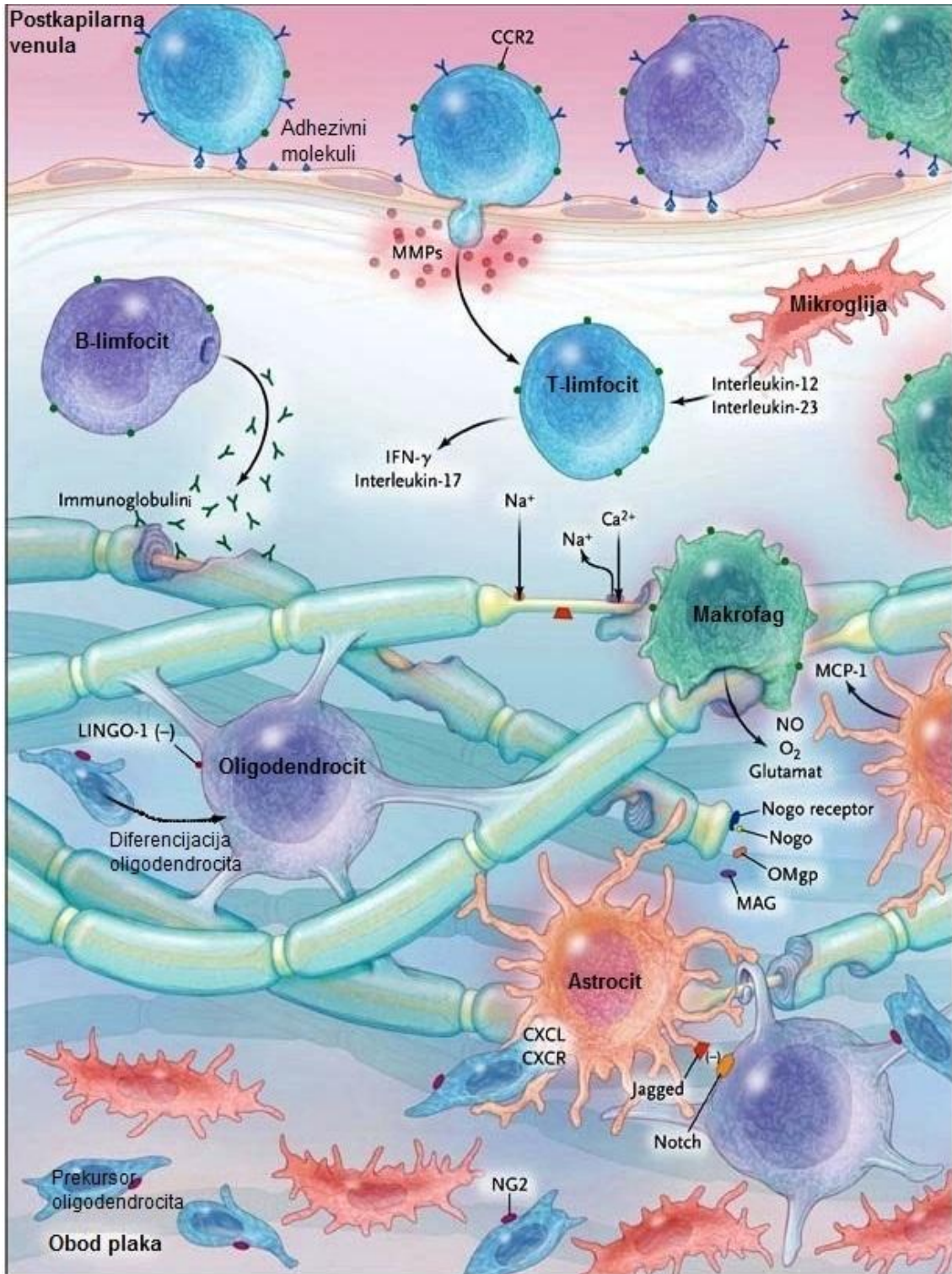


mikroorganizma i sopstvenog antigena ćelija domaćina i ta sličnost se definiše kao “molekularna mimikrija”. U slučaju “molekularne mimikrije”, imunski odgovor na antigen mikroorganizma dovodi do imunskog odgovora na sopstveni antigen, tj. do autoimunske reakcije. Fenomen „molekularne mimikrije“ u patogenezi lezija CNS-a u multiploj sklerozi podrazumeva postojanje stranog antigena koji oponaša antigen CNS-a (Libbey i sar., 2007).

U plakovima su detektovana autoantitela specifična za antigene mijelina. Više od 50% demijelinizacionih lezija odlikuje se depozicijom autoantitela i proteina sistema komplementa (Lucchinetti i sar., 2000). Deponovana autoantitela su specifična za mijelinske proteine, prvenstveno one lako dostupne na spoljašnjoj površini mijelinskog omotača, kao što su mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (*engl.* Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein, *skr.* MOG) i vanćelijski domeni proteolipidnog proteina (*engl.* Proteolipid Protein, *skr.* PLP). U modelu EAE-a u kome se za imunizaciju koristi MOG, dolazi do indukcije odgovora autoreaktivnih T-limfocita i B-limfocita (Genain i sar., 1995; Stefferl i sar., 1991; 't Hart i Massacesi, 2009). Dezintegracija mijelina dovodi do otkrivanja epitopa proteina unutrašnje površine omotača, npr. mijelinskog baznog proteina (*engl.* Myelin Basic Protein, *skr.* MBP), koji naknadno mogu biti mete antitela (Lalive, 2008). Antitela specifična za mijelinske proteine su najviše zastupljena, ali je prisustvo antitela na ćelijske komponente neurona takođe potvrđeno (Vyshkina i Kalman, 2008). Intratekalna sinteza imunoglobulina je karakteristična za pacijente sa multiplom sklerozom, a potvrđuje se detekcijom oligoklonalnih IgG traka i povišenim indeksom IgG u likvoru. Dokaz prisustva B-limfocita u likvoru, uz odsustvo odgovarajućih klonova u perifernoj cirkulaciji, sugerise da se proliferacija i odgovor B-limfocita na specifični antigen odigravaju upravo u CNS-u (Qin i sar., 1998; Owens i sar., 2003).

Kontinuirana aktivacija i proliferacija mijelin-reaktivnih T-limfocita koji sekretuju medijatore inflamacije u lezijama, dovodi do aktivacije mikroglije (rezidualni makrofazi CNS-a), monocitnih makrofaga i astrocita (glijalne ćelije koje odgovaraju na povredu) i deponovanja autoantitela. Svi ovi procesi rezultuju demijelinizacijom i gubitkom aksona usled njihovog oštećenja, što se odražava kroz određeni stepen neurološkog deficita pacijenata (Zamvil i Steinman, 2003). Kasnije tokom evolucije plakova, intenzitet inflamacije opada, a astrociti proliferišu stvarajući ožiljno tkivo.

Pojedini oligodendrociti (glijalne ćelije koje proizvode mijelin) bivaju uništeni usled inflamacije i glioze, dok izvestan broj prekursora oligodendrocita biva regrutovan u oblasti plakova gde ove ćelije proliferišu i učestvuju u procesu remijelinizacije aksona. Različiti molekuli kao što su citokini, adhezivni molekuli, metaloproteinaze matriksa, slobodni radikali i faktori rasta učestvuju u regulaciji procesa koji uzrokuju nastanak i evoluciju plakova u CNS-u (Frohman i sar., 2006). Shematski prikaz patogeneze inflamatornog plaka u multiploj sklerozi dat je na *slici UI* (Frohman i sar., 2006).



Slika U1. Patogeneza plaka u multiploj sklerozi. Preuzeto iz: Frohman i sar., 2006.

Gornja polovina slike: Adhezivni molekuli endotela postkapilarne venule interaguju sa receptorima na mononuklearnim leukocitima (T- i B- limfociti, makrofazi).

Metaloproteinaze matriksa (MMP) degradiraju proteine bazalne membrane i time potpomažu migraciju mononukleara u tkivo CNS-a. B-limfociti prodiru i oslobađaju imunoglobuline. Mikroglia oslobađa interleukine, IL-12 i IL-23, koji stimulišu pomoćničke T-limfocite da produkuju interferon-gama i IL-17. Makrofazi fagocituju mijelin (ostavljajući ogoljene površine aksona ) i oslobađaju štetne agense: NO, O<sub>2</sub> i glutamat. Inluks kalcijuma u aksone može izazvati dalje oštećenje aksona i neurodegeneraciju. Protein Nogo (inhibitor rasta aksona) interaguje sa svojim receptorom, sprečavajući regeneraciju aksona. Oligodendrocitni protein LINGO-1 je negativni regulator aktivnosti oligodendrocita, kada interaguje sa receptorom za Nogo.

*Donja polovina slike:* Periferno, duž oboda plaka koja predstavlja granicu između plaka i normalnog tkiva, nalaze se mikroglia i regrutovani prekursori oligodendrocita. Prekursori oligodendrocita mogu da uđu u zonu plaka, diferenciraju se u oligodendrocite i učestvuju u procesu remijelinizacije. Regrutovanje prekursora oligodendrocita je omogućeno interakcijom između CXC- hemokina (CXCL) koje sintetišu astrociti, i receptora za ove hemokine (CXCR) eksprimiranih na samim prekursorima oligodendrocita. Interakcija proteina „Jagged“ (na astrocitima) i „Notch“ (na oligodendrocitima) inhibira aktivnost oligodendrocita u procesu remijelinizacije.

U demijelinizovanim aksonima prenos impulsa je značajno usporen i iznosi svega 5-15% normalne brzine (Rusić-Stojiljković, 1998). Sa ciljem da se normalizuje brzina prenosa impulsa, duž ogoljenog dela aksona dolazi do abnormalne ekspresije Na<sup>+</sup> kanala na membrani, pojačanog ulaza Na<sup>+</sup> u aksoplazmu, što izaziva dodatno usporavanje kondukcije impulsa i mogući kondukcioni blok (Waxman i sar., 2004). Za ovim sledi efluks Na<sup>+</sup> u vanćelijski prostor, koji je praćen inluksom kalcijuma u aksoplazmu. Porast koncentracije jona Ca<sup>++</sup> može pokrenuti unutarćelijsku kaskadu koja konačno rezultuje neurodegeneracijom. Direktna posledica demijelinizacije je nemogućnost adekvatnog, tzv. skokovitog (saltatornog), provođenja nervnog impulsa duž aksona i njome se objašnjavaju klinički simptomi i znaci multiple skleroze (Compston i Coles, 2002).

Jedna od glavnih odlika multiple skleroze je diseminacija inflamatornih lezija CNS-a u prostoru i vremenu. Da bi se postavila dijagnoza multiple skleroze, neophodno je da ispitanik ima najmanje dva klinička događaja i prisustvo najmanje dve lezije u

CNS-u, pri čemu druga lezija ne mora biti klinički eksprimirana (Compston i Coles, 2002). Dijagnostikovanje ove bolesti se bazira na rezultatima kliničkih i laboratorijskih analiza, koji podrazumevaju: 1) detektovane lezije bele mase u različitim delovima CNS-a primenom nuklearno-magnetne rezonance (*engl.* Nuclear Magnetic Resonance Imaging, *skr.* NMRI), 2) detektovane dve ili više oligoklonalnih IgG traka u likvoru kojih nema u serumu i povišen nivo IgG u likvoru, kao pokazatelji intratekalne sinteze IgG antitela tj. inflamatornog i autoimunskog procesa u CNS-u i 3) detektovane produžene latencije evociranih potencijala u CNS-u, usled demijelinizacije (McDonald i sar., 2001).

Multipla skleroza je hronična neizlečiva bolest. Ipak, u savremenoj medicini postoji nekoliko vidova terapije za ovu bolest. Primena visokih doza kortikosteroida predstavlja rutinsku terapiju akutnog neurološkog pogoršanja u relapsu (Compston i Coles, 2008; Burton i sar., 2009). Dejstvo kortikosteroida je antiinflamatorno i ostvaruje se putem inhibicije transkripcije proinflamatornih citokina- interleukina-1 (IL-1) i faktora nekroze tumora-alfa (TNFA), kao i inhibicijom aktivacije T-limfocita i njihovog transporta u CNS (Sloka, 2005). Do 2011. godine, u Evropi i Sjedinjenim Američkim Državama (SAD) je odobreno šest vrsta tretmana za multiplu sklerozu koji se sprovode primenom odgovarajućih imunomodulatornih agenasa (Compston i Coles, 2008). Dva osnovna mehanizma delovanja imunomodulatornih lekova podrazumevaju: uticaj na aktivaciju i/ili tkivnu migraciju autoreaktivnih T-limfocita, i uticaj na međucelijske interakcije T-limfocita i ćelija u CNS-u (Compston i Coles, 2002). Svaki imunomodulatorni agens ima određenu efikasnost u pogledu smanjenja broja relapsa i sprečavanja progresije neurološkog deficita (Johnson, 2007).

## **1.2. Klinički tok multiple skleroze**

Na osnovu kliničkog toka, definisane su dve osnovne forme bolesti: relapsno-remitentna i primarno-progresivna multipla skleroza (Lublin i sar., 1996; Confavreux i Vukusic, 2002).

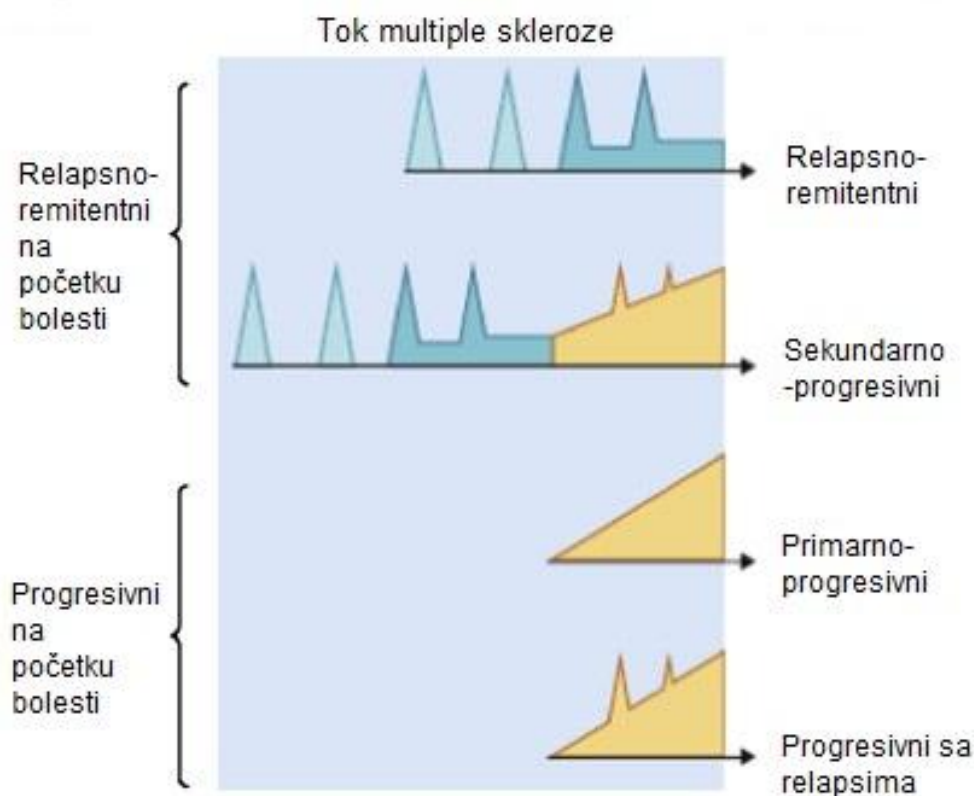
Oko 85% pacijenata od početka bolesti ima relapsno-remitentnu (RR) formu multiple skleroze, za koju su karakteristični jasno definisani periodi relapsa

(egzacerbacija) tj. pogoršanja neuroloških simptoma, koji traju najmanje 24 sata. Period između dva relapsa definiše se kao period remisije. Remisija traje najmanje 30 dana, tokom kojih dolazi do potpunog oporavka od posledica relapsa ili oporavka sa rezidualnim neurološkim deficitom. U prvim godinama bolesti, povećana učestalost relapsa uz nepotpun oporavak predviđa lošiji klinički ishod (Weinshenker, 1994). Ukoliko je na prvom NMRI pregledu detektovan veći broj lezija koje ukazuju na akutnu inflamaciju, prvenstveno gadolinijum-pozitivnih T1 lezija, utoliko se lošiji ishod bolesti očekuje.

Oko 40-50% pacijenata sa RR formom multiple skleroze ulazi u sekundarno-progresivnu fazu nakon 10 godina od početka bolesti, a čak oko 70% pacijenata nakon 20 godina trajanja bolesti. Sekundarno-progresivna (SP) faza multiple skleroze definisana je kao postepeno kontinuirano ireverzibilno pogoršanje neurološkog deficita nakon prethodne faze remisije, sa superponiranim relapsima ili bez njih. U odnosu na RR formu, SP faza asocirana je sa smanjenjem broja gadolinijum-pozitivnih T1 lezija na račun porasta stepena neurodegeneracije (Khoury i sar., 1994; Filippi i sar., 1995). U skladu sa tim, ranije faze relapsno-remitentne multiple skleroze odlikuju se osetljivošću na imunosupresivnu terapiju, koja se sa vremenom smanjuje i može se potpuno izgubiti u kasnijoj fazi sekundarno-progresivne multiple skleroze (Hohol i sar., 1999).

Oko 15% ukupnog broja pacijenata ima primarno-progresivnu (PP) formu multiple skleroze, koja se odlikuje kontinuiranom postepenom progresijom neurološkog deficita od početka bolesti, sa relapsima ili bez njih. Da bi se ustanovila kontinuirana progresija, neophodan je period praćenja od godinu dana. Kod primarno-progresivnih pacijenata lezije su najčešće detektovane u kičmenoj moždini, a znatno ređe u mozgu, u poređenju sa sekundarno-progresivnim pacijentima koji imaju približno isti stepen neurološkog deficita (Compston i Coles, 2002). Za primarno-progresivnu multiplu sklerozu karakteristično je odsustvo odgovora na imunomodulatornu terapiju (Hohol i sar., 1999).

Prikaz klasifikacije toka multiple skleroze dat je na *slici U2* (Confavreux i Vukusic, 2008).



Slika U2. Klasifikacija kliničkog toka multiple skleroze. Preuzeto iz: Confavreux i Vukusic, 2008.

Uopšteno, za relapsno-remitentnu formu prognoza toka bolesti je dobra, uz veliku verovatnoću potpunog oporavka posle pojedinačnih relapsa, ukoliko kod pacijenta dominiraju senzorni ili vizuelni simptomi. Prognoza je loša ako dominiraju motorni simptomi, naročito ako su koordinacija i balans poremećeni, a upravo to je tipično za progresivnu multiplu sklerozu (Compston i Coles, 2002).

Ireverzibilni (trajni) neurološki deficit u multiploj sklerozu objašnjavaju dva mehanizma: nepotpuni oporavak od relapsa i progresija bolesti (Compston i Coles, 2002). Neurološki deficit je posledica ireverzibilne demijelinizacije, oštećenja i gubitka aksona. Od početka bolesti, kod pacijenata sa RR formom multiple skleroze on se sporije akumulira nego kod PP pacijenata. Trajni neurološki deficit može biti predstavljen preko vrednosti kliničkog parametra stepena invaliditeta, EDSS (*skr.* od *engl.* Expanded Disability Status Scale) (Kurtzke, 1983), koja se postiže i održava najmanje narednih 6 meseci, pri čemu svaka sledeća vrednost EDSS mora biti veća od

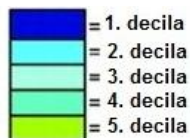
prethodne. Vrednost EDSS definiše stepen invaliditeta na osnovu kvantifikacije neurološkog deficita u funkcionalnim sistemima CNS-a: piramidalnom, cerebelarnom, senzornom, sistemu moždanog stabla, sistemu inervacije creva i bešike, vizuelnom, cerebralnom, i dr. Vrednosti EDSS imaju raspon od 0,0 do 10,0. Vrednost 0,0 odgovara normalnom neurološkom nalazu, vrednosti 1,0-4,5 imaju pacijenti sa multiplom sklerozom koji su pokretni, 5,0-9,5 imaju pacijenti sa odgovarajućim stepenom nepokretnosti, a EDSS vrednost 10,0 definiše smrt kao posledicu multiple skleroze (Kurtzke, 1983). Pacijenti sa RR formom bolesti često ulaze u sekundarno-progresivnu fazu kada EDSS dostigne vrednost oko 4,5. Međutim, u cilju procene progresije bolesti potrebno je znati za koliki je vremenski period od početka bolesti postignuta data vrednost EDSS. Korelisanje EDSS sa vremenom trajanja bolesti definiše vrednost parametra težine kliničke slike multiple skleroze, MSSS (*skr. od engl. Multiple Sclerosis Severity Score*). Algoritam za određivanje MSSS je primenjen na grupu od 9 892 pacijenta iz 11 država i tako je dobijen tzv. globalni MSSS (Roxburgh i sar., 2005). Vrednosti globalnog MSSS kreću se od 0,01 do 9,99 i prikazane su u referentnoj tabeli (*tabela UI*) (Roxburgh i sar., 2005). Na osnovu tabele svakom pacijentu sa poznatim EDSS i trajanjem bolesti izraženim u godinama, dodeljuje se odgovarajući MSSS. Vrednost MSSS od 5,00 ukazuje na srednju brzinu progresije bolesti, vrednost 9,00 na brzu progresiju (progredira brže od 90% pacijenata), a 1,00 na sporu progresiju (progredira brže od 10% pacijenata). Delovi *tabele UI* (Roxburgh i sar., 2005) koji su obojeni različitim bojama predstavljaju tzv. decile. Svaka decila definiše jedan obrazac progresije multiple skleroze za odgovarajuće vrednosti EDSS i različite dužine trajanja bolesti.



Tabela U1. Vrednosti globalnog MSSS.

	0	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4	4.5	5	5.5	6	6.5	7	7.5	8	8.5	9	9.5	EDSS
1	0.67	2.44	4.30	5.87	7.08	7.93	8.64	9.09	9.35	9.50	9.63	9.74	9.84	9.90	9.94	9.97	9.98	9.98	9.99	
2	0.53	2.01	3.69	5.24	6.46	7.27	7.98	8.58	8.95	9.18	9.38	9.59	9.79	9.88	9.93	9.97	9.99	9.99	9.99	
3	0.45	1.77	3.34	4.82	6.00	6.81	7.54	8.14	8.55	8.83	9.07	9.35	9.63	9.77	9.86	9.92	9.97	9.98	9.99	
4	0.35	1.45	2.87	4.27	5.41	6.24	6.98	7.65	8.12	8.42	8.70	9.08	9.47	9.68	9.80	9.88	9.95	9.98	9.99	
5	0.30	1.28	2.60	3.90	4.95	5.79	6.58	7.26	7.75	8.08	8.38	8.83	9.32	9.60	9.76	9.86	9.95	9.98	9.99	
6	0.25	1.13	2.33	3.54	4.55	5.38	6.14	6.81	7.33	7.68	7.98	8.50	9.08	9.45	9.68	9.81	9.93	9.97	9.99	
7	0.24	1.04	2.10	3.17	4.13	4.96	5.75	6.46	6.98	7.32	7.65	8.24	8.91	9.33	9.59	9.76	9.90	9.95	9.99	
8	0.21	0.94	1.92	2.93	3.81	4.57	5.36	6.10	6.61	6.95	7.32	7.97	8.71	9.21	9.55	9.74	9.89	9.96	9.99	
9	0.21	0.88	1.76	2.65	3.45	4.17	4.93	5.64	6.14	6.50	6.90	7.65	8.53	9.09	9.47	9.70	9.87	9.95	9.99	
10	0.19	0.78	1.53	2.34	3.10	3.79	4.55	5.28	5.77	6.14	6.58	7.39	8.31	8.92	9.34	9.61	9.83	9.94	9.99	
11	0.17	0.71	1.40	2.13	2.82	3.46	4.21	4.94	5.42	5.82	6.30	7.18	8.15	8.79	9.24	9.52	9.78	9.92	9.98	
12	0.16	0.64	1.28	1.98	2.64	3.25	3.94	4.63	5.13	5.54	6.03	6.92	7.93	8.63	9.13	9.43	9.71	9.88	9.97	
13	0.13	0.57	1.14	1.80	2.44	3.05	3.70	4.38	4.91	5.32	5.80	6.74	7.83	8.55	9.03	9.34	9.65	9.85	9.96	
14	0.11	0.49	1.03	1.70	2.33	2.91	3.55	4.26	4.82	5.23	5.70	6.56	7.59	8.34	8.86	9.20	9.57	9.82	9.95	
15	0.10	0.45	0.99	1.64	2.26	2.82	3.44	4.14	4.68	5.09	5.51	6.33	7.41	8.17	8.70	9.11	9.51	9.78	9.94	
16	0.09	0.38	0.85	1.42	1.99	2.56	3.17	3.86	4.41	4.81	5.18	6.00	7.14	7.97	8.54	9.04	9.49	9.75	9.94	
17	0.05	0.32	0.76	1.28	1.77	2.30	2.95	3.65	4.17	4.55	4.94	5.74	6.89	7.77	8.38	8.99	9.52	9.79	9.96	
18	0.04	0.26	0.66	1.12	1.57	2.09	2.70	3.37	3.89	4.27	4.62	5.43	6.62	7.54	8.23	8.94	9.51	9.78	9.96	
19	0.05	0.28	0.63	1.00	1.39	1.89	2.50	3.19	3.72	4.12	4.49	5.35	6.59	7.51	8.22	8.98	9.57	9.81	9.96	
20	0.05	0.26	0.59	0.94	1.29	1.71	2.29	2.99	3.51	3.93	4.30	5.15	6.43	7.45	8.23	8.98	9.58	9.80	9.95	
21	0.05	0.30	0.66	1.02	1.39	1.77	2.34	2.97	3.43	3.83	4.21	5.09	6.35	7.33	8.08	8.87	9.49	9.77	9.96	
22	0.04	0.23	0.54	0.90	1.28	1.66	2.20	2.82	3.29	3.69	4.09	5.04	6.35	7.35	8.10	8.84	9.42	9.73	9.95	
23	0.05	0.27	0.58	0.91	1.26	1.64	2.19	2.78	3.21	3.69	4.19	5.16	6.47	7.46	8.20	8.87	9.43	9.75	9.95	
24	0.05	0.24	0.52	0.86	1.25	1.63	2.15	2.71	3.09	3.52	4.01	5.03	6.36	7.38	8.15	8.81	9.39	9.74	9.96	
25	0.05	0.23	0.47	0.77	1.15	1.56	2.05	2.53	2.84	3.21	3.74	4.88	6.26	7.24	8.00	8.73	9.35	9.75	9.98	
26	0.05	0.20	0.45	0.78	1.17	1.58	2.08	2.63	2.99	3.40	3.95	5.02	6.39	7.44	8.21	8.89	9.48	9.80	9.96	
27	0.05	0.22	0.48	0.78	1.15	1.56	2.03	2.56	2.91	3.29	3.86	4.93	6.33	7.38	8.14	8.91	9.56	9.85	9.98	
28	0.04	0.17	0.40	0.74	1.16	1.52	1.88	2.39	2.76	3.04	3.46	4.54	5.99	7.07	7.90	8.75	9.45	9.80	9.98	
29	0.03	0.18	0.47	0.80	1.19	1.51	1.79	2.27	2.68	3.01	3.41	4.35	5.68	6.76	7.66	8.62	9.38	9.75	9.96	
30	0.01	0.13	0.45	0.82	1.19	1.45	1.69	2.23	2.75	3.13	3.50	4.35	5.61	6.66	7.54	8.47	9.27	9.67	9.91	

Godine



Preuzeto iz: Roxburgh i sar., 2005.

### 1.3. Faktori rizika za nastanak multiple skleroze

Multipla skleroza je kompleksna bolest u čijoj patogenezi učestvuju brojni faktori. Oni se dele u dve osnovne grupe, a to su genetski faktori i faktori sredine. U kliničkim istraživanjima su pokazani trendovi da određeni pacijenti (žene i svi oboleli pre 35. godine), sa određenim tokom bolesti (RR sa dugim intervalima između relapsa i potpunim oporavkom posle relapsa) i određenim simptomima bolesti (senzorni umesto motornih simptoma tokom relapsa) imaju bolju prognozu. Buduća istraživanja nastaviće da se bave identifikacijom genetskih i sredinskih faktora i njihovih mogućih interakcija u patogenezi multiple skleroze. To će omogućiti potpunije razumevanje ove bolesti, sa

krajnjim ciljem poboljšanja terapijskih tretmana kod obolelih ili sprečavanja nastanka bolesti (Compston i Coles, 2002; Noseworthy i sar., 2000).

### **1.3.1. Faktori sredine**

Faktori sredine koji su do sada najčešće asocirani sa rizikom za multiplu sklerozu su: geografski faktori, unos vitamina D i infekcije određenim patogenima.

#### **1.3.1.1. Geografski faktori i vitamin D**

Multipla skleroza je bolest tipična za regione sa umerenom klimom. Severna Evropa, Kanada, SAD, Izrael, Novi Zeland i delovi Australije predstavljaju oblasti visokog rizika, gde učestalost bolesti iznosi 0.1-0.2 %. Uopšteno, stanovnici u regionima iznad 40° geografske širine imaju veći rizik za oboljevanje od multiple skleroze u odnosu na stanovnike u drugim regionima. Ekvatorijalne oblasti Azije, Afrike i južne Amerike su niskog rizika, sa učestalošću oboljevanja od oko 0.005% (Kantarci i Wingerchuk, 2006). Pretpostavlja se da različit intenzitet sunčevog zračenja kome su ljudi u oblastima različitih geografskih širina izloženi može uticati na rizik za oboljevanje, pri čemu je smanjeni intenzitet zračenja asociran sa povećanim rizikom. Pored geografske širine, nadmorska visina je povezana sa intenzitetom sunčevog zračenja, a učestalost multiple skleroze je obrnuto proporcionalna nadmorskoj visini (Ascherio i Munger, 2007). Izlaganje sunčevom UV zračenju je važno za sintezu vitamina D3 u koži. Takođe, forme (D2 i D3) vitamina D se unose putem hrane. Nivo vitamina D može da utiče na rizik za nastanak multiple skleroze (Ebers 2008; Cantorna 2008). Vitamin D3 se hidroksilacijom u jetri i bubrezima prevodi u fiziološki aktivan 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamin D3 koji se transportuje u različite ciljne ćelije gde aktivira ili inhibira transkripciju odgovarajućih ciljnih gena. Preko aktivnosti produkata ciljnih gena, vitamin D učestvuje u resorpciji kalcijuma iz creva u krv i njegovoj ugradnji u kosti, a takođe i u unutarćelijskom transportu kalcijuma čime ostvaruje ulogu u regulaciji proliferacije i diferencijacije ćelija (Holick, 2004). Prekursorni oblik aktivnog vitamina D (25(OH)D3) je lako merljiv u serumu, a njegova koncentracija varira u zavisnosti od godišnjeg doba (intenziteta sunčevog zračenja) i načina ishrane (Munger i sar., 2004;

Munger i sar., 2006). Pokazana je korelacija između smanjenja rizika za nastanak multiple skleroze i porasta nivoa 25(OH)D3 u serumu (Munger i sar., 2004; Munger i sar., 2006). Kod obolelih koji su tretirani visokim dozama vitamina D, došlo je do poboljšanja kliničke slike u pogledu smanjenja učestalosti relapsa i redukcije proliferacije T-limfocita (Burton i sar., 2010). Pretpostavka o ulozi 1,25(OH)<sub>2</sub> vitamina D3 u nastanku i progresiji multiple skleroze podržana je činjenicom da ovaj vitamin ostvaruje antiinflamatorne i antiautoimunske efekte, posredstvom regulacije urođenog i stečenog imunskog odgovora (Hewison, 2010).

### **1.3.1.2. Infekcije**

Postoje dve glavne hipoteze o infekcijama kao potencijalnim faktorima rizika za nastanak multiple skleroze: „virusna hipoteza” i „hipoteza rasprostranjenosti” (Zuvich i sar., 2009). Prema virusnoj hipotezi, osoba ima povećan rizik za oboljevanje samo ukoliko je inficirana određenim virusom u periodu puberteta/adolescencije, dok ista infekcija tokom ranog detinjstva smanjuje rizik. Hipoteza rasprostranjenosti podrazumeva postojanje još neidentifikovanog patogena asociranog sa multiplom sklerozom, koji je visoko rasprostranjen u regionima visokog rizika za bolest. I prema ovoj hipotezi, životno doba u kome dođe do infekcije određuje stepen rizika za oboljevanje od multiple skleroze.

Jedan od mikroorganizama koji se najčešće dovode u vezu sa multiplom sklerozom je Epstein-Barr virus (EBV). On pripada porodici herpesvirusa, inficira B-limfocite i epitelne ćelije farinksa, u njima se replikuje i izaziva akutnu infektivnu mononukleozu. Nakon akutne infekcije, EBV se trajno zadržava u B-limfocitima domaćina (Epstein i Crawford, 1999). Uočeno je da kasna virusna infekcija praćena mononukleozom doprinosi značajno većem riziku za multiplu sklerozu, u odnosu na asimptomatsku infekciju u ranom detinjstvu ili seronegativnost na EBV (Ascherio i Munger, 2007). U moždanim opnama pacijenata sa sekundarno-progresivnom multiplom sklerozom otkriveno je prisustvo ektopičnih folikula koji sadrže dendritske ćelije, T-limfocite i proliferišuće B-limfocite u kojima je detektovana latentna infekcija EB virusom (Franciotta i sar., 2008). Prisustvo folikula je asocirano sa ranijom pojavom bolesti, većim oštećenjem korteksa i ranijom smrću (Serafini i sar., 2004). U kontekstu

infekcije EBV-om, autoimunski napad usmeren na mijelinske i/ili neuronske antigene može biti lokalnog karaktera (iz folikula) ili može biti posledica sistemskog imunskog odgovora na virusnu infekciju B-limfocita pozicioniranih u folikulima CNS-a.

### **1.3.2. Individualni faktori rizika: starost i pol**

#### **1.3.2.1. Starost**

Za razliku od hroničnih inflamatornih i autoimunskih bolesti čija učestalost raste sa starenjem (Ebers, 2008), multipla skleroza se javlja najčešće kod mladih odraslih ljudi i stoga dugotrajno narušava kvalitet života. Ona tipično počinje u periodu između 20. i 40. godine života (Hauser i Goodkin, 1998). Rizik za oboljevanje je veoma nizak u detinjstvu, najviši je oko 25. godine, dok izraženo opada posle 50. godine (Ascherio i Munger, 2007). Starost na početku bolesti je asocirana sa tokom i prognozom bolesti - kasnije oboljevanje se povezuje sa bržom progresijom multiple skleroze. Pokazano je da pacijenti koji su kao mlađi oboleli imaju sporiju progresiju bolesti, ali i da ranije dostižu EDSS vrednost od 6 (Tremlett i sar., 2006). Razlike u kliničkom toku su najuočljivije na početku bolesti, a kada EDSS pređe vrednost 4, starosno doba u kome se javlja trajna onesposobljenost nije određeno inicijalnim tokom bolesti (Confavreux i Vukušić, 2006).

#### **1.3.2.2. Pol**

Učestalost multiple skleroze je značajno veća kod žena nego kod muškaraca. Godišnje u svetu oboli oko 3,6/100 000 žena i 2,0/100 000 muškaraca (Alonso i Hernan, 2008). Iako ženski pol nosi veći rizik za oboljevanje, rezultati velikog broja studija pokazuju da obolele žene imaju bolju prognozu i češći benigni tok bolesti nego muškarci (Bergamaschi, 2007; Glad i sar., 2009). Žene sa relapsno-remitentnim tokom multiple skleroze imaju duži period dostizanja vrednosti EDSS od 4 (Koutsis i sar., 2010) ili prelaska u sekundarno-progresivnu formu bolesti (Koch i sar., 2010). Osim toga, žene i muškarci se razlikuju i prema odgovoru na terapiju (Trojano i sar., 2009; Li i sar., 2001).

Polne razlike koje se tiču učestalosti multiple skleroze, njenog kliničkog toka i odgovora na terapiju mogu biti prouzrokovane razlikama koje su uočene između polova na funkcionalnom nivou: imunskog sistema, CNS-a i gena lociranih na polnim hromozomima (Greer i McCombe, 2011).

### **1.3.3. Genetski faktori rizika**

Rizik za oboljevanje od multiple skleroze određivan je za članove uže i šire porodice. Pokazan je viši rizik za oboljevanje kada su upoređivani roditelji i deca (2%), i braća i sestre (3%), nego kada su međusobno upoređivane osobe koje su u daljem srodstvu (Compston i Coles, 2002). Takođe, značajno viši rizik od oboljevanja imaju deca čija su oba roditelja obolela (20%), u poređenju sa decom čiji je jedan roditelj oboleo (2%). Maksimalni rizik za oboljevanje postoji kod monozigotnih blizanaca. Ukoliko je jedan monozigotni blizanac oboleo, rizik da i drugi blizanac oboli iznosi oko 30%. Osobe usvojene od strane porodica čiji je član oboleo od multiple skleroze nemaju povećan rizik za oboljevanje (Compston i Coles, 2002). Svi ovi podaci ukazuju na značaj genetske komponente u patogenezi multiple skleroze. Ne postoji jasan mehanizam nasleđivanja multiple skleroze. Ipak, jasno je da postoji nelinearna veza između rizika za oboljevanje i stepena srodstva u porodicama (Compston i Coles, 2002; Hoppenbrouwers i Hintzen, 2011).

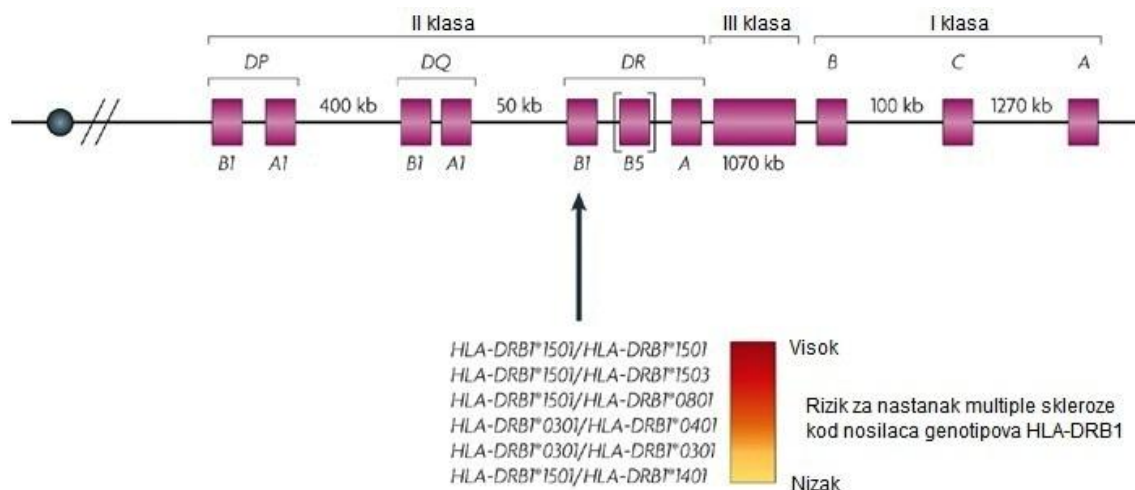
Multipla skleroza je kompleksna poligenetska bolest (Compston, 1999). Genetski faktori odgovorni za nastanak poligenetskih bolesti nisu pojedinačne genske mutacije koje prouzrokuju sintezu aberantnih proteinskih proizvoda, već su to mnogobrojni prirodni genski polimorfizmi. Oni deluju pojedinačno ili putem epistaze, a svaki genski polimorfizam može dati mali doprinos nekom poznatom ili još uvek nedefinisanim strukturnom ili funkcionalnom entitetu. Preko prisustva čestih genskih polimorfizama, čija je učestalost veća od 5% u populaciji, mogu se objasniti prevalenca i heritabilnost multiple skleroze (Hoppenbrouwers i Hintzen, 2011). Takođe je moguće da retke alelske varijante, sa učestalošću od 1% do 5% u populaciji, imaju naročitog uticaja na heritabilnost u porodicama sa više od dva obolela člana (Yang i sar., 2005). Genski polimorfizmi kao faktori rizika za nastanak bolesti mogu biti identifikovani u porodičnim studijama vezanosti ili studijama asocijacije, na osnovu pretraživanja

sekvenci gena kandidata ili celog genoma (*engl.* Genome Wide Association Study, *skr.* GWAS).

U genetskim studijama, najčešći tip polimorfizama koji se izučavaju kao potencijalni faktori rizika za patogenezu bolesti predstavljaju polimorfizmi pojedinačnih nukleotida (*engl.* Single Nucleotide Polymorphism, *skr.* SNP) u genima ili regulatornim regionima u blizini gena. Za mnoge od ovih gena tek treba da se razotkrije njihova uloga u nastanku ili progresiji bolesti. Ipak, za značajan broj novootkrivenih genskih lokusa asociranih sa rizikom za multiplu sklerozu pokazano je da imaju ulogu u imunskom odgovoru (Hoppenbrouwers i Hintzen, 2011).

### 1.3.3.1. Genski polimorfizmi u patogenezi multiple skleroze

S obzirom na visoku polimorfnost gena koji kodiraju molekule humanih leukocitnih antigena (HLA) i na važnu ulogu ovih molekula u adekvatnoj aktivaciji ćelijskog i humoralnog imunskog odgovora (Abbas i Lichtman, 2006), polimorfizmi u hromozomskom regionu HLA (6p21.3) (*slika U3*) do sada su asocirani sa većinom humanih autoimunskih bolesti među kojima je i multipla skleroza (Shiina i sar., 2004).



*Slika U3.* Tri klase gena u regionu HLA, na hromozomu 6p21.3, i asocijacija lokusa HLA-DRB1 sa rizikom za nastanak multiple skleroze. *Preuzeto iz: Oksenberg i sar., 2008.*

Asocijacija gena u regionu HLA sa multiplom sklerozom otkrivena je 1972. godine (Jersild i sar., 1972; Naito i sar., 1972). Procenjeno je da genski polimorfizmi u HLA regionu čine oko 20-60% genetske osnove rizika za oboljevanje od ove bolesti (Haines i sar., 1998). Postoje dokazi da mehanizam koji leži u osnovi asocijacije regiona HLA sa patogenezom multiple skleroze podrazumeva prezentaciju specifičnog peptida mijelinskog proteina (kao što je MBP), posredstvom njegovog vezivanja za molekule II klase HLA, specifičnim mijelin-reaktivnim T-limfocitima koji se ovim putem aktiviraju (Hohlfeld i Vekerle, 2001; Sospedra i Martin, 2005; McFarland i Martin, 2007). U dosadašnjim GWAS studijama, određeni aleli lokusa HLA-DRB1 (pojedinačni ili u haplotipu) su istaknuti kao faktori rizika za multiplu sklerozu sa izuzetnom statističkom značajnošću (Baranzini SE, 2011). Njihova asocijacija sa rizikom za nastanak multiple skleroze je utvrđena u gotovo svim evropskim populacijama, sa izuzetkom nekih mediteranskih, a najjača je u populacijama severne Evrope. Postojanje *cis-* i/ili *trans-* efekata alela HLA-DRB1 lokusa sugerise na uspostavljanje genetskog gradijenta rizika za nastanak multiple skleroze (*slika U3*) (Barcellos i sar., 2006; Dyment i sar., 2005; Oksenberg i sar., 2008). Postoje dokazi o asocijaciji između alela HLA-DRB1\*15 i određenih faktora sredine, kao što su unos vitamina D (Ramagopalan i sar., 2009) i infektivna mononukleoza prouzrokovana EB virusom (Nielsen i sar., 2007). Asocijacija regiona HLA (polimorfizam rs3135388) sa rizikom za oboljevanje od multiple skleroze potvrđena je i u Srbiji (Živković i sar., 2009).

Nakon otkrića regiona HLA, prošao je dug period pre nego što su otkriveni drugi genetski faktori rizika za multiplu sklerozu. Jedan od razloga za to je što je, u odnosu na HLA, doprinos ostalih genetskih varijanti riziku za oboljevanje relativno mali. Takođe, u genetske studije su često uključene heterogene populacije, te je statistička moć studija nedovoljna. Od nedavno, istraživanja u oblasti genetike multiple skleroze fokusirana su na pristup GWAS. Do sada su objavljeni rezultati samo nekoliko GWASs (Hafler i sar., 2007; Comabella i sar., 2008; Baranzini i sar., 2008; ANZgene, 2009; Jakkula i sar., 2010; Sanna i sar., 2010; Nischwitz i sar., 2010). Ovi rezultati, zajedno sa dosadašnjim replikativnim studijama (Rubio i sar., 2008; Ban i sar., 2009; D'Netto i sar., 2009; Hoppenbrouwers i sar., 2008; Hafler i sar., 2009) i meta-analizom (De Jager i sar., 2009), dali su dokaze o postojanju oko desetak genskih lokusa izvan regiona HLA, koji utiču na rizik za oboljevanje od multiple skleroze. Među ovim lokusima, čiji su

polimorfizmi kao faktori rizika dostigli značajnost na nivou genoma, nalaze se geni koji kodiraju: receptor za IL-7 (IL7R), alfa-lanac receptora za IL-2 (IL2RA) ili CD25, C-tip lektina 16A (CLEC16A) (Hoppenbrouwers i sar., 2009), CD58 (Hoppenbrouwers i sar., 2009), CD226 (IMSGC, 2009), kinezinu sličan protein KIF21B (IMSGC, 2010), CD6 (De Jager i sar., 2009), interferonski regulatorni faktor 8 (IRF8) (De Jager i sar., 2009), receptor p55 za TNFA (TNFRSF1A) (De Jager i sar., 2009), 25-OHD<sub>3</sub>-1alfa hidroksilazu (CYP27B1, *skr. od engl.* Cytochrome P450 family 27 subfamily B peptide 1) (ANZgene, 2009; Sundqvist i sar., 2010), tirozin-kinazu 2 (TYK2) i transkripcioni faktor STAT (*skr. od engl.* Signal Transducer and Activator of Transcription) 3 (Jakkula i sar., 2010). Većina navedenih genskih produkata učestvuje u funkcionisanju imunskog sistema.

### **1.3.3.2. Genska ekspresija u patogenezi multiple skleroze**

U studijama u kojima su ispitivani profili genske ekspresije u multiploj sklerozi urađena je analiza tkiva mozga i periferne krvi, sa ciljem definisanja novih dijagnostičkih i prognostičkih biomarkera bolesti, kao i odgovora na određene vrste terapije.

Do sada je objavljeno više studija u kojima su analizirani profili ekspresije gena u lezijama bele mase, beloj masi normalnog izgleda i sivoj masi mozga pacijenata sa multiplom sklerozom, koji su upoređivani sa ekspresionim profilima odgovarajućih kontrolnih tkiva (Whitney i sar., 1999; Whitney i sar., 2001; Lock i sar., 2002; Tajouri i sar., 2003; Mycko i sar., 2003; Mycko i sar., 2004; Lindberg i sar., 2004; Graumann i sar., 2003; Zeis i sar., 2008; Dutta i sar., 2006). U moždanom tkivu pacijenata, u odnosu na kontrole, pokazana je različita ekspresija gena čiji produkti učestvuju u regulaciji urođenog i stečenog imunskog odgovora, a to su: interferonski regulatorni faktor 2 (IRF2), TNFA (Mycko i sar., 2003; Mycko i sar., 2004), receptor za TNFA i nespecifični receptor za hemokine DARC (*engl.* Duffy blood group, Chemokine receptor) (Whitney i sar., 1999), 5-lipoksigenaza (Whitney i sar., 2001), transkripcioni faktori STAT4 i STAT6 (Zeis i Schaeren-Wiemers, 2008), inflamatorni citokini (IL-6 i IL-17) i molekuli II klase HLA i sistema komplementa (Lock i sar., 2002) i imunoglobulinski Fc receptor (Lock i sar., 2002). Među diferencijalno eksprimiranim



genima u mozgu pacijenata, nalaze se i geni uključeni u regulaciju neuronske homeostaze. To su geni koji kodiraju: MBP i neuronski faktor rasta indukovan povredom (*engl.* Nerve Injury-induced protein 1, *skr.* NINJ1) (Tajouri i sar., 2003), transkripcioni faktor indukovan hipoksijom (*engl.* Hypoxia Inducible Factor 1, *skr.* HIF1) (Graumann i sar., 2003) i cilijarni neurotrofni faktor (*engl.* Ciliary Neurotrophic Factor, *skr.* CNTF) (Dutta i sar., 2006). Dosadašnje studije u kojima su izučavani transkripcioni profili u moždanom tkivu obolelih od multiple skleroze i odgovarajućih kontrola izvedene su na uzorcima dobijenim obdukcijom ili biopsijom tkiva. Zbog toga, glavna prepreka u izvođenju ovih studija je ograničena dostupnost ciljnih uzoraka.

S obzirom da je multipla skleroza inflamatorna i autoimunska bolest, određivanje profila ekspresije gena u leukocitima periferne krvi predstavlja važan pristup za izučavanje imunološkog aspekta patogeneze bolesti na molekularnom nivou. Do sada je objavljeno nekoliko ovakvih studija u multiploj sklerozi (Ramanathan i sar., 2001; Bomprezzi i sar., 2003; Mandel i sar., 2004; Mayne i sar., 2004; Satoh i sar., 2005; Infante-Duarte i sar., 2005). Važna prednost studija koje ispituju ekspresiju gena u perifernim leukocitima jeste dostupnost uzoraka periferne krvi. Poređenjem profila ekspresije gena u perifernim mononuklearnim leukocitima pacijenata i zdravih kontrola, utvrđene su razlike u ekspresiji gena funkcionalno povezanih sa regionom HLA, kao što su gen za dugu nekodirajuću jedarnu RNK- NEAT1 (*skr.* od *engl.* Nuclear Enriched Abundant Transcript 1), i gen za protein toplotnog stresa HSPA1A (*skr.* od *engl.* Heat Shock 70kDa Protein 1A) (Kemppinen i sar., 2011). Kod pacijenata su bili visoko ekspimirani geni za alfa-subjedinicu T-ćelijskog receptora (TCR-alfa, koji je odgovoran za prepoznavanje antigena vezanih za molekule HLA), TNFR i IL7R (Bomprezzi i sar., 2003). Gen za cistein proteazu L lizozoma (katepsin L), koja reguliše proces aktivacije autoreaktivnih T-limfocita specifičnih za antigene mijelina, bio je povišeno ekspimiran tokom faze relapsa bolesti (Achiron i sar., 2004). Transkripcioni faktor STAT3 koji deluje kao koaktivator signalnog puta glukokortikoidnog receptora i molekuli uključeni u puteve transdukcije signala preko interleukina IL-4, IL-6 i IL-17, imali su različitu gensku ekspresiju kod pacijenata i kontrola (Kemppinen i sar., 2011). Aktivacija procesa remodelovanja vanćelijskog matriksa kod pacijenata je bila evidentna na osnovu pojačane ekspresije metaloproteinaze 9 matriksa (*engl.* Matrix Metalloproteinase-9, *skr.* MMP-9) i smanjene ekspresije tkivnog inhibitora

metaloproteinaza 1 (*engl.* Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 1, *skr.* TIMP1) (Bomprezzi i sar., 2003). Geni za proteine koji stimuliraju hemotaksiju monocita (*engl.* Monocyte Chemoattractant Protein-1 i -2, *skr.* MCP1 i MCP2) su bili povišeno ekspimirani tokom faze relapsa bolesti (Achiron i sar., 2004).

Meta-analiza je pokazala da se u grupi gena, čija je diferencijalna ekspresija u perifernim mononuklearnim leukocitima pacijenata replikovana *in silico* u dve ili više analiziranih pojedinačnih studija (Kemppinen i sar., 2011), nalaze geni (NEAT1, HSPA1A) funkcionalno povezani sa HLA- hromozomskim regionom čiji polimorfizmi predstavljaju glavne genetske faktore rizika za nastanak multiple skleroze (Jersild i sar., 1972; Naito i sar., 1972; Haines i sar., 1998; Sawcer i sar., 2005). Takođe, ovde pripadaju i diferencijalno ekspimirani geni koji su uključeni u puteve transdukcije signala preko glukokortikoidnog receptora (STAT3) i interleukina (IL-4, IL-6 i IL-17) u T-limfocitima (Kemppinen i sar., 2011). Prethodno je u lezijama mozga pacijenata detektovana diferencijalna ekspresija gena za interleukine (IL-6 i IL-17) (Lock i sar., 2002), što zajedno sa diferencijalnom ekspresijom gena signalnih puteva ovih interleukina u perifernim T-limfocitima (Kemppinen i sar., 2011) predstavlja primer promena u imunskom sistemu koje se detektuju u ćelijama periferne krvi, a odražavaju patološke promene u glavnom ciljnom tkivu (CNS) kod obolelih od multiple skleroze. Izvođenje funkcionalnih studija je potrebno kako bi se razjasnila veza između promena u ekspresiji gena u analiziranim tkivima i patogeneze multiple skleroze, odnosno da li su ove promene uzrok ili posledica bolesti. Integracija rezultata GWASs sa podacima iz oblasti transkriptomike, proteomike i drugih (klinički podaci, NMRI, izloženost sredinskim faktorima rizika i/ili familijarnom riziku za oboljevanje), neophodna je za dalji napredak u razumevanju genetske osnove patogeneze multiple skleroze.

## 1.4. Uloga hemokina i hemokinskih receptora u patogenezi multiple skleroze

### 1.4.1. Klasifikacija hemokina i hemokinskih receptora

Hemokini predstavljaju familiju citokina. To su solubilni proteini malih molekulskih masa (8-14 kDa) koji imaju esencijalnu ulogu u stimulaciji migracije ćelija i međućelijskoj komunikaciji (Rossi i Zlotnik, 2000). Osnovna klasifikacija hemokina je napravljena prema njihovim strukturnim karakteristikama i specifičnom delovanju na populacije imunskih ćelija koje eksprimiraju hemokinske receptore (IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2002; Rollins, 1997; Mantovani, 1999). Prema strukturi konzervisanog N-terminalnog motiva sa cisteinskim (C) reziduama, tj. prisustvu ili odsustvu aminokiselina između prve dve cisteinske rezidue na N-terminusu, familija hemokina je podeljena na četiri podfamilije, a to su: C- (motiv sadrži samo jednu cisteinsku reziduu), CC-, CXC- i CX3C- hemokini (X označava aminokiselinu različitu od cisteina). C- hemokini (CL1 i CL2) specifično privlače T-limfocite. CC- hemokini deluju na bazofile, eozinofile, monocite, NK-(*skr. od engl. Natural Killer*) ćelije, dendritske ćelije i T-limfocite. CXC- hemokini stimulišu migraciju neutrofila, monocita i limfocita. Jedini član CX3C- podfamilije, CX3CL1, je jedinstven po tome što može postojati u formi tipičnog solubilnog hemokina ili membranskog adhezivnog molekula, a deluje na monocite, NK-ćelije, dendritske ćelije i T-limfocite. Na osnovu ekspresije i funkcije *in vivo*, hemokini se mogu podeliti u dve kategorije: konstitutivne (homeostatske), koji su odgovorni za transport leukocita u bazalnim uslovima, razviće i strukturno-funkcionalnu organizaciju limfoidnih i nelimfoidnih organa, i inducibilne (inflamatorne) hemokine koji su produkovani u odgovoru na inflamaciju i omogućavaju pojačanu migraciju leukocita u tkivo zahvaćeno inflamacijom. Ekspresiju inflamatornih hemokina podstiču proinflamatorni stimuli kao što su citokini IL-1, TNFA i IFNG, virusni antigeni i bakterijski lipopolisaharid (LPS), a inhibiraju je endogeni antiinflamatorni medijatori: citokini IL-10 i TGF-beta (*skr. od engl. Transforming Growth Factor-beta*), i glukokortikoidi. Podela na konstitutivne i inducibilne hemokine je gruba, s obzirom na to da izvesni konstitutivni

hemokini pokazuju i inducibilnu ekspresiju, i obrnuto. Regulacija funkcije hemokina može da se ostvari na nivou alternativne obrade njihovih primarnih transkripata koja rezultuje biosintezom različitih izoformi hemokina (Colobran i sar., 2007), i/ili putem posttranslacionih modifikacija kao što su glikozilacija, citrulinacija i proteoliza (Mortier i sar., 2008; Proost i sar., 2008; Mortier i sar., 2011). Mnogi inflamatorni hemokini su supstrati za različite proteaze, a proteolitičkoj obradi podležu predominantno N-terminalni regioni hemokina.

Hemokini ostvaruju dejstvo na ciljne ćelije posredstvom vezivanja za hemokinske receptore koji pripadaju porodici receptora sa sedam transmembranskih domena, kuplovanih sa G-proteinom (Bajetto i sar., 2002; Thelen, 2001). Hemokinski receptori su klasifikovani prema tipu liganda (hemokina) koji vezuju i na koji odgovaraju u četiri kategorije: CR1 (receptor za CL1 i CL2), receptore za CC-hemokine (CCR), receptore za CXC-hemokine (CXCR) i CX3CR1 (receptor za CX3CL1) (IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature, 2002).

Interakcije hemokina i njihovih receptora predstavljaju kompleksnu mrežu, a definisane su pretežno na osnovu izučavanja efekata hemokina na ćelije imunskog sistema (Mantovani, 1999). Identifikovano je više od 50 humanih hemokina i oko 20 hemokinskih receptora (Charo i Ransohoff, 2006). Sa nekim izuzecima, pojedinačni hemokinski receptori mogu da odgovore na više od jednog hemokina, a pojedinačni hemokini mogu angažovati više od jednog receptora (Rossi i Zlotnik, 2000). Svojtvo da jedna ćelija proizvodi više različitih hemokina je naročito izraženo kod ćelija urođenog imunskog odgovora (mononuklearni fagociti i dendritske ćelije) koje su direktno izložene infektivnim agensima, a obezbeđuje adekvatnu odbranu domaćina (Mantovani, 1999). Uprkos kompleksnosti njihovih interakcija, blokiranje aktivnosti određenih hemokina i hemokinskih receptora ili ekspresije gena koji ih kodiraju može da modifikuje ishod eksperimentalno indukovanih inflamatornih bolesti, što ukazuje na to da se terapija određenih humanih bolesti može sprovoditi na nivou regulacije aktivnosti hemokina (Gerard i Rollins, 2001).

### **1.4.2. Hemokini u mehanizmu inflamacije**

Nakupljanje leukocita u tkivu (na mestu infekcije), koje je praćeno vazodilatacijom i povećanim vaskularnim permeabilitetom definiše se kao inflamacija (zapaljenje) (Abbas i Lichtman, 2006). Neuroinflamacija započinje infiltracijom leukocita u tkivo CNS-a i predstavlja suštinski korak u patogenezi multiple skleroze.

Ekstravazacija leukocita iz krvotoka je proces koji se odvija u nekoliko koraka i obuhvata: 1) kotrljanje leukocita po površini endotela malih krvnih sudova (postkapilarnih venula), uslovljeno slabom adhezijom između leukocita i P- i E-selektina na endotelnim ćelijama (selektini su indukovani inflamatornim citokinima TNF i IL-1 koje proizvode aktivirani tkivni makrofagi), 2) čvrstu adheziju posredovanu vezivanjem aktiviranih integrina na leukocitima za odgovarajuće ligande na endotelnim ćelijama (ekspresiju liganada stimulišu TNF i IL-1) i 3) transendotelnu migraciju leukocita u tkivo (Abbas i Lichtman, 2006). Važan korak u ovoj kaskadi je sinteza hemokina od strane aktiviranih tkivnih makrofaga i endotelnih ćelija. Sintetisani hemokini se nagomilavaju na luminalnoj površini endotela, u asocijaciji sa glikozaminoglikanima, i na taj način u visokoj koncentraciji bivaju izloženi leukocitima koji se kotrljaju po endotelu. Tada dolazi do vezivanja hemokina za njihove receptore koji su eksprimirani na površini cirkulišućih leukocita, što dovodi do iniciranja prenosa unutarćelijskih signala u leukocitima i rezultuje aktivacijom membranskih integrina koja omogućava čvrstu adheziju leukocita za endotel. Hemokini stimulišu čvrsto vezane leukocite da migriraju kroz zid krvnog suda, duž gradijenta koncentracije hemokina, do ciljnog mesta u tkivu (Abbas i Lichtman, 2006).

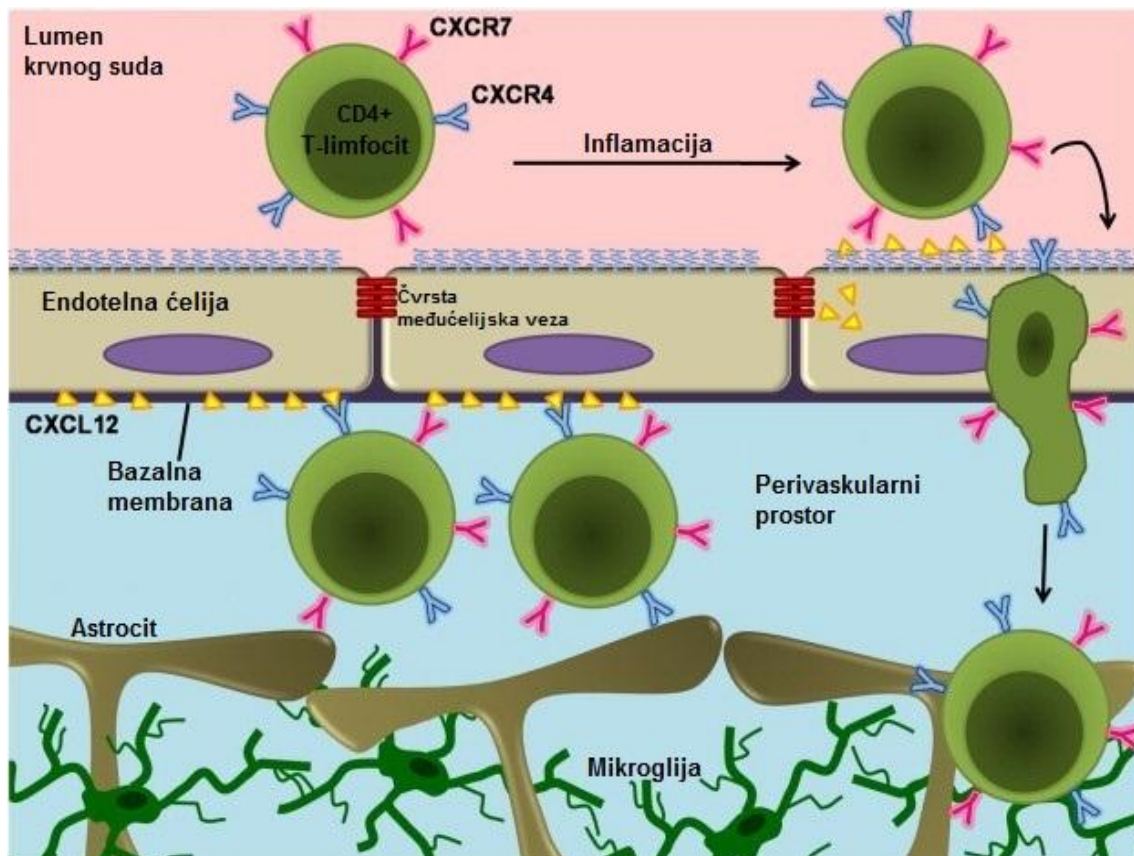
### **1.4.3. Strukturno-funkcionalne karakteristike krvno-moždane barijere**

Delovanje homeostatskih i/ili inflamatornih hemokina određuje koje će subpopulacije leukocita migrirati iz krvi u periferna tkiva. U centralnom nervnom sistemu postoje specifične barijere koje dodatno regulišu infiltraciju leukocita i drugih ćelija, solubilnih molekula i makromolekula u parenhimsko tkivo i na taj način doprinose održanju homeostaze u CNS-u. Dve glavne anatomske specijalizovane barijere su: barijera između krvi i likvora i krvno-moždana barijera. Barijera između

krvi i likvora sprečava slobodnu razmenu rastvorenih materija između njih. U formiranju ove barijere učestvuje epitel horoidnog pleksusa, preko koga komponente likvora dospevaju u moždane komore i u kome su ćelije povezane čvrstim međućelijskim vezama (Ransohoff i sar., 2003; Johanson i sar., 2008). Krvno-moždana barijera (KMB) se sastoji od endotela malih krvnih sudova mozga, pericita i terminalnih proširenja citoplazmatskih nastavaka astrocita (“stopala”) koji okružuju krvne sudove (*slika U4*) (Abbott i sar., 2006). Ova barijera omogućava selektivni transport ćelija i molekula između krvi i moždanog parenhima. Iako su osnovne strukturne komponente krvno-moždane barijere uniformne, postoje dokazi o heterogenosti KMB-e zavisno od vaskularne osnove i anatomske lokacije krvnih sudova (Ge i sar., 2005). Utvrđeno je da se ekspresija određenih transportera razlikuje između cerebralnih krvnih sudova različitog dijametra (Virgintino i sar., 2002; Ge i sar., 2005). Čvrste međućelijske veze u endotelu cerebralnih postkapilarnih venula su diskontinuirane i manje kompleksne u odnosu na kapilarne (Nagy i sar., 1984), a to može biti jedan od razloga zašto se transmigracija leukocita odigrava isključivo na nivou postkapilarnih venula (Ge i sar., 2005; Owens i sar., 2008). Regionalne razlike u KMB-i se ispoljavaju i na nivou razlika u ekspresiji adhezivnih molekula (Kivisakk i sar., 2003) i hemokina (McCandless i sar., 2008; McCandless i sar., 2006), koji direktno utiču na ekstravazaciju leukocita. Tokom ranih faza EAE-a, dolazi do aktivacije CD4<sup>+</sup> T-limfocita prilikom interakcije sa APC u subarahnoidnom prostoru, a to je praćeno njihovom proliferacijom i akumulacijom u subarahnoidnom prostoru (Kivisakk i sar., 2009). Ovi rezultati sugerišu da rani događaj tokom inflamacije i imunskog odgovora u CNS-u može biti usmerena transmigracija leukocita kroz subarahnoidne krvne sudove u subarahnoidni prostor, koja je posledica diferencijalne ekspresije adhezivnih molekula na vaskularnom endotelu (Bartholomaeus i sar., 2009; Ransohoff, 2009).

#### **1.4.4. Hemokini i hemokinski receptori u krvno-moždanoj barijeri, leukocitima i ćelijama centralnog nervnog sistema tokom patogeneze multiple skleroze**

Izučavanje uloge hemokina u centralnom nervnom sistemu datira od početka 1990-ih. Značaj hemokina u mehanizmu neuroinflamacije je otkriven u studijama na životinjskom modelu multiple skleroze (EAE), u kojima je nastanak bolesti asociran sa povećanom produkcijom određenih hemokina u tkivu CNS-a (Ransohoff i sar., 1993; Hulkower i sar., 1993). Konstitutivno eksprimirani (homeostatski) hemokini u CNS-u su: CXCL1, CXCL12, CX3CL1 i neki CC- hemokini. Oni posreduju u migraciji neuronskih i glijalnih progenitora, proliferaciji glijalnih ćelija, neurogenezi, preživljavanju neurona, komunikaciji između neurona i ćelija glije i neurotransmisiji (Ambrosini i Aloisi, 2004). Neke homeostatske hemokine, kao što su CXCL12, CCL19 i CCL21, eksprimiraju endotelne ćelije krvnih sudova u CNS-u (Holman i sar., 2011). Promene ekspresije ovih hemokina su asocirane sa promenama odlika krvno-moždane barijere i njenim narušavanjem u toku neuroinflamacije i patogeneze multiple skleroze (Holman i sar., 2011). Na krvno-moždanoj barijeri CXCL12 ima izuzetno važnu ulogu u regulaciji transendotelne migracije leukocita u tkivo CNS-a, što je potvrđeno u patogenezi EAE-a (McCandless i sar., 2006) i multiple skleroze (McCandless i sar., 2008). Osim što je detektovana povišena ekspresija CXCL12 u endotelu krvnih sudova KMB-e kod obolelih od multiple skleroze (Krumbholz i sar., 2006), otkrivena je i promena lokalizacije ovog hemokina na endotelnim ćelijama (*slika U4*) (McCandless i sar., 2006; McCandless i sar., 2008). Tokom neuroinflamacije CXCL12 se translocira sa abluminalne na luminalnu površinu endotelnih ćelija postkapilarnih venula, čime se stimulišu migracija CXCR4+ monocita i limfocita iz perivaskularnog prostora u moždani parenhim i njihovo ragrutovanje iz krvi (*slika U4*). Utvrđeno je da proinflamatorni citokin IL-1 stimuliše endotelnu translokaciju CXCL12 u toku inflamacije (McCandless i sar., 2009).



Slika U4. Krvno-moždana barijera: uloga hemokina CXCL12 u regulaciji migracije leukocita u tkivo centralnog nervnog sistema. Preuzeto iz: Holman i sar., 2011.

Više hemokina učestvuju u transmigraciji ćelija urođenog imunskog odgovora u CNS, putem aktivacije odgovarajućih hemokinskih receptora eksprimiranih na ovim ćelijama - neutrofilima (CXCR1 i CXCR2) (Carlson i sar., 2008), NK-ćelijama (CXCR4, CCR4, CCR7 i CX3CR1) (Maghazachi, 2003) i monocitima (CCR2) (Mahad i sar., 2006). Značajno povišeni nivoi ekspresije hemokinskih receptora CXCR3 i CCR5 na Th1 limfocitima periferne krvi su detektovani kod pacijenata sa multiplom sklerozom, u odnosu na kontrole (Mahad i sar., 2003; Nakajima i sar., 2004; Uzawa i sar., 2010). Odnosi nivoa ekspresije receptora CD4+CXCR3+/CD4+CCR3+ (Th1/Th2) i CD8+CXCR3+/CD8+CCR4+ (T-citotoksični limfociti 1/T-citotoksični limfociti 2) su bili značajno viši kod pacijenata nego kod zdravih kontrola, a to je bilo naročito izraženo u toku relapsa (Uzawa i sar., 2010). Ovi rezultati sugerišu da promene nivoa ekspresije hemokinskih receptora CXCR3 i CCR5 u limfocitima periferne krvi mogu



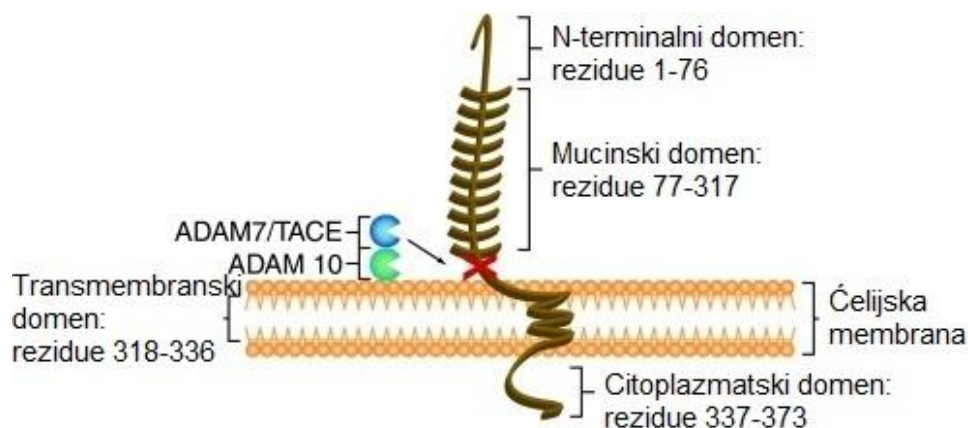
biti validni periferni markeri patogeneze multiple skleroze i da antagonisti ovih receptora imaju potencijalni značaj u terapiji bolesti.

Analizom tkiva CNS-a obolelih od multiple skleroze utvrđeno je da reaktivni astrociti i aktivirana mikroglia unutar lezija proizvode ligande za receptore CCR2 (CCL2/MCP-1), CXCR3 (CXCL9, CXCL10) i CCR5 (CCL3, CCL4, CCL5, CCL8) (Ambrosini i Aloisi, 2004), koji su prevashodno eksprimirani na monocitima i Th1 limfocitima kao subpopulacijama proinflamatornih ćelija sa ključnom ulogom u patogenezi multiple skleroze (Mahad i sar., 2003; Nakajima i sar., 2004; Uzawa i sar., 2010). Takođe, na reaktivnim astrocitima i aktiviranoj mikrogliji unutar lezija je detektovana i ekspresija samih receptora CXCR3, CCR2 i CCR5. Signalizacija koja se ostvaruje putem parakrine ili autokrine aktivacije ovih receptora utiče na proliferaciju i migraciju glijalnih ćelija i proizvodnju medijatora inflamacije u njima (Sorensen i sar., 1999; Balashov i sar., 1999; Simpson<sup>a</sup> i sar., 2000; Simpson<sup>b</sup> i sar., 2000). Aktivirana mikroglia proizvodi hemokine CCL22 i CCL1 koji se vezuju za receptore (CCR4 i CCR8) eksprimirane na antiinflamatornim Th2 limfocitima. Dokazano je da CCL22 proizveden *in vitro* od strane aktivirane mikroglije promoviše migraciju Th2, ali ne i Th1 limfocita (Columba-Cabezas i sar., 2002). Ovi rezultati ukazuju na značajnu ulogu mikroglijalnih hemokina u regulaciji regrutovanja funkcionalno različitih subpopulacija T-limfocita tokom inflamacije u CNS-u. Dva strukturno i funkcionalno specifična hemokina, CX3CL1 i CXCL16, od kojih se svaki visoko-specifično vezuje samo za jedan receptor (CX3CL1 za CX3CR1, CXCL16 za CXCR6), do sada nisu u velikoj meri izučeni u patogenezi multiple skleroze.

## **1.5. Hemokin CX3CL1 (CX3C ligand 1) i njegov receptor CX3CR1 (CX3C receptor 1)**

### **1.5.1. Dve forme hemokina CX3CL1: struktura i funkcija**

Godine 1997. otkriven je hemokin CX3CL1 (CX3C ligand 1, drugi naziv: fraktalkin) (Bazan i sar., 1997). Otkrićem strukturnih svojstava ovog hemokina definisana je nova CX3C- podfamilija hemokina, čiji je CX3CL1 i jedini član (Zlotnik i Yoshie, 2000). CX3CL1 se sintetishe kao polipeptidni lanac dužine 397 aminokiselina (AK) (42.2 kDa) koji podleže posttranslacionom unutarćelijskom proteolitičkom sećenju. Sećenjem se uklanja N-terminalni signalni peptid sastavljen od prve 24 AK-e, što rezultuje dobijanjem polipeptidnog lanca od 373 AK-e. On se zatim ugrađuje u ćelijsku membranu i, kao monomerni membranski protein I tipa, predstavlja transmembransku formu CX3CL1. Transmembranski CX3CL1 se sastoji od četiri domena: vanćelijskog N-terminalnog hemokinskog domena (rezidue 1-76), domena sličnog mucinu (rezidue 77-317), transmembranskog domena koji formira alfa-heliks (rezidue 318-336) i citoplazmatskog domena (rezidue 337-373) (*slika U5*) (Umehara i sar., 2004). Domen sličan mucinu je najveći i ima specifičan oblik drške (*slika U5*), a u njegov sastav ulaze glicin, prolin, serin i treonin. Serinske i treoninske rezidue su u visokom stepenu glikozilovane, što verovatno sprečava “folding” (savijanje) mucinke “drške” i ograničava pristup proteolitičkim enzimima (Matloubian i sar., 2000). To omogućava da domen sličan mucinu ostvaruje ulogu u eksponiranju hemokinskog domena na površini ćelije (Haskell i sar., 2000).



Slika U5. Shematski prikaz strukture transmembranske forme CX3CL1. Preuzeto iz: Jones i sar., 2010.

Transmembranska forma CX3CL1 je inducibilno eksprimirana na površini primarnih endotelnih ćelija, pod uticajem inflamatornih citokina (Garcia i sar., 2000). Transmembranski CX3CL1 je adhezivni molekul koji se brzo i sa visokim afinitetom vezuje za CX3CR1 na leukocitima (monocitima, NK-ćelijama i T-limfocitima), u statičkim uslovima i tokom fiziološkog protoka krvi (Umehara i sar., 2004). Zbog toga asocijacija drugih endotelnih adhezivnih molekula sa membranskim proteinima leukocita (integrinima) nije neophodna za njihovu adheziju, kada je ostvarena veza: membranski CX3CL1-CX3CR1. Takođe, asocijacija između CX3CR1 i integrina leukocita, koja se ostvaruje putem koekspresije CX3CL1 i integrinskih liganada (intercelularni adhezivni molekul/ICAM-1 i vaskularni adhezivni molekul/VCAM-1) na endotelu, značajno pojačava međućelijsku adheziju u poređenju sa svakim od ova dva adhezivna sistema ponaosob (Umehara i sar., 2004). Membranski CX3CL1 može da stimuliše i transendotelnu migraciju leukocita (Umehara i sar., 2004). U zidu krvnih sudova CX3CL1 je lokalizovan na površini endotelnih i glatkih mišićnih ćelija (Lucas i sar., 2003), a u oba tipa ćelija je indukovano proinflamatornim medijatorima *in vitro* (Imaizumi i sar., 2004). Među ovim medijatorima glavni su TNFA, IL-1 i LPS (Garcia i sar., 2000). Citokini TNFA i IFNG sinergistički indukuju CX3CL1, dok IL-4 i IL-6 mogu delovati kao njegovi supesori (Fraticeili i sar., 2001; Imaizumi i sar., 2000; Matsumiya i sar., 2001; Yoshida i sar., 2001). Endotelni CX3CL1 stimuliše produkciju IFNG od strane CX3CR1+ NK-ćelija, što može biti mehanizam povratne sprege za porast ekspresije endotelnog CX3CL1 posredstvom IFNG (Yoneda i sar., 2003).

Endotelni CX3CL1 može da stimuliše oslobađanje sadržaja granula NK-ćelija i tako da posreduje u inflamatornom oštećenju vaskularnog tkiva (Yoneda i sar., 2000). U aterosklerotskim lezijama je otkriveno da monociti/makrofazi ekspimiraju CX3CL1 (Greaves i sar., 2001). Takođe, u monocitima periferne krvi obolelih od reumatoidnog artritisa detektovana je ekspresija CX3CL1 (Ruth i sar., 2001). Rezultati studija na životinjskim eksperimentalnim modelima su, takođe, pokazali da CX3CL1 i CX3CR1 stimulišu inflamaciju u različitim organima (Combadiere i sar., 2003; Teupser i sar., 2004; Furuichi i sar., 2006; Soriano i sar., 2002). U modelu ateroskleroze kod jedinki kod kojih je izbačen gen za CX3CL1 ili za CX3CR1, vaskularne lezije su bile manje i sadržale značajno manji broj monocita. Ovo sugerise da u toku progresije bolesti regrutovanje monocita posredovano molekulima CX3CL1 i CX3CR1 predstavlja proces koji je ključan za rast inflamatornih aterosklerotskih lezija (Combadiere i sar., 2003; Teupser i sar., 2004). Pored toga što je CX3CL1 inducibilni hemokin u uslovima inflamacije, studije su pokazale da različiti tipovi ćelija ekspimiraju CX3CL1/CX3CR1 i u odsustvu infamatornih stimulusa. Konstitutivna ekspresija CX3CL1 u neuronima je značajna za uspostavljanje međućelijskih interakcija neurona i mikroglijalnih ćelija (Harrison i sar., 1998) i za preživljavanje neurona (Meucci i sar., 2000). CX3CL1 konstitutivno ekspimiran na površini epitelnih ćelija creva reguliše pozicioniranje dendritskih ćelija (Niess i sar., 2005), dok u vaskularnom sistemu reguliše angiogenezu (Lee i sar., 2006).

Aktivacijom metaloproteinaza ADAM (*engl.* A Disintegrin And Metalloproteinase domain-containing protein)<sup>10</sup> i ADAM17 (Garton i sar., 2001; Hundhausen i sar., 2003), na ćelijskoj površini dolazi do proteolitičkog sečenja transmembranske forme CX3CL1. Tom prilikom se sa površine ćelija oslobađa solubilna forma CX3CL1, koja se sastoji od vanćelijskog N-terminalnog hemokinskog domena i domena sličnog mucinu (*slika U5*). Solubilni CX3CL1 deluje kao tipični hemokin, stimulišući migraciju CX3CR1<sup>+</sup> monocita, NK-ćelija, T-limfocita (Bazan i sar., 1997) i glatkih mišićnih ćelija (Lucas i sar., 2003). Prisutan je u plazmi/serumu, likvoru i sinovijalnoj tečnosti (Ludwig i Weber, 2007). Povišeni nivoi solubilnog CX3CL1 su detektovani u: serumu pacijenata sa aterosklerozom koronarnih arterija (Damas i sar., 2005), sinovijalnoj tečnosti pacijenata sa reumatoidnim artritisom (Ruth i sar., 2001), bronhoalveolarnoj tečnosti pacijenata sa astmom (Rimaniol i sar., 2003),

serumu pacijenata sa sistemskim lupusom (Yajima i sar., 2005) i likvoru pacijenata sa neuroinflamatornim bolestima (Kastenbauer i sar., 2003).

### **1.5.2. Regulacija odnosa nivoa transmembranske i solubilne forme CX3CL1**

Konverzija transmembranske u solubilnu formu CX3CL1 je regulisana procesom proteolize transmembranskog CX3CL1, posredstvom metaloproteinaza ADAM10 i ADAM17 (Chapman i sar., 2000; Ludwig i sar., 2002). Postoje podaci da ADAM10 prevashodno učestvuje u sečenju konstitutivno eksprimiranog CX3CL1, dok ADAM17 seče inducibilno eksprimirani CX3CL1 (Hundhausen i sar., 2003; Garton i sar., 2001). Još uvek se ne zna tačan mehanizam kako metaloproteinaze prepoznaju hemokin i koje je tačno mesto proteolitičkog sečenja, ali je to mesto najverovatnije pozicionirano u neposrednoj blizini ćelijske membrane unutar domena sličnog mucinu. Sečenjem se generišu C-terminalni fragmenti različite dužine, koji su vezani za membranu (Hundhausen i sar., 2003; Garton i sar., 2001), što ukazuje na postojanje bar dva različita mesta sečenja. Ove membranske fragmente uklanja gama-sekretaza putem njihove proteolize unutar membrane, a to rezultuje stvaranjem unutarćelijskih peptidnih fragmenata koji mogu učestvovati u transdukciji signala (Reiss i sar., 2006).

Predložen je model uloge ADAM proteinaza u regrutovanju leukocita u vaskularnoj inflamaciji (Ludwig i Weber, 2007). Tokom inflamacije, pod uticajem inflamatornih medijatora u endotelnim ćelijama prvo dolazi do indukcije ekspresije CX3CL1 koji se intenzivno ugrađuje u ćelijsku mebranu. To rezultuje pojačanom adhezijom CX3CR1+ leukocita za endotel. U sledećoj fazi dolazi do pojačanog proteolitičkog sečenja membranskog CX3CL1, a nastali solubilni CX3CL1 formira koncentracioni gradijent, stimulišući hemotaksiju CX3CR1+ leukocita iz krvi. Tom prilikom može da dođe i do raskidanja prethodno formiranih adhezivnih veza između CX3CR1+ leukocita i CX3CL1+ endotelnih ćelija. S obzirom na postojeći gradijent solubilnog CX3CL1, raskidanje ovih adhezivnih veza ne dovodi do vraćanja leukocita nazad u krvotok, već omogućava dijapedezu regrutovanih leukocita kroz endotel (Ludwig i Weber, 2007). Prilikom interakcije leukocita i endotela, sečenje transmembranskog CX3CL1 se najčešće realizuje kao *cis*- (enzim i hemokin su

ekspimirani od strane iste ćelije), ali je pokazano da je moguće i *trans*- sečenje (enzim i hemokin su ekspimirani od strane dveju različitih ćelija) (Janes i sar., 2005). Bez obzira da li je *cis*- ili *trans*-, proteolitičko sečenje transmembranskog hemokina može da olakša raskidanje adhezivne veze i podstakne migraciju leukocita kroz vaskularni endotel. Takođe, unutar tkiva aktivnost ADAM10 i ADAM17 rezultuje stvaranjem gradijenta koncentracije solubilnog CX3CL1, čime se dalje stimuliše privlačenje leukocita na mesto inflamacije u tkivu. Dakle, metaloproteinaze ADAM10 i ADAM17 učestvuju u regulaciji adhezije leukocita za zid krvnog suda, njihove transendotelne migracije i migracije u deo tkiva zahvaćen inflamacijom, upravo putem regulacije sečenja transmembranskog CX3CL1 tj. regulacije odnosa nivoa membranske i solubilne forme ovog hemokina (Ludwig i Weber, 2007). Odavde proizilazi jedan od mogućih pristupa u supresiji inflamacije, koji bi podrazumevao blokadu ADAM10 i ADAM17. Međutim, pritom bi se morali uzeti u obzir i svi potencijalni dodatni efekti, s obzirom da inhibicija ovih metaloproteinaza ne utiče samo na aktivnost CX3CL1, već i različitih drugih citokina i adhezivnih molekula (Garton i sar., 2006).

### **1.5.3. Struktura gena za CX3CL1**

Humani gen za CX3CL1 se nalazi na hromozomu 16q13. Dužine je 12 591 bp i sastoji se od 3 egzona i 2 introna. Genski transkript (iRNK) sadrži otvoreni okvir čitanja dužine 1 194 baze, koji kodira polipeptidni lanac CX3CL1 od 397 AA-a (Bazan i sar., 1997; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6376>; GeneCardsIdentifier: GC16P057406).

### **1.5.4. Polimorfizmi u genu za CX3CL1**

Do sada je detektovan veliki broj polimorfizama u humanom genu za CX3CL1 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CX3CL1%20homo%20sapiens>). Izvesni polimorfizmi su asocirani sa nastankom i/ili progresijom određenih inflamatornih i infektivnih bolesti. Redi aleli polimorfizama rs170364 (G/T) i rs614230 (T/C) su asocirani sa većim zadebljanjem zida karotidne arterije kod pacijenata sa karotidnom aterosklerozom (Debette i sar., 2009). Polimorfizmi u 3' netranslatiranom regionu gena

za CX3CL1, T2999C i T3042C, su asocirani sa rizikom za infekciju virusom HIV-1 (*skr. od engl. Human Immunodeficiency Virus-1*): učestalosti ređih alela oba polimorfizma su značajno veće kod inficiranih, u odnosu na zdrave kontrole i osobe koje su više puta bile izložene virusu ali nisu inficirane (Peraire i sar., 2007).

### **1.5.5. Regulacija transkripcije gena za CX3CL1**

S obzirom da ekspresija značajnog broja hemokina i adhezivnih molekula raste pod uticajem inflamatornih stimulusa, i CX3CL1 je identifikovan kao faktor indukovano delovanjem TNFA, IL-1 i LPS (Bazan i sar., 1997). Ovi inflamatorni stimulusi ostvaruju dejstvo na ciljane ćelije putem vezivanja za svoje receptore i pokretanja unutarćelijske transdukcije signala, uz aktivaciju puta nuklearnog faktora-kB (NF-kB) i mitogenom aktiviranih protein-kinaza (MAPKs). U promotorskom regionu gena za CX3CL1 se nalaze vezivna mesta za transkripcione faktore NF-kB i STAT1 (Nomiya i sar., 1998). Pokazano je da se NF-kB vezuje za proksimalni promotor CX3CL1, pri čemu se količina vezanog NF-kB povećava i do pet puta u odgovoru na stimulaciju posredstvom IFNG i TNFA. Ovaj efekat na nivou NF-kB se poništava dejstvom deksametazona, preko mehanizma zavisnog od aktivacije glukokortikoidnog receptora (Bhavsar i sar., 2008). U vaskularnim endotelnim ćelijama, indukcija ekspresije gena za CX3CL1 posredstvom IL-1, TNFA i LPS je zavisna od NF-kB (Garcia i sar., 2000), dok IFNG indukuje gensku ekspresiju CX3CL1 preko aktivacije Janus kinaze 1 (JAK1) i STAT1 (Garcia i sar., 2000; Imaizumi i sar., 2000; Isozaki i sar., 2011). Prilikom indukcije ekspresije gena za CX3CL1 sinergističkim delovanjem TNFA i IFNG, u vaskularnim endotelnim ćelijama TNFA učestvuje u stabilizaciji CX3CL1 iRNK tako što se vezuje za element bogat AU-dinukleotidom u 3' netranslatiranom regionu iRNK (Matsumiya i sar., 2010).

CX3CL1 iRNK je konstitutivno eksprimirana u različitim humanim organima: mozgu, srcu, plućima, bubregu, crevima, skeletnim mišićima (Bazan i sar., 1997), a nivoi iRNK su povišeni u uslovima inflamacije (Muehlhoefer i sar., 2000; Fujimoto i sar., 2001; Cockwell i sar., 2002). U CNS-u, gen za CX3CL1 je konstitutivno eksprimiran u olfaktornom bulbusu, cerebralnom korteksu, hipokampusu i drugim regionima (Nishiyori i sar., 1998). Pokazano je da se u toku embrionalnog razvića

mozga miša varijanta 3 regulatornog faktora X4 (RFX4\_v3, koji predstavlja bitan faktor u morfogenezi mozga) vezuje za proksimalni promotor CX3CL1 i stimuliše njegovu ekspresiju (Zhang i sar., 2006). Medijatori inflamacije, TNFA i IFNG, sinergistički indukuju ekspresiju gena za CX3CL1 u humanim astrocitima (Yoshida i sar., 2001).

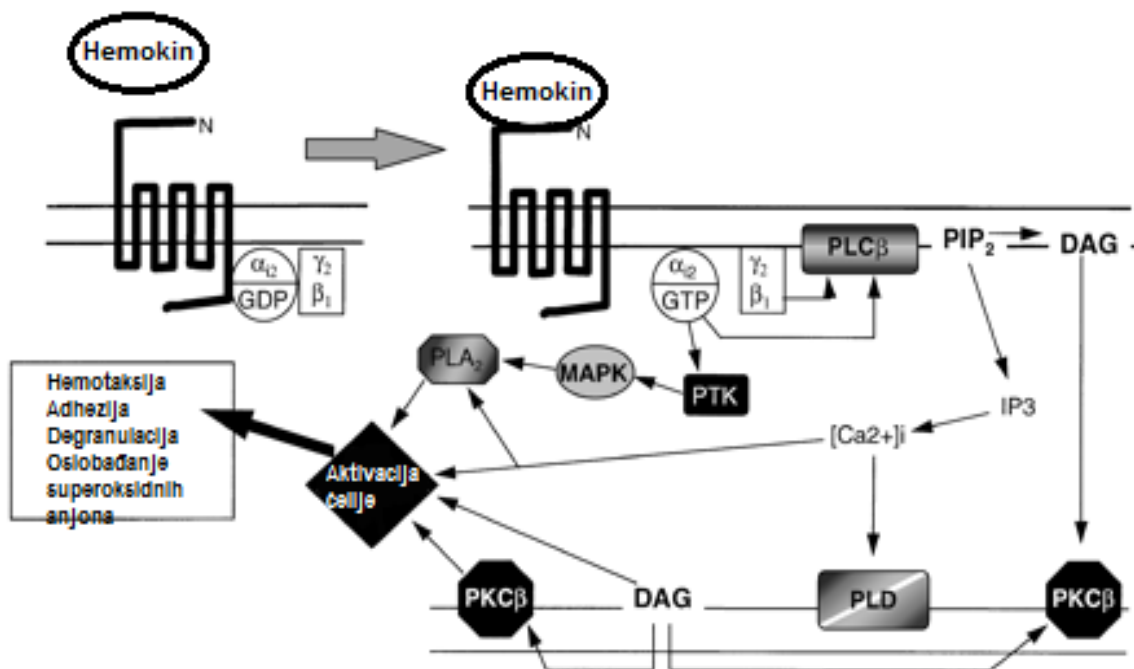
### **1.5.6. Receptor CX3CR1: struktura i funkcija**

Hemokin CX3CL1 ostvaruje svoje efekte vezivanjem za receptor CX3CR1 (CX3C receptor 1) na ciljnim ćelijama. CX3CR1 je visoko-specifičan i jedini receptor za CX3CL1 i koreceptor za HIV (Combadiere i sar., 1998). Kao i svi ostali hemokinski receptori, i CX3CR1 pripada tipu receptora kuplovanih/spregnutih sa G-proteinom (*engl.* G-Protein-Coupled Receptors, *skr.* GPCRs). G-proteini su heterotrimeri sastavljeni od subjedinic: G-alfa, G-beta i G-gama. Receptori kuplovani sa G-proteinom sačinjavaju najveću superfamiliju humanih integralnih membranskih proteina (Flower, 1999; Takeda i sar., 2002). Zajednička strukturna karakteristika ovih receptora je hidrofobno jezgro sastavljeno od 7 transmembranskih domena/alfa-heliksa (7TM), koji su povezani preko 3 unutarćelijska i 3 vanćelijska hidrofилna domena u obliku petlji (Strader i sar., 1994; Pierce i sar., 2002). GPCRs funkcionišu kao membranski receptori koji vanćelijske stimuluse pretvaraju u unutarćelijske signale, kao rezultat vezivanja različitih vanćelijskih liganada. Pored receptora za hemokine, u grupu GPCRs spadaju: receptori retine, mirisni receptori, receptori za neurotransmitere i peptidne hormone (alfa- i beta- adrenergički receptori). S obzirom da imaju ulogu u brojnim biološkim procesima (memorija, funkcija čula vida i mirisa, regulacija krvnog pritiska) (Neves i sar., 2002; Sodhi i sar., 2004), GPCRs su atraktivne terapijske mete. Značajan broj farmaceutskih agenasa utiče na aktivnost ovih receptora (Flower, 1999).

Opšti model mehanizma aktivacije hemokinskih receptora i transdukcije signala unutar ciljnih ćelija prikazan je na *slici U6* (Murdoch i Finn, 2000). Kada je hemokinski receptor u neaktivnom stanju, heterotrimer  $G_i$  je vezan za unutarćelijski C-terminalni domen receptora. Vezivanje hemokina za receptor prouzrokuje da GDP, koji je vezan za G-alfa-i subjedinicu u neaktivnom stanju, bude zamenjen GTP-om. Ovo rezultuje disocijacijom G-alfa-i od dimera G-beta/gama. Zatim G-beta/gama aktivira fosfolipazu C (PLC-beta) koja degradira membranski fosfatidil-inozitol difosfat (PIP<sub>2</sub>) do molekula



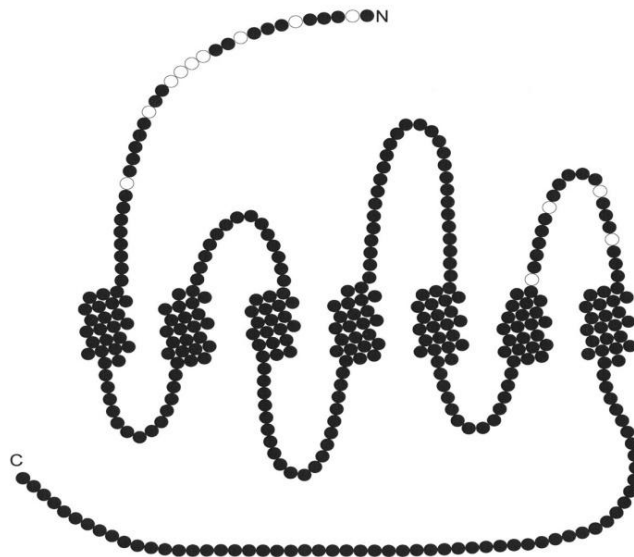
sekundarnih glasnika: diacilglicerola (DAG) i inozitol trifosfata (IP3). DAG aktivira protein-kinazu C (PKC-beta), a IP3 prouzrokuje oslobađanje  $\text{Ca}^{++}$  iz unutarćelijskih depoa. Brzi porast nivoa  $\text{Ca}^{++}$  aktivira fosfolipazu D (PLD). Paralelno, G-alfa-i subjedinica direktno aktivira protein-treonin-kinazu (PTK). PTK aktivira MAPKs, a one dalje aktiviraju fosfolipazu A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>). DAG, PKC,  $\text{Ca}^{++}$  i PLA<sub>2</sub> učestvuju u specifičnim mehanizmima aktivacije ciljnih ćelija, koji konačno rezultuju: ćelijskom hemotaksijom, adhezijom, degranulacijom, oslobađanjem superoksidnih anjona (*slika U6*) (Murdoch i Finn, 2000). Takođe, PTK fosforiliše serinske i treoninske rezidue C-terminalnog domena receptora i tako izaziva desenzitizaciju i inaktivaciju receptora.



*Slika U6.* Model mehanizma aktivacije hemokinskog receptora i unutarćelijske transdukcije signala. *Preuzeto iz: Murdoch i Finn, 2000.*

Receptor CX3CR1 je otkriven 1997. godine, kada je uočeno da se CX3CL1 vezuje sa visokim afinitetom za receptor V28 na monocitima i limfocitima periferne krvi (Imai i sar., 1997). V28 je ubrzo preimenovan u CX3CR1. Struktura CX3CR1 ima opšte odlike strukture hemokinskih receptora tj. GPCRs (Murdoch i Finn, 2000) i ilustrovana je na *slici U7*. CX3CR1 je monomer od 355 AK-a (40.4 kDa), a sačinjavaju ga sledeći domeni: kratki vanćelijski N-terminalni domen sastavljen predominantno od

kiselih AK-a (rezidue 1-31), 7 hidrofobnih transmembranskih domena u vidu alfa-heliksa (rezidue: 32-59, 70-90, 104-125, 143-167, 196-215, 232-256, 274-297), 3 unutarćelijske (rezidue: 60-69, 126-142, 216-231) i 3 vanćelijske (rezidue: 91-103, 168-195, 257-273) hidrofilne petlje koje povezuju transmembranske domene i unutarćelijski C-terminalni domen (rezidue 298-355) koji sadrži serinske i treoninske residue kao mesta fosforilacije tokom regulisanja aktivnosti receptora. Disulfidni most se formira između visoko-konzervisanih cisteinskih rezidua na pozicijama 102 u prvoj vanćelijskoj petlji i 175 u drugoj vanćelijskoj petlji (P49238 (CX3C1\_HUMAN) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot).



*Slika U7.* Prikaz strukture CX3CR1: 7 transmembranskih domena (ilustrovani su kao cilindrični aranžmani aminokiselina), 3 vanćelijske i 3 unutarćelijske petlje, vanćelijski N-terminus i unutarćelijski C-terminus. *Preuzeto iz: Chen i sar., 2006.*

Uspostavljanje interakcije ligand-receptor je ključno u ostvarivanju efekata liganda na ciljnu ćeliju. Na osnovu informacije o strukturi hemokinskog domena i analize mutanata CX3CL1, utvrđeno je da su konzervisane bazne residue, lizin na poziciji 7 i arginin na poziciji 47, važne za interakciju sa receptorom (Harrison i sar., 2001). Za mutirane molekule CX3CL1 kod kojih su izmenjene ove dve aminokiseline, pokazani su redukovani afinitet za CX3CR1 i neefikasna adhezija CX3CR1+ ćelija. Takođe, mutirani CX3CL1 sa zamenom arginina na poziciji 47 (Arg47) prouzrokovao

je poremećenu transdukciju signala uz neefikasnu mobilizaciju unutarćelijskog  $Ca^{++}$ , dok mutacija lizina na poziciji 7 (Lys7) nije uticala na transdukciju signala preko CX3CR1 (Harrison i sar., 2001). Ciljanim zamenama aminokiselina u receptoru CX3CR1, pokazano je da su predominantno kisele aminokiseline (aspartat i glutamat) koje ulaze u sastav N-terminalnog domena i treće vanćelijske petlje receptora odgovorne za afinitet vezivanja liganda (Asp25 i Glu254) i aktivaciju receptora (Glu13, Asp16, Asp266) (Chen i sar., 2006).

CX3CR1 je eksprimiran na: monocitima, T-limfocitima, NK-ćelijama, dendritskim ćelijama, mikroglialnim ćelijama, neuronima, glatkim mišićnim ćelijama, endotelnim ćelijama i trombocitima (Harrison i sar., 1998; Imai i sar., 1997; Schafer i sar., 2004; Schafer i sar., 2007; Nishimura i sar., 2002; Lucas i sar., 2003). Konstitutivna ekspresija CX3CR1 u glialnim ćelijama je značajna za uspostavljanje komunikacije između neurona i mikroglije i održavanje homeostaze u CNS-u (Harrison i sar., 1998). Praćenjem distribucije CX3CR1 na monocitima miša, utvrđeno je da monociti sa nisko-eksprimiranim CCR2 i GR1 (glukokortikoidni receptor) eksprimiraju više CX3CR1 i češće postaju rezidentni tkivni makrofazi, nego efektorski makrofazi (Jung i sar., 2000; Geissmann i sar., 2003). U humanim monocitima visoka ekspresija CX3CR1 je asocirana sa prisustvom CD16 (Ancuta i sar., 2003). Pokazano je da u NK-ćelijama ekspresiju CX3CR1 može stimulirati IL-15, a inhibirati IL-2 (Barlic i sar., 2003). Povišena ekspresija CX3CR1, naročito na monocitima, asocirana je sa nastankom i progresijom nekih hroničnih inflamatornih bolesti. U perifernoj krvi i sinovijalnoj tečnosti pacijenata sa reumatoidnim artritisom veliki udeo monocita (~80%) eksprimira CX3CR1 (Ruth i sar., 2001). U eksperimentalnom modelu ateroskleroze, kod jedinki kod kojih je izbačen gen za CX3CR1 vaskularne lezije su bile manje i sadržale značajno manji broj monocita (Combadiere i sar., 2003). S obzirom na značaj CX3CL1 i CX3CR1 u patogenezi inflamatornih bolesti, inhibicija receptora CX3CR1 je jedan od mogućih vidova terapije ovih bolesti u budućnosti. Do sada je pokazano da: sintetički biološki analozi CX3CL1 blokiraju CX3CR1 i tako sprečavaju hemotaksiju CX3CR1+ ćelija (Inoue i sar., 2005), baklofen (agonist receptora za gama-aminobuternu kiselinu (GABA)) indukuje desenzitizaciju CX3CR1 (Duthey i sar., 2010), a rosiglitazon (agonist receptora aktiviranog proliferatorom peroksizoma-gama (PPAR-gama)) suprimira ekspresiju CX3CL1 i sprečava njegovu translokaciju u

ćelijsku membranu i na taj način suprimira signalizaciju preko CX3CL1-CX3CR1 (Wan i Evans, 2010).

### **1.5.7. Struktura gena za CX3CR1**

Humani gen za CX3CR1 se nalazi na hromozomu 3p21.3 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1524>). Gen za CX3CR1 je dug preko 18 kb i sačinjavaju ga 4 egzona i 3 introna. Tri transkripta nastaju alternativnim spajanjem svakog od tri netranslatirana egzona (1, 2 i 3) sa 4. egzonom koji sadrži kompletan otvoreni okvir čitanja i kodira polipeptid od 355 AK (Garin i sar., 2002). U leukocitima se predominantno nalazi transkript koji nastaje spajanjem 2. i 4. egzona, znatno manje je zastupljen transkript koji nastaje spajanjem 1. i 4. egzona, a najmanje transkript sastavljen od 3. i 4. egzona. Nivoi svake od tri transkripcione varijante CX3CR1 su regulisani od strane jednog od tri promotorska regiona čiju aktivnost regulišu njihovi odgovarajući netranslatirani egzoni. Ova kompleksna regulacija omogućava preciznu i visoko-specifičnu ekspresiju gena za CX3CR1 u različitim tipovima ćelija (Garin i sar., 2002).

### **1.5.8. Polimorfizmi V249I i T280M u genu za CX3CR1**

U humanom genu za CX3CR1 su detektovani brojni polimorfizmi (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CX3CR1%20homo%20sapiens>). Neki od njih su povezani sa nastankom i/ili progresijom određenih bolesti u čijoj patogenezi je poremećeni imunski odgovor. Uspostavljena je asocijacija CX3CR1 polimorfizama sa rizikom za: astmu (rs938203, rs2669849, rs1050592) (Tremblay i sar., 2006), psorijazu (hCV11578468, c\_5687\_1) (Plant i sar., 2006) i infekciju HIV-om (G744A) (Parczewski i sar., 2009).

Dve česte nesinonimne zamene pojedinačnih nukleotida, rs3732379 (V249I/Val249Ile) i rs3732378 (T280M/Thr280Met), su identifikovane u četvrtom egzonu gena za CX3CR1 (Faure i sar., 2000). Zamena V249I je locirana u šestom, a T280M u sedmom transmembranskom domenu CX3CR1. Ova dva polimorfizma

odlikuje jak “linkage disequilibrium” (Faure i sar., 2000) koji rezultuje formiranjem tri česta haplotipa u populaciji: V<sub>249</sub>T<sub>280</sub> (“wild-type”), I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> i I<sub>249</sub>M<sub>280</sub>. Polimorfizmi V<sub>249</sub>I i T<sub>280</sub>M su asocirani sa patogenezom određenih hroničnih inflamatornih/autoimunskih bolesti. Češći aleli oba polimorfizma nose veći rizik za astmu (Tremblay i sar., 2006). Alel I<sub>249</sub> je asociran sa pojačanom fibrostenozom u Kronovoj bolesti (Sabate i sar., 2008). Nađena je veza alela I<sub>249</sub> i haplotipa I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> sa povećanim rizikom za prelazak u završni stadijum bubrežne bolesti kod obolelih od hronične insuficijencije bubrega (Borkar i sar., 2011). Smanjena učestalost alela M<sub>280</sub> je nezavisni faktor rizika za karotidnu aterosklerozu (Zhao i sar., 2010) i koronarnu bolest (Apostolakis i sar., 2007), dok je kod obolelih homozigota MM nađeno veće zadebljanje arterijskog zida (Debette i sar., 2009). Sugerisana je protektivna uloga haplotipa I<sub>249</sub>M<sub>280</sub> u patogenezi ateroskleroze (Moatti i sar., 2001; McDermott i sar., 2001; Apostolakis i sar., 2009).

Funkcionalna analiza je pokazala da leukociti homozigota IIMM (tj. nosilaca haplotipa I<sub>249</sub>M<sub>280</sub>) za CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>, imaju značajno manji broj vezivnih mesta za CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> i redukovani afinitet vezivanja liganda, u odnosu na “wild-type” VVTT ćelije (Faure i sar., 2000). U naknadnoj studiji je pokazano da zamena T<sub>280</sub>M ne menja afinitet vezivanja CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub>, ali da usporava kinetiku vezivanja liganda (McDermott i sar., 2003). Leukociti homozigota MM koji su istovremeno nosioci alela I, imaju defektnu hemotaksiju u odgovoru na solubilni CX<sub>3</sub>CL<sub>1</sub> (McDermott i sar., 2003), dok je adhezivni potencijal receptorske varijante I<sub>249</sub>M<sub>280</sub> veći nego varijante V<sub>249</sub>T<sub>280</sub> (Lavergne i sar., 2005; Daoudi i sar., 2004). Navedene funkcionalne studije sugerišu da polimorfizmi V<sub>249</sub>I i T<sub>280</sub>M mogu uticati na aktivnost receptora CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>. Strukturna analiza je pokazala da ovi polimorfizmi indukuju detektabilne konformacione promene u receptorskim domenima TM<sub>6</sub> i TM<sub>7</sub>, kao i trećoj vanćelijskoj petlji koja ih spaja (Darbandi-Tehrani i sar., 2010). Dosadašnji rezultati ukazuju da polimorfizmi V<sub>249</sub>I i T<sub>280</sub>M prouzrokuju promene u strukturi i funkciji CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub>. S obzirom na strukturno-funkcionalne promene u CX<sub>3</sub>CR<sub>1</sub> koje su posledica aminokiselinskih zamena V<sub>249</sub>I i T<sub>280</sub>M i na postojanje asocijacije ovih genskih polimorfizama sa patogenezom određenih hroničnih inflamatornih i autoimunskih bolesti (Tremblay i sar., 2006; Sabate i sar., 2008; Zhao i sar., 2010; Apostolakis i sar., 2009), u našoj studiji cilj je bio

ispitivanje asocijacije polimorfizama V249I i T280M sa nastankom i progresijom multiple skleroze.

### **1.5.9. Regulacija transkripcije gena za CX3CR1**

U humanim perifernim mononuklearnim leukocitima je detektovan region uzvodno od mesta početka transkripcije gena za CX3CR1, dužine 433 bp, koji u ovim ćelijama ima ulogu konstitutivnog promotora (Barlic i sar., 2004). Ovaj region sadrži vezivno mesto za proteine koji pripadaju porodici transkripcionih faktora pod nazivom nuklearni faktori aktiviranih T-limfocita (NFAT). Analizom *in vitro* i *in vivo* otkriveno je da IL-15 promoviše vezivanje NFAT1 (ali ne i NFAT2) za CX3CR1 promotor, dok IL-2 ima suprotan efekat. Ovi rezultati sugerišu da jedan vid regulacije ekspresije gena za CX3CR1 u leukocitima može biti određen balansom aktivnosti NFAT1 i NFAT2 (Barlic i sar., 2004).

U eksperimentalnom modelu u kome je indukovana povreda tkiva CNS-a, detektovana je povišena ekspresija CX3CR1 i TGFB1 (Chen i sar., 2002). U ovim uslovima TGFB1 dovodi do porasta nivoa CX3CR1 iRNK u mikroglijalnim ćelijama, kao i porasta broja molekula CX3CR1 na njihovoj površini. Prilikom indukcije ekspresije gena za CX3CR1 u prisustvu TGFB1, identifikovana su dva potencijalna vezivna elementa za transkripcioni faktor SMAD u promotoru gena za CX3CR1 (Chen i sar., 2002).

## **1.6. Hemokin CX3CL1 i njegov receptor CX3CR1 u centralnom nervnom sistemu i patogenezi neuroinflamatornih bolesti**

U CNS-u ekspresija CX3CL1 je prvo detektovana u neuronima (Nishiyori i sar., 1998; Harrison i sar., 1998). Utvrđena je konstitutivna ekspresija ovog hemokina u neuronima (ali ne i u vaskularnim endotelnim ćelijama) mozga (Nishiyori i sar., 1998; Harrison i sar., 1998; Hughes i sar., 2002) i kičmene moždine (Verge i sar., 2004;

Lindia i sar., 2005; Clark i sar., 2009). CX3CL1 je eksprimiran i u humanim i pacovskim astrocitima *in situ* i *in vitro* (Hulshof i sar., 2003; Hatori i sar., 2002; Maciejewski-Lenoir i sar., 1999). Najviši nivoi ovog hemokina su detektovani u moždanim strukturama: hipokampusu, korteksu i strijatumu (Tarozzo i sar., 2003). Uopšteno, CX3CL1 je konstitutivno eksprimiran pretežno u neuronima, a inducibilno u astrocitima - delovanjem proinflamatornih citokina na astrocite u kulturi (Hulshof i sar., 2003; Yoshida i sar., 2001; Maciejewski-Lenoir i sar., 1999) i u astrocitima inflamatornih lezija CNS-a u modelu EAE-a (Sunnemark i sar., 2005). Konstitutivna produkcija CX3CL1 u neuronima sugerise na njegovu homeostatsku ulogu, dok inducibilna ekspresija ovog hemokina u astrocitima ukazuje da upravo ona može imati naročiti značaj u neuroinflamaciji. U neuronima, delovanje forbol-estara i eksperimentalna indukcija moždanog udara ne utiču na ekspresiju CX3CL1 iRNK, ali pojačavaju lučenje solubilnog CX3CL1 iz neurona (Hatori i sar., 2002; Chapman i sar., 2000) putem indukcije proteolitičkog sečenja membranskog CX3CL1. Takođe, solubilni CX3CL1 je značajno povišen u mozgu miševa sa EAE-om, dok se nivo CX3CL1 iRNK ne menja, u odnosu na kontrolno tkivo (Huang i sar., 2006). Ovo sugerise da se solubilni CX3CL1 intenzivno oslobađa sa membrana neurona tokom EAE-a. Inhibitori metaloproteinaza efikasno redukuju inducibilno sečenje membranskog CX3CL1 (koje je posredovano metaloproteinazama ADAM10 i ADAM17) u kulturi nervnih ćelija (Chapman i sar., 2000). U kulturi humanih vaskularnih endotelnih ćelija mozga tretman TNF-om dovodi do značajnog porasta nivoa CX3CL1 iRNK i proteina, što je asocirano sa pojačanim sečenjem membranskog CX3CL1 na površini ovih ćelija (Hurst i sar., 2009). Nivo solubilnog CX3CL1 u likvoru zdravih osoba je nizak, ali se on značajno povećava u toku inflamatornih i autoimunskih oboljenja nervnog sistema (Kastenbauer i sar., 2003; Sporer i sar., 2003).

U mozgu CX3CR1 je prvi put detektovan u mikroglialnim ćelijama (Nishiyori i sar., 1998; Harrison i sar., 1998). S obzirom na tipičan ekspresioni profil CX3CL1 i CX3CR1 u CNS-u u bazalnim uslovima, ova dva molekula učestvuju u signalizaciji između neurona i mikroglialnih ćelija. Ekspresija CX3CR1 detektovana je, takođe, u astrocitima (Maciejewski-Lenoir i sar., 1999; Luo i sar., 2002) i neuronima (Hughes i sar., 2002; Hattori i sar., 2005; Sunnemark i sar., 2005) CNS-a čoveka i glodara. Tokom inflamacije, u delovima tkiva mozga inficiranog prionom detektovan je porast nivoa

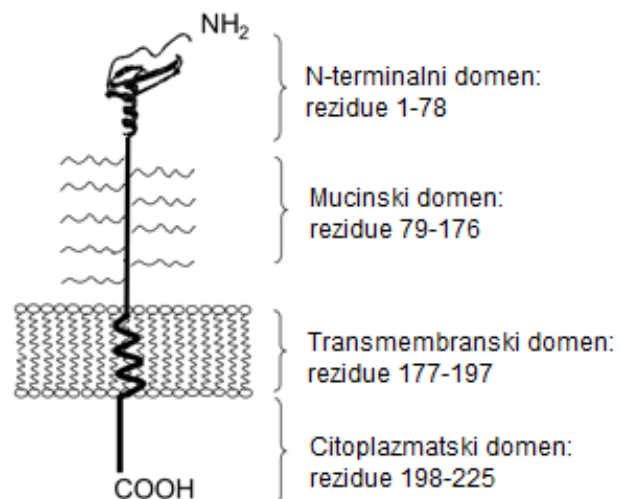
mikroglialnog CX3CR1 (Hughes i sar., 2002). Molekularni mehanizmi koji leže u osnovi odgovora mikroglije na CX3CL1, posredstvom aktivacije mikroglialnog CX3CR1, podrazumevaju stimulaciju transporta unutarćelijskog kalcijuma, fosforilaciju proteina, aktivaciju enzima i hemotaksiju mikroglialnih ćelija (Maciejewski-Lenoir i sar., 1999). Delovanje CX3CL1 štiti mikrogliju od Fas-om posredovane ćelijske smrti *in vitro* (Boehme i sar., 2000). Otkriveno je da CX3CL1 stimuliše produkciju MMP-2 i MMP-9 u kultivisanim mikroglialnim ćelijama (Cross i Woodroffe, 1999). CX3CL1 delimično blokira LPS-om indukovanu sekreciju TNFA (Zujovic i sar., 2000) i smanjuje produkciju proinflamatornih citokina (TNFA i IL-6) i NO (Mizuno i sar., 2003), od strane aktivirane mikroglije *in vitro*, što ukazuje na moguće neuroprotektivne efekte koji se ostvaruju posredstvom aktivacije mikroglialnog CX3CR1 u toku neuroinflamacije. Jedan od mogućih mehanizama putem kojih CX3CL1 suprimira produkciju inflamatornih citokina u mikroglialnim ćelijama podrazumeva supresiju aktivacije transkripcionog faktora NF- $\kappa$ B (Zujovic i sar., 2000). Ekspresija CX3CR1 u astrocitima je niska u bazalnim uslovima, povećava se delovanjem TNFA i IL1B (Maciejewski-Lenoir i sar., 1999) a smanjuje delovanjem CCL5 (Luo i sar., 2002). Aktivacija CX3CR1 verovatno ne posreduje u hemotaksiji astrocita, mada izaziva promenu nivoa intracelularnog kalcijuma u ovim ćelijama (Maciejewski-Lenoir i sar., 1999). Indukcija EAE-a je praćena akumulacijom ćelija koje ekspimiraju CX3CR1 iRNK u inflamatornim lezijama mozga. Najvećim brojem su to mikroglialne ćelije, ali se među njima nalaze i periferni leukociti (Sunnemark i sar., 2005). CX3CR1 je odgovoran za selektivno regrutovanje NK-ćelija u CNS. Tokom EAE-a, miševi kod kojih je izbačen gen za CX3CR1 imali su značajno redukovani broj NK-ćelija u inflamatornim lezijama CNS-a, što je bilo asocirano sa težom kliničkom slikom i većim mortalitetom (Huang i sar., 2006). Otkriveno je da CX3CR1 posreduje i u regrutovanju citotoksičnih CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T-limfocita u moždano tkivo pacijenata sa multiplom sklerozom (Broux i sar., 2012).



## **1.7. Hemokin CXCL16 (CXC ligand 16) i njegov receptor CXCR6 (CXC receptor 6)**

### **1.7.1. Dve forme hemokina CXCL16: struktura i funkcija**

Godine 2000. identifikovan je novi receptor “čistač” koji vezuje oksidovane lipoproteine male gustine (oxLDL, *skr. od engl. oxidized Low Density Lipoprotein*) i koji je zato nazvan SR-PSOX (*skr. od engl. Scavenger Receptor that binds Phosphatidyl-Serine and Oxidized lipids*) (Shimaoka i sar., 2000). Neposredno posle ovog otkrića identifikovan je i novi hemokin koji se vezuje za specifični receptor CXCR6 (drugi nazivi receptora: Bonzo, STRL33 ili TIMSTR) i na taj način posreduje u migraciji T-limfocita (Wilbanks i sar., 2001). Ovaj hemokin je nazvan CXCL16 (CXC ligand 16) i ispostavilo se da ima identičnu aminokiselinsku sekvencu kao SR-PSOX (Wilbanks i sar., 2001). Dakle, reč je o jednom molekulu, CXCL16/SR-PSOX, koji se u ćelijama sintetiše kao polipeptid od 254 aminokiseline (30 kDa). Unutarćelijskim proteolitičkim sečenjem se uklanja N-terminalni signalni peptid (prvih 29 AK-a), što rezultuje dobijanjem polipeptidnog lanca od 225 AK-a. On se zatim ugrađuje u ćelijsku membranu i, kao monomerni membranski protein I tipa, predstavlja transmembransku formu CXCL16. Strukturne karakteristike transmembranskog CXCL16 su veoma slične karakteristikama CX3CL1. One čine jedinstvenim ova dva hemokina, izdvajajući ih od svih ostalih. Poput CX3CL1, i transmembranski CXCL16 se sastoji od četiri domena: vanćelijskog N-terminalnog hemokinskog domena (rezidue 1-78), domena sličnog mucinu (rezidue 79-176), transmembranskog domena koji formira alfa-heliks (rezidue 177-197) i citoplazmatskog domena (rezidue 198-225) (*slika U8*) (Ludwig i Weber, 2007). Domen sličan mucinu je najveći i ima specifičan oblik drške (*slika U8*). Njegove serinske i treoninske residue su izrazito glikozilovane što, kao i u slučaju CX3CL1, verovatno sprečava savijanje mucinke “drške” i omogućava eksponiranje hemokinskog domena na površini ćelije (Matloubian i sar., 2000; Haskell i sar., 2000).



Slika U8. Prikaz strukture transmembranske forme CXCL16. Preuzeto iz: Petit i sar., 2011.

Jedna od glavnih funkcionalnih odlika transmembranskog CXCL16, po kojoj se on razlikuje od CX3CL1, jeste upravo funkcija receptora “čistača”. Iako nema strukturnu homologiju sa drugim receptorima “čistačima”, kao i većina ovih receptora i CXCL16/SR-PSOX je eksprimiran na makrofazima (Shimaoka i sar., 2000; Minami i sar., 2001; Tabata i sar., 2005), učestvuje u vezivanju i endocitozi lipoproteina male gustine (tj. fosfatidilserina i oxLDL) (Shimaoka i sar., 2000), kao i u adheziji i fagocitozi Gram(-) i Gram(+) bakterija (Shimaoka i sar., 2003). Mutacije u hemokinskom domenu CXCL16/SR-PSOX narušavaju njegovu funkciju receptora “čistača”, a takođe i njegovo vezivanje za CXCR6 (Shimaoka<sup>a</sup> i sar., 2004). Primena anti-CXCL16/SR-PSOX monoklonskog antitela rezultuje značajnom inhibicijom fagocitoze bakterija od strane humanih antigen-prezentujućih ćelija, a specifičnost u prepoznavanju bakterija je determinisana isključivo preko hemokinskog domena CXCL16/SR-PSOX (Shimaoka i sar., 2003). Slično kao CX3CL1, transmembranski CXCL16 može da funkcioniše kao adhezivni molekul za ćelije koje eksprimiraju CXCR6, pri čemu je adhezija nezavisna od aktivacije integrina (Shimaoka<sup>b</sup> i sar., 2004). Postoji i solubilni oblik CXCL16 koji ima ulogu hemoatraktanta za CXCR6+ ćelije. Takođe, *in vitro* je pokazano da solubilni CXCL16 stimulatorno deluje na proliferaciju i međućelijsku adheziju glatkih mišićnih ćelija (Chandrasedar i sar., 2004), i na proliferaciju i hemotaksiju endotelnih ćelija (Zhuge i sar., 2005). Solubilni CXCL16

predominantno nastaje na isti način kao i solubilni CX3CL1: proteolitičkim sečenjem transmembranske forme molekula. Metaloproteinaza ADAM10 posreduje u konstitutivnom i inducibilnom sečenju (Abel i sar., 2004; Gough i sar., 2004; Hundhausen i sar., 2007), a ADAM17 samo u inducibilnom sečenju CXCL16 (Ludwig<sup>a</sup> i sar., 2005). Precizno mesto proteolitičkog sečenja membranskog CXCL16 nije utvrđeno, ali je poznato da se nalazi u mucinskom domenu u blizini ćelijske membrane (Matloubian i sar., 2000) i da može da varira pod uslovima konstitutivnog i inducibilnog sečenja (Hundhausen i sar., 2007). Mehanizam proteolitičkog sečenja i regulacija odnosa nivoa transmembranske i solubilne forme CXCL16 su u osnovi isti kao i za CX3CL1 i detaljno su opisani u poglavlju: 1.5.2. Regulacija odnosa nivoa transmembranske i solubilne forme CX3CL1.

CXCL16 je eksprimiran predominantno u makrofazima (Shimaoka i sar., 2000; Minami i sar., 2001; Tabata i sar., 2005), dendritskim ćelijama (Shimaoka<sup>b</sup> i sar., 2004; Tabata i sar., 2005), B-limfocitima (Wilbanks i sar., 2001) i glatkim mišićnim ćelijama (Abel i sar., 2004; Hofnagel i sar., 2002; Wagsater i sar., 2004). T-limfociti (Shashkin i sar., 2003) i endotelne ćelije (Abel i sar., 2004; Hofnagel i sar., 2002) takođe eksprimiraju detektabilne nivoe CXCL16. Otkriveno je da proinflamatorni citokini IFNG i TNFA indukuju ekspresiju CXCL16 u vaskularnim ćelijama i monocitima *in vitro* (Abel i sar., 2004; Wagsater i sar., 2004; Wuttge i sar., 2004), a sam CXCL16 stimuliše produkciju proinflamatornih Th1 citokina (Gursel i sar., 2006). Kada je reč o patogenezi hroničnih inflamatornih bolesti, CXCL16 je najviše izučavan u aterosklerozi. Visoka ekspresija CXCL16 iRNK i proteina je detektovana u koronarnim i karotidnim aterosklerotskim plakovima, u odnosu na intaktnu kontrolnu arteriju, pri čemu je CXCL16 bio predominantno eksprimiran u makrofazima lezija (Minami i sar., 2001). U eksperimentalnom modelu ateroskleroze, miševi sa izbačenim genima za apolipoprotein E (ApoE<sup>-/-</sup>) (Wuttge i sar., 2004) i receptor za LDL (LDLR<sup>-/-</sup>) (Aslanian i Charo, 2006) i koji su bili na režimu ishrane bogate lipidima, imali su značajno povišenu ekspresiju gena za CXCL16 u plakovima (u odnosu na tkivo zdrave arterije) što je bilo u korelaciji sa dužinom trajanja lipidne dijeta. Ovi rezultati ukazuju da uloga CXCL16 kao receptora "čistača" može imati naročiti značaj tokom patogeneze ateroskleroze (Minami i sar., 2001; Wuttge i sar., 2004; Aslanian i Charo, 2006). Kod miševa deficitarnih za CXCR6 aterogeneza je bila sporija, uz prisustvo redukovano

broja T-limfocita i makrofaga u aterosklerotskim lezijama (Galkina i sar., 2007). Dakle, u patogenezi ateroskleroze uloga CXCL16 je dvojaka: kao receptor "čistač" on vezuje oxLDL i tako može da ostvaruje ateroprotektivne efekte, dok kao hemoatraktant stimuliše regrutovanje leukocita u zid arterija i tako stimuliše aterogenezu. U patogenezi EAE-a je pokazano da CXCL16 ima važnu ulogu da stimuliše diferencijaciju antigen-specifičnih T-limfocita i regrutovanje mononuklearnih leukocita u CNS (Fukumoto i sar., 2004). Solubilni CXCL16 deluje kao hemoatraktant za većinu CXCR6+ ćelija imunskog sistema, olakšavajući njihovu migraciju u sekundarne limfoidne organe (Hara i sar., 2006; Hase i sar., 2006) i na mesta inflamacije u tkivima (Sato i sar., 2005; van der Voort i sar., 2005). Povišeni nivoi solubilnog CXCL16 su detektovani u: plazmi pacijenata sa stenozom koronarnih arterija (Yi i sar., 2008), serumu pacijenata sa akutnim koronarnim sindromom (Sun i sar., 2008), plazmi pacijenata sa akutnim infarktom mozga (Ueland i sar., 2012), sinovijalnoj tečnosti pacijenata sa reumatoidnim artritisom (van der Voort i sar., 2005), plazmi pacijenata sa hroničnom insuficijencijom bubrega (Lin i sar., 2011) i likvoru pacijenata sa multiplom sklerozom i drugim neuroinflamatornim bolestima (le Blanc i sar., 2006). Rezultati dosadašnjih studija ukazuju na to da je proteolitičko sečenje transmembranske forme CXCL16, kao i CX3CL1, asocirano sa mehanizmom inflamacije i stoga solubilne forme ovih hemokina mogu biti markeri inflamatornog procesa u patogenezi određenih humanih bolesti.

### **1.7.2. Struktura gena za CXCL16**

Humani gen za CXCL16 se nalazi na hromozomu 17p13, dužine je 6 283 bp i sastoji se od 5 egzona i 4 introna. Kodira polipeptidni lanac CXCL16 dužine 254 AA-e (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/58191>).

### **1.7.3. Polimorfizmi I123T i A181V u genu za CXCL16**

U humanom genu za CXCL16 je detektovan veliki broj polimorfizama tipa SNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CXCL16%20homo%20sapiens>). Do sada je uspostavljena asocijacija polimorfizama u 4. egzonu i 4. intronu sa nastankom i/ili

progresijom određenih bolesti. Polimorfizam rs3744700 (T/G) u 4. intronu gena za CXCL16 je asociran sa rizikom za nastanak koronarne bolesti (Huang i sar., 2010).

Česte nesinonimne zamene pojedinačnih nukleotida, rs1050998 (I123T/Ile123Thr) i rs2277680 (A181V/Ala181Val), identifikovane su u četvrtom egzonu gena za CXCL16. One su u izuzetno jakom “linkage disequilibrium”-u, što rezultuje prisustvom dva predominantna haplotipa: I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> (“wild-type”) i T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> (Petit i sar., 2011; International HapMap Consortium, 2003). Kod pacijenata sa koronarnom bolešću, nosioci alela V181 imaju povećan stepen stenozе koronarnih arterija (Lundberg i sar., 2005). Genotip VV je asociran sa ranijim oboljevanjem od Kronove bolesti i težom kliničkom slikom (Seiderer i sar., 2008). Iako prethodne studije sugerišu na ulogu CXCL16 u patogenezi multiple skleroze (Fukumoto i sar., 2004; le Blanc i sar., 2006), do sada nije urađena ni jedna studija asocijacije polimorfizama I123T i A181V sa nastankom i progresijom ove bolesti.

Polimorfizmi I123T i A181V su locirani na suprotnim krajevima mucinskog domena transmembranskog CXCL16. Pozicija A181V, u neposrednoj blizini ćelijske membrane, ukazuje da ovaj polimorfizam potencijalno utiče na proteolitičko sećenje membranske forme CXCL16. U jednoj studiji su analizirani efekti genskih polimorfizama I123T i A181V na funkcionalna svojstva CXCL16 *in vitro* i *ex vivo* (Petit i sar., 2011). Ustanovljeno je da su obe proteinske varijante CXCL16, I123A181 (“wild-type”) i T123V181, slične u pogledu funkcije receptora “čistača” i hemotaksije *in vitro*. Međutim, za razliku od I123A181, T123V181 varijanta CXCL16 ne može da promovise adheziju CXCR6+ ćelija *in vitro*. U *ex vivo* analizi je potvrđeno da monociti donora homozigotnih za alele T123 i V181 ne mogu da posreduju u adheziji ćelija koje eksprimiraju CXCR6. S obzirom da je u istoj studiji utvrđeno da aleli T123 i V181 nisu asocirani sa rizikom za nastanak koronarne bolesti i da varijantu T123V181 odlikuje odsustvo svojstva adhezije (Petit i sar., 2011), sledi da su hemotaksija i funkcija receptora “čistača” svojstva CXCL16 koja prevashodno doprinose patogenezi određenih hroničnih inflamatornih bolesti kao što je ateroskleroza.

#### 1.7.4. Regulacija transkripcije gena za CXCL16

Jedan od transkripcionih faktora koji učestvuje u regulaciji ekspresije gena za CXCL16 je aktivatorni protein-1 (AP-1). U *cis*-regulatornom regionu gena za CXCL16 je identifikovano vezivno mesto za AP-1 (Chandrasekar i sar., 2005). Ustanovljeno je da u glatkim mišićnim ćelijama aorte pacova IL-18 indukuje gensku ekspresiju CXCL16, putem unutarćelijske transdukcije signala preko: faktora 88 primarnog odgovora na diferencijaciju ćelija mijeloidne loze (*engl.* Myeloid Differentiation primary response 88, *skr.* MYD88), kinaze asocirane sa receptorom za IL-1 (*engl.* Interleukin-1 receptor-associated kinase, *skr.* IRAK1), faktora 6 asociranog sa TNFR (*engl.* Tumor necrosis factor Receptor-Associated Factor 6, *skr.* TRAF6), proto-onkogeni tirozin kinaze c-Src, PI3 kinaze, proto-onkogeni serin-treonin kinaze Akt, c-Jun (AP-1) N-terminalne kinaze (*engl.* c-Jun N-terminal kinase, *skr.* JNK) i AP-1 (Chandrasekar i sar., 2005). U eksperimentalnom modelu inflamacije bubrega, u ćelijama bubrežnih tubula TWEAK (*skr.* od *engl.* Tumor necrosis factor-like Weak inducer of apoptosis) indukuje ekspresiju CXCL16 iRNK, koja je posredovana transkripcionim faktorom NF- $\kappa$ B i rezultuje porastom nivoa membranskog i solubilnog CXCL16 (Izquierdo i sar., 2012).

#### 1.7.5. Receptor CXCR6: struktura i funkcija

Efekte hemokina CXCL16 se ostvaruju putem njegovog vezivanja za specifični i jedini receptor, CXCR6 (CXC receptor 6; drugi nazivi: Bonzo, STRL33, TYMSTR), na ciljnim ćelijama. CXCR6 je otkriven 1997. godine, kao koreceptor za HIV na T-limfocitima (Liao i sar., 1997; Deng i sar., 1997). CXCR6, poput CX3CR1 i drugih hemokinskih receptora, pripada tipu receptora kuplovanih/spregnutih sa G-proteinom (GPCRs). Opšte strukturne i funkcionalne odlike GPCRs i hemokinskih receptora su opisane u poglavlju: 1.5.6. Receptor CX3CR1: struktura i funkcija.

CXCR6 je monomer sastavljen od 342 AA-e (39,3 kDa). Poput ostalih GPCRs, CXCR6 se sastoji od sledećih domena: vanćelijski N-terminalni domen (rezidue 1-32), 7 hidrofobnih transmembranskih domena u vidu alfa-heliksa (rezidue: 33-59, 69-89, 104-125, 144-164, 188-215, 232-259, 276-293), 3 unutarćelijske (rezidue: 60-68, 126-

143, 216-231) i 3 vanćelijske (rezidue: 90-103, 165-187, 260-275) hidrofilne petlje koje povezuju transmembranske domene, i unutarćelijski C-terminalni domen (rezidue 294-342). Disulfidni most se formira između visoko-konzerviranih cisteinskih rezidua na pozicijama 102 u prvoj vanćelijskoj petlji i 180 u drugoj vanćelijskoj petlji (O00574 (CXCR6\_HUMAN) Reviewed, UniProtKB/Swiss-Prot).

Na osnovu analize mutanata CXCL16 koji su konstruisani zamenom pojedinačnih baznih aminokiselina alaninom u nekonzervisanom regionu hemokinskog domena, utvrđeno je da mutanti sa zamenama His80Ala, His85Ala i Lys105Ala imaju značajno povećanu aktivnost preuzimanja oxLDL-a i fagocitoze bakterija, u poređenju sa nemutiranim CXCL16. Bilo koja od ove tri aminokiselinske zamene značajno smanjuje međućelijsku adheziju posredovanu preko CXCL16, što sugerije da su bazne aminokiseline u nekonzervisanom regionu hemokinskog domena CXCL16 važne za uspostavljanje interakcije CXCL16 sa CXCR6 (Liu i sar., 2011). Zamene kiselih aminokiselina u 2. i 3. vanćelijskoj petlji receptora CXCR6, Asp176Asn i Glu274Lys, rezultuju nemogućnošću interakcije receptora sa solubilnim CXCL16, što ukazuje na ključnu ulogu Asp176 i Glu274 u vezivanju liganda. Međutim, iako nije u stanju da interaguje sa solubilnim CXCL16, mutant CXCR6 sa zamenom Glu274Lys može da promoviše snažnu adheziju sa membranskim CXCL16, a to sugerije da solubilni i membranski CXCL16 mogu imati različite aktivne konformacije (Petit i sar., 2008).

Transmembranski CXCL16 posreduje u integrin-nezavisnoj adheziji ćelija koje ekspimiraju CXCR6, a solubilni oblik CXCL16 ima ulogu hemoatraktanta za CXCR6+ ćelije (Shimaoka<sup>b</sup> i sar., 2004). Inhibitor G-alfa-i subjedinice, pertuzijski toksin (PTX), efikasno suprimira hemotaksiju CXCR6+ ćelija koju indukuje CXCL16 (Shimaoka<sup>b</sup> i sar., 2004). Ekspresija CXCR6 je detektovana na: CD4+ Th1 limfocitima, CD8+ Tc1 limfocitima i regulatornim T-limfocitima (Tabata i sar., 2005; Sharron i sar., 2000; Kim i sar., 2001; Sato i sar., 2005), glatkim mišićnim ćelijama (Chandrasekar i sar., 2004), dendritskim ćelijama (Ignatius i sar., 2000), B-limfocitima (Sharron i sar., 2000; Nakayama i sar., 2003), makrofazima (Gaina i sar., 2007) i pojedinim subpopulacijama T-limfocita prirodnih ubica (Kim i sar., 2002; Thomas i sar., 2003; Johnston i sar., 2003). Pokazano je da citokini IL-2 i IL-15 indukuju ekspresiju CXCR6 u memorijskim T-limfocitima (Unutmaz i sar., 2000). T-limfociti koji ekspimiraju CXCR6 su prisutni u velikom broju u inflamatornim lezijama zglobova i jetre (Kim i sar., 2001). U

eksperimentalnom modelu ateroskleroze aterogeneza je bila sporija kod životinja deficitarnih za CXCR6, što je bilo povezano sa redukcijom broja T-limfocita i makrofaga u aterosklerotskim lezijama (Galkina i sar., 2007). U ćelijskim linijama MBP-specifičnih T-limfocita, ekspresija CXCR6 je ključni marker konverzije ovih ćelija u memorijske T-limfocite (Calabresi i sar., 2002). S obzirom da navedene studije (Kim i sar., 2001; Galkina i sar., 2007; Calabresi i sar., 2002) pokazuju da CXCR6, poput CX3CR1, učestvuje u patogenezi inflamatornih bolesti, specifična blokada receptora CXCR6 ili blokada oba receptora predstavljaju jedan od potencijalnih budućih vidova terapije ovih bolesti.

### **1.7.6. Struktura gena za CXCR6**

Humani gen za CXCR6 je lociran na hromozomu 3p21. Dužine je 4 872 bp, sastoji se od 2 egzona i 1 introna i kodira polipeptidni lanac CXCR6 dužine 342 AA-e (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10663>).

### **1.7.7. Polimorfizmi u genu za CXCR6**

U humanom genu za CXCR6 je detektovan značajan broj polimorfizama (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CXCR6%20homo%20sapiens>). S obzirom da CXCR6 ima ulogu koreceptora za HIV, do sada su polimorfizmi u genu za CXCR6 u nekoliko studija asocirani sa nastankom i progresijom AIDS-a (*skr. od engl. Acquired Immuno-Deficiency Syndrome*). Ređi alel polimorfizma rs2234358 (G/T), pozicioniranog u 3' netranslatiranom regionu gena, je asociran sa bržim nastankom AIDS-a kod inficiranih HIV-om i većom smrtnošću kao posledicom ovog sindroma (Limou i sar., 2010). Polimorfizam rs2234355 (G/A) rezultuje zamenom aminokiseline Glu3Lys, u N-terminalnom domenu CXCR6. U okviru populacije Afro-Amerikanaca, u kojoj je frekvencija alela Lys3 visoka (44%), osobe sa AIDS-om homozigotne ili heterozigotne za alel Glu3 su imale višestruko veću smrtnost usled pneumonije, u odnosu na obolele homozigote Lys3Lys (Duggal i sar., 2003).



### **1.7.8. Regulacija transkripcije gena za CXCR6**

Do sada je identifikovano nekoliko transkripcionih faktora koji učestvuju u regulaciji ekspresije gena za CXCR6. Bakterijski LPS aktivira receptor sličan Toll-u (*engl.* Toll-Like Receptor, *skr.* TLR) 4 i, putem transdukcije signala preko MYD88, TRAF6, MAPK1 i JNK, dovodi do aktivacije transkripcionog faktora AP-1 koji indukuje ekspresiju gena za CXCR6 u glatkim mišićnim ćelijama humane aorte (Patel i sar., 2006). Transkripcioni faktor T-bet je eksprimiran u alveolarnim makrofazima i limfocitima obolelih od sarkoidoze pluća. Povišena ekspresija T-bet iRNK koreliše sa povišenom ekspresijom gena za IFN-gama, određene citokine/hemokine i njihove receptore među kojima je i CXCR6, a koji su uključeni u patogenezu ove bolesti (Kriegova i sar., 2011). U humanim CD4+CD25+ regulatornim T-limfocitima, analog vitamina D (TX527) indukuje gensku ekspresiju CXCR6 i drugih hemokinskih receptora (CCR5, CXCR3) koji omogućavaju migraciju ovih regulatornih T-limfocita na mesto inflamacije (Baeke i sar., 2011).

### **1.8. Hemokin CXCL16 i njegov receptor CXCR6 u centralnom nervnom sistemu i patogenezi neuroinflamatornih bolesti**

U normalnom tkivu CNS-a ekspresija CXCL16 je niska. Za razliku od CX3CL1, u bazalnim uslovima CXCL16 nije eksprimiran u neuronima, već pretežno u endotelnim ćelijama (Ludwig<sup>b</sup> i sar., 2005). Prvi pokazatelj da CXCL16 može imati ulogu proinflamatornog hemokina u patologiji CNS-a, su rezultati studije o ekspresiji CXCL16 tokom eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa (Fukumoto i sar., 2004). U modelima akutnog i adoptivnog EAE-a primena monoklonskog antitela na CXCL16 rezultovala je smanjenom učestalošću bolesti, smanjenom infiltracijom mononuklearnih leukocita u CNS, opadanjem nivoa serumskog IFNG i smanjenom produkcijom mijelin-specifičnih T-limfocita. Takođe, histopatološka analiza je pokazala da težina kliničke slike u EAE-u pozitivno koreliše sa nivoom ekspresije CXCL16 u CNS-u (Fukumoto i sar., 2004). CXCL16 je detektovan u astrocitima, gde njegova

ekspresija može da bude povišena pod uticajem medijatora inflamacije kao što su IFNG i TNFA (Ludwig<sup>b</sup> i sar., 2005). Solubilni CXCL16 se konstitutivno oslobađa sa površine astroglialnih ćelija, putem proteolitičkog sečenja transmembranskog CXCL16 koje katalizuje ADAM10, dok je u reaktivnim astrocitima produkcija solubilnog CXCL16 stimulirana aktivnošću ADAM17 (Ludwig<sup>b</sup> i sar., 2005). Inducibilna proizvodnja i proteolitičko sečenje CXCL16 u mozgu su pokazani analizom profila ekspresije proteina, otkrivajući značajni porast nivoa CXCL16 u mozgu miševa sa pneumokoknim meningitisom (Klein i sar., 2006). Nivoi solubilnog CXCL16 u serumu i likvoru su značajno povišeni u multiploj sklerozi i drugim neuroinflamatornim autoimunskim oboljenjima (le Blanc i sar., 2006). Pritom, kod pacijenata su detektovani i značajno viši nivoi CXCL16 u likvoru nego u serumu. To potvrđuje lokalnu produkciju CXCL16 u CNS-u tokom patogeneze neuroinflamatornih bolesti, najverovatnije pretežno od strane reaktivnih astrocita i aktivirane mikroglije.

CXCR6 je detektovan u kultivisanim astrocitima i mikroglijalnim ćelijama (Ludwig<sup>b</sup> i sar., 2005). Ćelijska linija prekursora astrocita takođe eksprimira CXCR6, čak više nego zreli astrociti (Hattermann i sar., 2008). Stimulacija ovih ćelija solubilnim CXCL16 aktivira signalni put preko PI3 kinaze i Akt-a koji rezultuje aktivacijom transkripcionog faktora AP-1 i indukcijom migracije i proliferacije ovih astroglialnih ćelija. Pošto se CXCL16 eksprimira u astrocitima, a CXCR6 i u prekursorima astrocita, očekivano je da interakcija CXCL16-CXCR6 može doprinosti pozicioniranju astroglialnih prekursora u CNS-u, naročito u neuroinflamatornim i drugim patološkim stanjima kada je produkcija CXCL16 u astrocitima inducibilna (Ludwig<sup>b</sup> i sar., 2005). Tada oslobođeni CXCL16 može da stimuliše migraciju i proliferaciju CXCR6+ astroglialnih ćelija, što doprinosi astrogliozu u delovima tkiva CNS-a koji su oštećeni tokom neuroinflamatornog procesa. U patogenezi EAE-a je otkriveno da je CXCR6 tipično eksprimiran na mijelin-reaktivnim CD4+ Th1 limfocitima koji proizvode IFNG (Calabresi i sar., 2002; Fukumoto i sar., 2004). Buduće funkcionalne studije koje koriste model životinja deficijentnih za CXCL16/CXCR6 ili primenjuju odgovarajuća neutrališuća antitela za ove molekule imajuće za cilj da detaljnije rasvetle ulogu CXCL16 i CXCR6 u patogenezi hroničnih inflamatornih bolesti među kojima je i multipla skleroza.

## 2. HIPOTEZA I CILJEVI

Ova studija obuhvata genetsko-epidemiološku analizu polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 i analizu ekspresije gena za: CX3CL1, CX3CR1, CXCL16 i CXCR6, u patogenezi multiple skleroze, u okviru ciljne grupe ispitanika iz Srbije. Studija se bazira na sledećoj hipotezi: geni uključeni u procese inflamacije i autoimunskog odgovora (CX3CL1, CX3CR1, CXCL16 i CXCR6) su potencijalni pokazatelji nastanka i/ili progresije multiple skleroze. Hipoteza će biti proverena na dva načina: 1) analizom asocijacije alela, genotipova i haplotipova polimorfizama u egzonima gena za CX3CR1 i CXCL16 sa nastankom i kliničkim parametrima multiple skleroze; 2) analizom asocijacije nivoa ekspresije gena za CX3CL1, CX3CR1, CXCL16 i CXCR6, u mononuklearnim leukocitima periferne krvi, sa nastankom i kliničkim parametrima bolesti.

U ovoj studiji postavljeni su sledeći ciljevi:

1. Utvrditi frekvencije alela, genotipova i haplotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 i polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16, u kontrolnoj grupi zdravih osoba i grupi pacijenata sa multiplom sklerozom.
2. Utvrditi da li su ispitivani genski polimorfizmi asociirani sa nastankom multiple skleroze.
3. Utvrditi da li su ispitivani genski polimorfizmi asociirani sa kliničkim tokom i progresijom multiple skleroze.
4. Uraditi bioinformatičku analizu predviđanja efekata haplotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na interakciju CX3CL1-CX3CR1 i predviđanja efekata haplotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 na interakciju CXCL16-CXCR6. Ispitati vezu između rezultata bioinformatičke analize i eksperimentalne analize ciljnih polimorfizama, u okvirima patogeneze multiple skleroze.
5. Uraditi relativnu kvantifikaciju ekspresije gena za CX3CL1, CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 na nivou iRNK, u mononuklearnim leukocitima periferne krvi zdravih osoba i pacijenata sa multiplom sklerozom i na osnovu dobijenih rezultata utvrditi da li su relativni nivoi ispitivanih iRNK, u datom perifernom tkivu, molekularni markeri nastanka, kliničkog toka i progresije multiple skleroze.

## **3. MATERIJAL I METODE**

### **3.1. MATERIJAL**

#### **3.1.1. Uzorak**

Genetsko-epidemiološka studija u kojoj se ispituju asocijacija polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 i asocijacija ekspresije gena za CX3CL1 i CXCL16 i njihove receptore sa nastankom i progresijom multiple skleroze, obuhvatila je ciljnu grupu pacijenata kod kojih su postavljane dijagnoze i praćenje toka bolesti, uz odgovarajuće kliničke i biohemijske analize, obavljene u periodu 2008-2012. godine na Klinici za neurologiju Vojnomedicinske akademije (VMA), Beograd, Srbija. Kod svih pacijenata kojima je postavljena dijagnoza multiple skleroze, obavljen je klinički neurološki pregled i određene su vrednosti kliničkih parametara: EDSS (status ekspanzije trajnog invaliditeta) (Kurtzke, 1983), IP (indeks progresije, predstavlja količnik vrednosti EDSS i trajanja bolesti izraženog u godinama) i MSSS (EDSS korigovan na trajanje bolesti) (Roxburgh i sar., 2005). Na osnovu kliničkog toka, definisane su dve osnovne forme bolesti: relapsno-remitentna forma (sa sekundarno-progresivnom fazom kao kontinuumom) i primarno-progresivna forma (Lublin i sar., 1996). Definisani su prvi klinički simptomi u inicijalnoj manifestaciji bolesti na osnovu kojih su oformljene tri simptomatske grupe: MC grupa (sa motornim slabostima po tipu oštećenja centralnog motornog neurona i cerebelarne disfunkcije), S grupa (sa senzornim smetnjama) i RB grupa (sa retrobulbarnim neuritisom). Za genetske analize, od svakog pacijenta uzeta su po dva uzorka pune krvi: iz jednog je izolovana ćelijska jedarna DNK za analizu polimorfizama, a iz drugog uzorka izdvojeni su mononuklearni leukociti i zatim iz njih izolovana ukupna RNK za analizu genske ekspresije. Od svake osobe uključene u ovu studiju uzeti su lični i anamnestički podaci obuhvaćeni upitnikom.

Kontrolna grupa je obuhvatila zdrave pripadnike srpske populacije koji su dobrovoljno uključeni u studiju prilikom kontrolnog zdravstvenog pregleda na teritoriji Beograda, kod kojih su urađene standardne biohemijske analize krvi. Za genetsku

studiju, od svakog člana kontrolne grupe uzeta su po dva uzorka pune krvi: jedan za izolaciju ćelijske DNK za analizu polimorfizama, a drugi za izdvajanje mononuklearnih leukocita i izolaciju ukupne RNK iz ovih ćelija u cilju analize genske ekspresije.

Etički komitet je odobrio studiju, a informativni pristanak je dobijen od svih učesnika studije. Genetsko-epidemiološka analiza polimorfizama DNK i genske ekspresije urađena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča”, Beograd, Srbija.

### **3.1.2. Aparatura**

Prilikom izrade teze korišćena je sledeća aparatura:

- ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation (Applied Biosystems)
- Spektrofotometar BioSpec-nano (Shimadzu Biotech)
- 2100 Bioanalyzer (Agilent)
- PCR aparat: ABI GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems)
- Real-time PCR sistem: Applied Biosystems 7500 (Applied Biosystems)
- Sistem za horizontalnu elektroforezu (IBI- International Biotechnologies Inc, Model HRH, OWL Scientific, Model B3 , Inc. Woburn, MA , SAD)
- Sistem za vertikalnu elektroforezu (Elektrofor VP-80, Rovigo, Italy, Bio Rad, SAD)
- Sistem za snimanje i analizu gelova GDS8000 (UVP Inc, Upland, CA , SAD): mračna komora sa UV/belom svetlošću, CCD kamera, transluminator, procesor (PC), program za obradu podataka
- Mikrocentrifuga (Eppendorf 5417R)
- Centrifuga ("Super Speed" Sorvall Inc, Norwalk Conn USA)
- Ispravljači (LKB Bromma 2197 Power supply, LKB Bromma 2297 Macro drive 5 constant power supply, Atiocross power 150)
- Vodeno kupatilo (Termomedicinski aparati, Bodalec i Havočić, YU)
- Vaga (Tehtnica ET 111, YU)
- Analitička vaga (Mettler, Switzerland)
- pH metar (Iskra MA 5730, YU).

## 3.2. METODE

### 3.2.1. Izolacija DNK iz ćelija krvi, metodom po Kunkel-u i saradnicima

Metoda izolacije DNK po Kunkel-u i saradnicima (1977) rezultuje visokim prinosom i kvalitetom izolovane DNK a, takođe, omogućava i dugotrajno i jednostavno čuvanje uzoraka izolovanih na ovaj način. Metoda podrazumeva izdvajanje DNK iz 3-5 ml pune krvi uzete sa antikoagulansom. U ovom radu, za analizu polimorfizama DNK, svim ispitanicima uzimano je po 3 ml krvi iz kubitalne vene i puna krv sa antikoagulansom EDTA čuvana je na  $-20^{\circ}\text{C}$ , do procedure izolacije ćelijske DNK.

#### Reagensi

Etanol ( $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ , min 95%,  $\text{Mr}=46,07$ , Zorka Pharma)

Etilendiamin tetrasirćetna kiselina, dinatrijumova so, dihidrat (EDTA,  $\text{Mr}=372,24$ , Sigma)

Ekvilibrisani fenol,  $\text{pH}=6,7$  ( $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$ ,  $\text{Mr}=94,11$ , USB)

Hloroform ( $\text{CHCl}_3$ ,  $\text{Mr}=119,38$ ,  $\text{nl}=1,47$  kg, Kemika)

Izoamilalkohol ( $\text{C}_5\text{H}_{12}\text{O}$ ,  $\text{Mr}=88,15$ ,  $\text{nl}=0,81$  kg, Merk)

Magnezijum hlorid ( $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mr}=203,3$ , Sigma)

Natrijum acetat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2\text{Na} \times \text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Mr}=136,08$ , Zorka Pharma)

Natrijum dodecil sulfat (SDS,  $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{O}_4\text{S} \times \text{Na}$ ,  $\text{Mr}=288,4$ , Sigma)

Natrijum hlorid (Zorka Pharma)

Proteinaza K (Sigma)

Saharoza ( $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ ,  $\text{Mr}=342,30$ , Sigma)

Sirćetna kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , min 99%,  $\text{Mr}=60,05$ ,  $\text{nl}=0,05$ kg, Zorka Pharma)

Tris (trihidroksimetil) aminometan ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ,  $\text{Mr}=121,14$ , Sigma)

Triton X-100 (t-oktilfenoksipolietoksietanol, Sigma)

#### Rastvori

1. Lizogeni rastvor:

0,32 mol/l saharoza

10 mmol/l Tris-HCl,  $\text{pH}$  7,5

5 mmol/l MgCl<sub>2</sub>

1% Triton X-100

2. Rastvor II:

0,024 mmol/l EDTA, pH 8,0

0,075 mmol/l NaCl

3. 10 mg/ml, proteinaza K

4. 3 mmol/l, pH 5,0, Na-acetat

5. TE (Tris-EDTA) pufer:

10 mmol/l Tris, pH 7,6

1 mmol/l EDTA

### **Protokol**

- 1) Uzorku od 3 ml krvi dodato je 24 ml hladnog lizogenog rastvora.
- 2) Smeša je homogenizovana u homogenizeru 3-5 min, na ledu. (Tokom homogenizacije degradiraju se ćelije, a jedra ostaju cela.)
- 3) Smeša je zatim centrifugirana na 800 rcf, 10 min, 4°C.
- 4) Supernatant je odliven, a talogu je dodato 125 µl rastvora II u kome je talog zatim resuspendovan.
- 5) Smeši je dodato 62,5 µl 10% SDS-a, snažnog deterdženta koji razlaže sve ćelijske membrane pa, prema tome, i jedarnu.
- 6) Zatim je dodato 50 µl proteinaze K (10 mg/ml) i smeša je inkubirana 12h na 37 °C, jer je to optimalna temperatura na kojoj proteinaza razlaže sve proteine i sebe samu.
- 7) Posle inkubacije u smešu je dodato 0,5 ml ekvilibrisanog fenola pH 7,8 i ona je centrifugirana na 10800 rpm, 19 min, 18°C. Ekstrakcija fenolom omogućava razdvajanje velike količine proteina od DNK.
- 8) Nakon centrifugiranja gornja faza je izvučena širokim nastavkom, dodata joj je ista zapremina smeše fenol:hloroform (1:1) i centrifugirana je na 10800 rpm, 19 min, 18°C.
- 9) Nakon centrifugiranja izvučena je gornja faza, dodata joj je ista zapremina smeše hloroform:izoamilalkohol (24:1) i ponovljeno je centrifugiranje na 10800 rpm, 19 min, 18°C. Hloroform uklanja fenol, a izoamilalkohol smanjuje penu koja potiče od SDS-a.

- 10) Sledi precipitacija DNK: izvađenoj gornjoj fazi dodat je ledeni 96% etanol i 3M natrijum acetat pH 5,0 (2 zapremine 96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH i 1/10 zapremine 3M CH<sub>3</sub>COONa pH 5,0). DNK se pojavila u vidu končaste strukture.
- 11) DNK je staložena na dnu mikroeprevete, centrifugiranjem na 11900 rcf, 19 min, 4°C. Preostali sadržaj je odliven iz mikroeprevete, a talog DNK ispran u 70% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH i rastvoren u 200 µl TE pufera pH 8,0.
- 12) Uzorci DNK su čuvani na +4 °C.

### **3.2.2. Izolacija DNK iz ćelija pune krvi, na aparatu ABI PRISM™ 6100 Nucleic Acid PrepStation**

Izolacija DNK primenom kita DNA BloodPrep™, na aparatu ABI PRISM™ 6100, je brza metoda izolacije DNK iz male zapremine pune krvi (150 µl) uzete sa antikoagulansom (EDTA). Nakon ekstrakcije i prečišćavanja, DNK se eluira sa filter-membrane. Jedan postupak izolacije omogućava istovremeno izolovanje DNK iz 94 uzorka.

#### **Reagensi**

Proteinaza K (Sigma)

Digestioni pufer za proteinazu K: PK Digestion Buffer (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

Rastvor za prečišćavanje DNK: BloodPrep DNA Purification Solution (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

Rastvor za ispiranje DNK: BloodPrep DNA Wash Solution (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

Rastvor 1 za eluciju DNK: Elution Solution 1 (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

Rastvor 2 za eluciju DNK: Elution Solution 2 (DNA BloodPrep™, Applied Biosystems)

#### **Materijal**

Plastični nosač: ABI PRISM™ Splash Guard (Applied Biosystems)

Nosač sa filter-membranama za ekstrakciju i prečišćavanje DNK: DNA Purification Tray II (Applied Biosystems)



Mikroploča: 96-Well Reaction Plate with Barcode (Applied Biosystems)

### **Protokol**

- 1) U mikropruvetu zapremine 1,5 ml sipano je 15 µl rastvora proteinaze K (20mg/ml) i 85 µl digestionog pufera (PK Digestion Buffer).
- 2) Smeši je dodato 150 µl pune krvi i dobro je promešana provlačenjem kroz nastavak mikropipete.
- 3) Smeša je inkubirana na 58°C 10 min, kako bi se postigla degradacija proteina.
- 4) Zatim je dodato 500 µl rastvora za prečišćavanje DNK (BloodPrep DNA Purification Solution) i smeša je dobro promešana provlačenjem kroz nastavak mikropipete.

Na aparatu je podešen program za izolaciju DNK iz pune krvi, postavljeni su plastični nosač (ABI PRISM™ Splash Guard) i nosač sa filter-membranama za ekstrakciju i prečišćavanje DNK (DNA Purification Tray II) u poziciju „waste“ na aparatu, i izvedeni su sledeći postupci:

- 5) U bunare na nosaču sa filter-membranama (DNA Purification Tray II) sipano je po 650 µl smeše svakog pripremljenog uzorka i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 300 sec.
- 6) U svaki bunar dodato je po 650 µl rastvora za prečišćavanje DNK (BloodPrep DNA Purification Solution) i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 400 sec.
- 7) U svaki bunar dodato je po 650 µl rastvora za ispiranje DNK (BloodPrep DNA Wash Solution) i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 60 sec.
- 8) U svaki bunar dodato je po 600 µl rastvora za ispiranje DNK (BloodPrep DNA Wash Solution) i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 60 sec.
- 9) U svaki bunar dodato je po 300 µl rastvora za ispiranje DNK (BloodPrep DNA Wash Solution) i aktiviran je vakuum 80% u trajanju od 60 sec.
- 10) Aktiviran je „pre-elution“ vakuum 100% u trajanju od 120 sec.

Mikroploča (96-Well Reaction Plate with Barcode) je postavljena u poziciju „collection“ na aparatu i izvedeni su sledeći postupci:

- 11) U svaki bunar dodato je po 100 µl rastvora 1 za eluciju DNK (Elution Solution 1) i aktiviran je vakuum 60% u trajanju od 120 sec, čime je omogućena elucija najvećeg dela izolovane DNK sa membrane.

- 12) U svaki bunar dodato je po 100  $\mu$ l rastvora 2 za eluciju DNK (Elution Solution 2) i aktiviran je vakuum 60% u trajanju od 120 sec. Elution Solution 2 ima sastav koji obezbeđuje odgovarajući pH za čuvanje DNK u rastvoru.
- 13) Uzorci DNK su čuvani na +4 °C.

### **3.2.3. Merenje koncentracije i provera kvaliteta izolovane DNK**

Koncentracija i čistoća uzoraka DNK određene su spektrofotometrijski, na aparatu BioSpec-nano. Koncentracija uzoraka je izmerena i vrednosti su izražene u ng/ $\mu$ l. Merenjem apsorbancije DNK na 260nm i 280nm utvrđeno je da uzorci imaju zadovoljavajuću čistoću, pošto je odnos  $A_{260}/A_{280}$  bio u opsegu 1,8-2,0. Kao rezultat elektroforeze uzoraka DNK, koja traje 1h u električnom polju jačine 7,5 V/cm dužine gela na 1% agaroznom gelu obojenom sa 0,5  $\mu$ g/ml EtBr, dobijena je jedna jasna traka (>40 kb), što ukazuje na zadovoljavajući kvalitet izolovanih uzoraka DNK.

### **3.2.4. Genotipizacija polimorfizama DNK, V249I i T280M, u genu za CX3CR1 reakcijom amplifikacije DNK *in vitro* (PCR)**

Lančana reakcije polimeraze, *engl.* Polymerase Chain Reaction (*skr.* PCR), je metoda enzimske amplifikacije specifičnih fragmenata DNK *in vitro*. Reakcija zahteva vrlo male količine početnog materijala DNK a izvodi se pomoću enzima *Taq* polimeraze, termostabilne DNK polimeraze izolovane iz bakterije *Thermus Aquaticus*. Umnoženi fragmenti DNK mogu se dalje obrađivati upotrebom komercijalno dostupnih enzima restrikcionih endonukleaza koje prepoznaju specifične sekvence DNK, tzv. restrikciona mesta, i seku ih. Ukoliko se u okviru restrikcionog mesta nalazi polimorfno mesto, to omogućava razlikovanje genotipova polimorfizma u ciljnom genu metodom RFLP (*skr.* od *engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism).

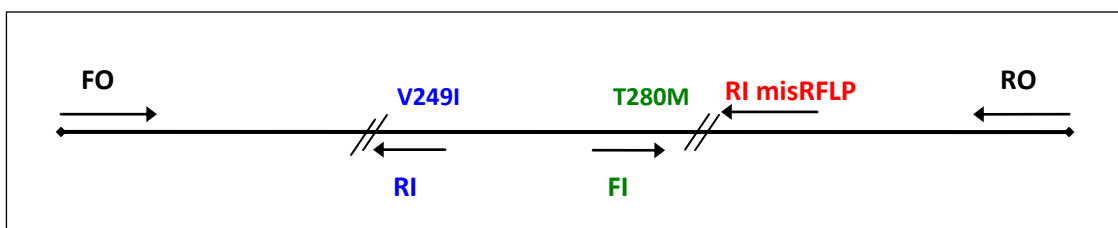
Dosadašnje metode za detekciju genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za receptor za fraktalkin, CX3CR1, bazirane su na klasičnoj PCR-RFLP analizi: fragment DNK koji sadrži oba polimorfna mesta amplifikuje se PCR reakcijom, a zatim se PCR produkt digestira korišćenjem dva različita restrikciona enzima- jedan

specifično seče sekvencu koja sadrži polimorfizam V249I, a drugi seče sekvencu koja sadrži polimorfizam T280M (Moatti i sar., 2001; McDermot i sar., 2001). U ovom radu, za detekciju polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1, primenjene su dve novodizajnirane metode: alel-specifična PCR metoda i metoda zasnovana na PIRA PCR-RFLP analizi.

### 3.2.5. Alel-specifična metoda PCR za detekciju polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1

Alel-specifična PCR metoda dizajnirana je tako da se na osnovu dobijenih PCR produkata može izvršiti brza detekcija češćih genotipova, VV u kodonu 249 i TT u kodonu 280, zastupljenih kod oko 50% individua u populaciji, i prisustvo ređih alela, I249 i M280.

Metoda je dizajnirana po uzoru na tetra-primer ARMS PCR metodu (Ye i sar., 2001) koja kombinuje princip ARMS (*engl.* Amplification Refractory Mutation System) PCR, sa PCR sa četiri amplimera (*engl.* tetra-primer PCR) (Newton i sar., 1989). Ova metoda omogućava genotipizaciju odmah nakon PCR reakcije, bez primene restrikcionih enzima ili sekvenciranja. Amplimeri su dizajnirani tako da 2 spoljašnja („outer“) obuhvataju oba polimorfna mesta ciljnog regiona DNK, a 2 unutrašnja („inner“) su alel-specifični koji, radi povećanja specifičnosti hibridizacije sa DNK matricom, poseduju: a) veštački uvedenu pogrešnu nukleotidnu bazu na poziciji -3 na 3' kraju, b) sekvencu dužu od 26 bp, i c) koncentraciju u reakcionoj smeši 8-10 puta veću u odnosu na koncentraciju spoljašnjih („outer“) amplimera (*slika M1, tabela M1*).



*Slika M1.* Shematski prikaz pozicije amplimera u okviru ciljne sekvence DNK, za alel-specifični PCR i PIRA PCR-RFLP. Spoljašnji amplimeri, FO i RO, ograničavaju sekvencu gena za CX3CR1 za alel-specifični PCR; unutrašnji amplimer RI

komplementaran je ređem alelu I249 polimorfizma V249I, a unutrašnji amplimer FI komplementaran je ređem alelu M280 polimorfizma T280M. Amplimer RI misRFLP uvodi *de novo* restrikciono mesto i sa amplimerom FO amplifikuje sekvencu gena za metodu PIRA PCR-RFLP.

*Tabela M1.* Sekvence oligonukleotidnih amplimera za alel-specifičnu PCR metodu.

Oznaka alela polimorfizma	Sekvenca amplimera	Oznaka amplimera
V249 i T280	5'GCAATGTGGAAACAAATTTTCTTGGCTT3'	FO Sens spoljašnji
	5'CACACAGGACAGCCAGGCATTTCCC3'	RO Antisens spoljašnji
M280	5'TCTGAGGCTGGCCCTCAGTGTGACTGATAT3'	FI Sens unutrašnji
I249	5'GCTTAAGCGTCTCCAGGAAAATCATCAT3'	RI Antisens unutrašnji

Istaknuti su nekomplementarni nukleotidi veštački uvedeni u sekvencu unutrašnjih amplimera, na poziciji -3 na 3' kraju, radi povećanja specifičnosti reakcije amplifikacije.

Sekvence amplimera (*tabela M1*) dizajnirane su korišćenjem programa koji su osmislili autori tetra-primer ARMS metode (Ye i sar., 2001; <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/publichtml/primer1.html>). Ovaj program kao rezultat prikazuje nekoliko parova amplimera za specifični region, pa je odgovarajući set dizajniranih amplimera odabran dodatnom analizom sekvence gena CX3CR1 i sekvence amplimera, korišćenjem dostupnog kompjuterskog programa: PerlPrimer, <http://perlprimer.sourceforge.net>. Za analizu sekvence transkripta gena CX3CR1

korišćena je sekvenca dostupna u bazi podataka NCBI-Entrez Nucleotide sa pristupnim brojem NM\_001337 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/68348719>). Optimizacija uslova za PCR reakciju urađena je podešavanjem finalnih koncentracija komponenti koje se koriste u reakciji i podešavanjem temperaturnih uslova (na osnovu temperature topljenja,  $T_m$ , amplimera).

### **Reagensi**

Nukleotidi (Fermentas):

2'-deoksiadenozin 5'-trifosfat

2'-deoksitimidin 5'-trifosfat

2'-deoksiguanozin 5'-trifosfat

2'-deoksicitidin 5'-trifosfat

Amplimeri, oligonukleotidi (MWG – Biotech AG)

10 × PCR pufer (Fermentas)

MgCl<sub>2</sub> (Fermentas)

*Taq* DNK-polimeraza (Fermentas)

### **Protokol za alel-specifičnu PCR metodu**

Amplimeri korišćeni za detekciju češćih homozigota (VV u kodonu 249, TT u kodonu 280) i ređih alela (I249 i M280) u genu CX3CR1, prikazani su u *tabeli M1*. Komponente alel-specifične PCR reakcije prikazane su u *tabeli M2*.

Tabela M2. Komponente alel-specifične reakcije PCR za detekciju polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1.

Komponente za PCR	Finalna koncentracija	Zapremina ( $\mu$ l)
Pufer za PCR (10x)	1x	2,0
MgCl <sub>2</sub>	1,5 mM	1,2
dNTP	0,2 mM	0,8
Amplimer FO	0,1 $\mu$ M (2 pmol)	0,2
Amplimer RO	0,1 $\mu$ M (2 pmol)	0,2
Amplimer FI	0,8 $\mu$ M (16 pmol)	1,6
Amplimer RI	0,8 $\mu$ M (16 pmol)	1,6
Genomska DNK	200 ng	0,8
<i>Taq</i> polimeraza	0,5 U	0,1
ddH <sub>2</sub> O	11,5 $\mu$ l	
Ukupno	20 $\mu$ l	

Temperaturni uslovi za alel-specifičnu PCR su bili sledeći: inicijalna denaturacija 95°C 5 min, sledi 30 ciklusa: denaturacije na 95°C 1 min, hibridizacije amplimera na 64°C 1 min i elongacije na 72°C 1 min, i finalna ekstenzija na 72°C 2 minuta.

### 3.2.6. Provera sinteze i veličine sintetisanih fragmenata DNK elektroforezom na agaroznom gelu

Za proveru sinteze i analizu sintetisanih fragmenata DNK, rađena je horizontalna elektroforeza na agaroznom gelu, koja omogućava razdvajanje sintetisanih fragmenata DNK. Razdvajanje se postiže na osnovu različite pokretljivosti fragmenata kroz podlogu u električnom polju, u zavisnosti od njihove dužine, primarne i sekundarne strukture.

#### Reagensi

Agarozna NA (LKB)

Etidijum bromid (Sigma)

Etilendiamin tetrasirćetna kiselina, dinatrijumova so, dihidrat (EDTA, Mr=372,24, Sigma)

Sirćetna kiselina (CH<sub>3</sub>COOH, min 99%, Mr=60,05, 1l=0,05kg, Zorka Pharma)

Tris (trihidroksimetil) aminometan (C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub>, Mr=121,14, Sigma)

### Protokol za elektroforezu DNK

Analiza produkata alel-specifične PCR reakcije urađena je na 1,8% (w/v) agaroznim gelovima, sa 0,5 µg/ml EtBr u 1x Tris-acetatnom puferu (TAE), u trajanju od 1h u električnom polju jačine 7,5 V/cm dužine gela.

Detektovan je jedan fragment DNK ukoliko je na oba polimorfna mesta prisutan češći alel (kombinacija genotipova VV/TT), odnosno dva ili tri fragmenta ukoliko je na bar jednom ili na oba polimorfna mesta prisutan ređi alel (I249 i/ili M280) (*tabela M3*).

*Tabela M3.* Veličina produkata alel-specifične reakcije PCR.

Sintetisani fragmenti	Amplimeri	Dužina fragmenata, bp
VV249 i TT280, dvostruki homozigot	FO-RO	378 bp
Alel I249	FO-RI	201 bp
Alel M280	FI-RO	140 bp

### 3.2.7. Metoda za determinaciju genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1, zasnovana na PIRA PCR-RFLP analizi

Primenom alel-specifične metode omogućena je brza detekcija VV i TT genotipova ispitivanih polimorfizama, kao i pregled prisustva ređih alela. Za uzorke kod kojih je detektovan barem jedan ređi alel (I249 i/ili M280), genotipovi oba polimorfizma utvrđuju se novodizajniranom PCR-RFLP metodom (*engl.* Restriction Fragment Length Polymorphism, odnosno polimorfizam dužine restriktionih fragmenata). Naime, u RFLP analizi genotipovi oba polimorfizma, V249I i T280M,

određeni su korišćenjem restriktionog enzima *TaiI* (*MaeII*) koji prepoznaje sekvencu 5'...ACGT↓...3'. Kodon 249 predstavlja prirodno polimorfno mesto sečenja kada je prisutan alel V249, tj. G nukleotid u restriktionoj sekvenci. *De novo* veštačko mesto sečenja u kodonu 280 uvedeno je primenom PIRA (*skr. od engl. Primer-Introduced Restriction Analysis*) PCR metode (Haliassos i sar., 1989) koja se bazira na dizajniranju modifikovanog amplimera sa pogrešno sparenom bazom na poziciji -2 na 3' kraju, neposredno uz polimorfno mesto. Pritom, veštačko mesto sečenja u kodonu 280 dobijeno je promenom sekvence DNK ACGG u sekvencu ACGT koja se nalazi u PCR produktu, tako da enzim *TaiI* prepoznaje mesto sečenja ukoliko je u prisutan alel T280 tj. C nukleotid u restriktionoj sekvenci. Na ovaj način, prisustvom prirodnog mesta sečenja u kodonu 249, uz uvođenje *de novo* veštačkog mesta sečenja za isti restriktioni enzim u kodonu 280, omogućena je istovremena genotipizacija oba polimorfizma pod istim uslovima reakcije (*slika M1, slika M2*).

Za dizajn amplimera za PIRA PCR korišćen je komercijalno dostupan kompjuterski program (Ke i sar., 2001; <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/publichtml/primer2.html>). Ovaj program kao rezultat prikazuje nekoliko setova amplimera, a odgovarajući set odabran je dodatnom analizom sekvence gena CX3CR1 i sekvence amplimera, primenom komercijalno dostupnog kompjuterskog programa PerlPrimer (<http://perlprimer.sourceforge.net>). Pri tome, sense amplimer uzet je iz prethodno definisanog seta (sense spoljašnji, FO), a novodizajnirani je antisens amplimer, RI misRFLP, koji ima veštački ubačenu bazu nekomplementarnu sekvenci DNK i čime se formira veštačko restriktiono mesto za enzim *TaiI* (*MaeII*) u PCR produktu (*tabela M4*). Definisane optimalnih uslova za PIRA PCR reakciju vršeno je podešavanjem finalnih koncentracija komponenti koje se koriste u reakciji i podešavanjem temperaturnih uslova (na osnovu temperature topljenja,  $T_m$ , amplimera).

### 3.2.7.1. Protokol za PIRA PCR

Oligonukleotidni amplimeri korišćeni za detekciju genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 metodom PIRA PCR-RFLP, prikazani su u *tabeli M4*. Komponente PIRA PCR reakcije prikazane su u *tabeli M5*. Za svaku PCR reakciju korišćeni su prethodno navedeni reagensi.



Tabela M4. Sekvence amplimera korišćenih za detekciju polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 metodom PIRA PCR-RFLP.

Oznaka amplimera	Sekvenca amplimera
FO	5'GCAATGTGGAAACAAATTTTCTTGGCTT3'
RI misRFLP	5'TCAGGCAACAATGGCTAAATGCAAAC3'

Istaknuta je pogrešno sparena baza u antisens amplimeru, radi uvođenja *de novo* restrikcionog mesta u kodonu 280.

Tabela M5. Komponente PIRA PCR za detekciju polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1.

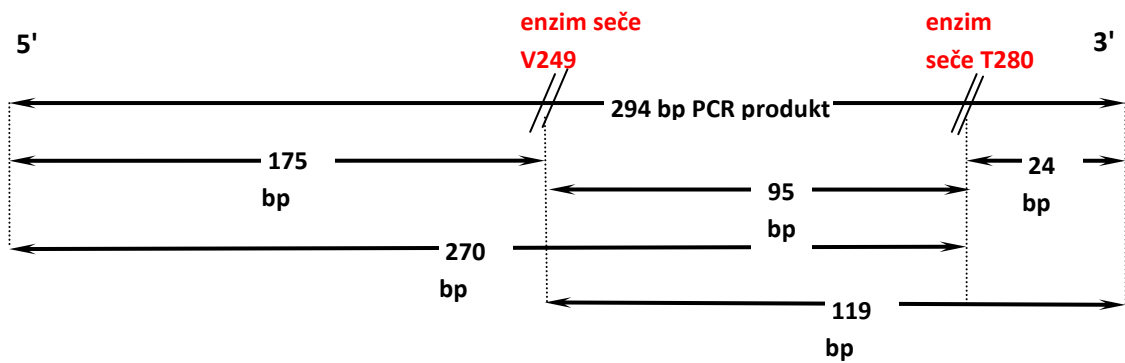
Komponente za PCR	Finalna koncentracija	Zapremina (µl)
Pufer za PCR (10x)	1x	2,5
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	2,0
dNTP	0,2 mM	1,0
Amplimer FO	0,5 µM (12,5 pmol)	1,25
Amplimer RI misRFLP	0,5 µM (12,5 pmol)	1,25
Genomska DNK	200 ng	0,8
<i>Taq</i> polimeraza	0,5 U	0,1
ddH <sub>2</sub> O	16,1 µl	
ukupno	25 µl	

Temperaturni uslovi za PIRA PCR su bili sledeći: inicijalna denaturacija 95°C 5 min, sledi 30 ciklusa denaturacije na 95°C 1 min, hibridizacije amplimera na 58°C 1 min i elongacije na 72°C 1 min, i finalna ekstenzija na 72°C 2 minuta.

### 3.2.7.2. Restrikciona analiza PIRA PCR produkta (RFLP analiza)

Za određivanje genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu CX3CR1 korišćen je restrikcioni enzim *Tai*I (*Mae*II), koji prepoznaje sekvencu 5'...ACGT↓...3'. Prikaz dužine restrikcionih fragmenata nakon digestije PIRA PCR produkta enzimom

TaiI (MaeII), dat je na *slici M2*. Dužine restrikcionih fragmenata i odgovarajući genotipovi polimorfizama V249I i T280M prikazani su u *tabeli M6*.



*Slika M2*. Shematski prikaz dužine restrikcionih fragmenata nakon digestije produkta PIRA PCR reakcije enzimom TaiI (MaeII).

*Tabela M6*. Dužine restrikcionih fragmenata DNK i njima odgovarajuće kombinacije genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1.

Genotipovi V249I i T280M	Dužine restrikcionih fragmenata, bp
II / MM (PCR produkt)	294
II / TM	294 + 270
II / TT	270
VV / TT	175 + 95
VV / TM	175 + 119 + 95
VV / MM	175 + 119
VI / MM	294 + 175 + 119
VI / TT	270 + 175 + 95
VI / TM	294 + 270 + 175 + 119 + 95

## **Reagensi**

Restrikciona endonukleaza TaiI (MaeII) (Fermentas)

10x crveni digestioni pufer (Fermentas)

## **Protokol za digestiju restrikcijom endonukleazom**

Inkubirano je 10  $\mu$ L PCR produkta sa 5U restrikcione endonukleaze TaiI (MaeII) i 1  $\mu$ L crvenog digestionog pufera, na 65°C preko noći.

### **3.2.8. Analiza digestiranih fragmenata DNK elektroforezom na poliakrilamidnom (PAA) gelu**

Provera sinteze PIRA PCR produkta rađena je elektroforezom na 1,8% agaroznom gelu. Produkt PCR reakcije je fragment dužine 294 baznih parova.

Za razdvajanje digestiranih fragmenata DNK korišćena je vertikalna elektroforeza na 8% poliakrilamidnom (PAA) gelu, čija je koncentracija podešena prema očekivanoj dužini fragmenata.

## **Reagensi za pripremu i bojenje poliakrilamidnog (PAA) gela**

Akrlamid (Sigma)

Amonijum persulfat (Serva)

Azotna kiselina (Kemika)

Etanol (Zorka Pharma)

Formaldehid (Sigma)

Natrijum karbonat, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (Sigma)

N,N'-metilenbisakrilamid (Sigma)

N,N,N',N'-tetrametiletildiamin (TEMED; Bio-Rad)

Rezin IR-120, BDH

Srebro nitrat, AgNO<sub>3</sub> (Sigma)

Boratna kiselina, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> (USB Corporation, SAD)

Etilendiamin tetrasirćetna kiselina, dinatrijumova so, dihidrat (EDTA, Mr=372,24, Sigma)

Sirćetna kiselina ( $\text{CH}_3\text{COOH}$ , min 99%,  $M_r=60,05$ ,  $n=0,05\text{kg}$ , Zorka Pharma)

Tris (trihidroksimetil) aminometan ( $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$ ,  $M_r=121,14$ , Sigma)

### **Protokol za elektroforezu DNK na PAA gelu**

Za pripremu 8% nedenaturišućeg poliakrilamidnog gela potrebne komponente su: štok akrilamida 40% (akrilamid i bisakrilamid u odnosu 19:1), 10x Tris-boradni pufer (TBE), 10% amonijum persulfat i TEMED.

Vertikalna elektroforeza za razdvajanje fragmenata DNK trajala je 1h 15min, u električnom polju jačine 5V/cm. Po završetku elektroforeze fragmenti su vizuelizovani bojenjem gela srebronitratom.

#### **Postupak bojenja PAA gela:**

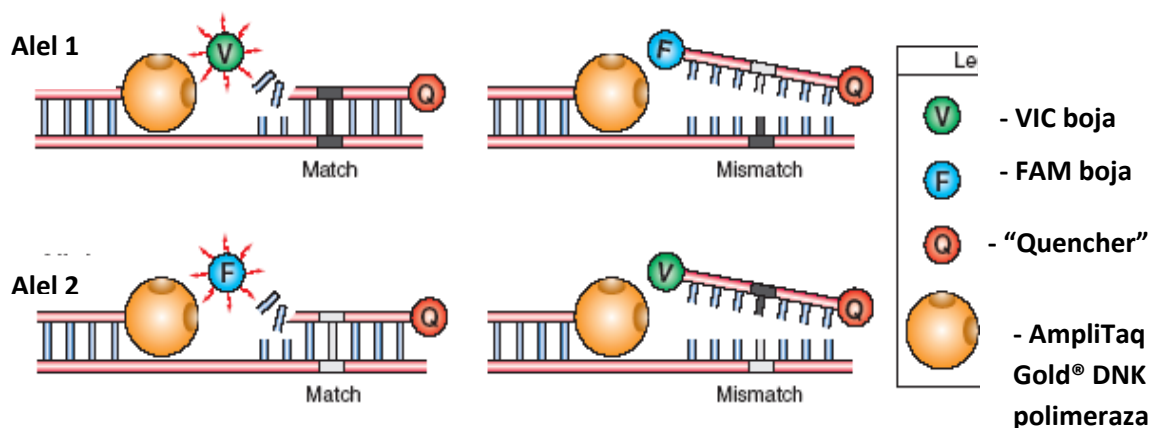
- 1) gel je potopljen u 10% etanol, 10 min
- 2) gel je potopljen u 1% rastvor azotne kiseline, 3 min
- 3) gel je ispran destilovanom vodom i ostavljen u rastvoru 12 mmol/l srebronitrata, 15-30 min
- 4) gel je ispran destilovanom vodom dva puta
- 5) gel je potopljen u rastvor 0,28 mol/l natrijum karbonata sa 0,018% formaldehida i ostavljen da stoji do pojave traka
- 6) nakon pojavljivanja traka reakcija je prekinuta dodavanjem 10% sirćetne kiseline
- 7) gel je ispran destilovanom vodom.

Za snimanje i analizu gelova korišćen je sistem GDS8000 (UVP Inc, Upland, SAD).

### **3.2.9. Genotipizacija polimorfizama DNK, I123T i A181V, u genu za CXCL16 lančanom reakcijom polimeraze (PCR) uz primenu TaqMan® eseja za diskriminaciju alela**

Applied Biosystems 7500 Real-time PCR sistem omogućava kvantitativnu detekciju sekvenci nukleinskih kiselina lančanom reakcijom polimeraze u realnom vremenu (Real-time PCR), i kvalitativnu detekciju sekvenci nukleinskih kiselina u tzv.

“end-point” analizi, tj. samo na osnovu podataka prikupljenih na kraju PCR reakcije. Metoda za diskriminaciju alela je tip “end-point” analize za detekciju različitih alelskih varijanti ispitivane sekvence nukleinske kiseline. U ovom radu, za detekciju polimorfizama DNK, I123T i A181V, u genu za CXCL16 korišćeni su komercijalni *TaqMan*® eseji za diskriminaciju alela polimorfizma zamene pojedinačnog nukleotida (SNP). Svaki esej čini par specifičnih amplimera koji okružuju polimorfno mesto i par *TaqMan*® alel-specifičnih proba koje imaju identičnu sekvencu, osim razlike na mestu ispitivanog SNP: jedna proba sadrži nukleotid komplementaran češćem alelu, a druga proba sadrži nukleotid komplementaran ređem alelu. Takođe, svaka *TaqMan*® alel-specifična proba je obeležena specifičnom fluorescentnom bojom na 5' kraju. Dakle, hibridizacija odgovarajuće alel-specifične probe sa sekvencom DNK koja sadrži ispitivani SNP, omogućava detekciju određenog alela (*slika M3*). Tom prilikom, na osnovu detekcije intenziteta signala koji potiče samo od jedne ili samo od druge fluorescentne boje određuju se homozigoti za češći ili ređi alel, dok detekcija oba fluorescentna signala podjednakog intenziteta ukazuje da je prisutan heterozigotni genotip.



*Slika M3.* Hibridizacija alel-specifičnih proba *TaqMan*® eseja za diskriminaciju alela, sa ciljnom sekvencom DNK koja sadrži ispitivani SNP. Proba specifična za alel 1 obeležena je bojom VIC (V) na 5' kraju, a proba specifična za alel 2 obeležena je bojom FAM (F) na 5' kraju. Prilikom amplifikacije DNK, kada *Taq* polimeraza ugrađuje komplementarne nukleotide u delu sekvence koja je hibridizovala sa specifičnom probom, proba se degradira, oslobađa se boja koja emituje fluorescentni signal i tako se detektuje prisustvo odgovarajućeg alela.

## Reagensi

- Komercijalni setovi amplimera i alel-specifičnih proba za genotipizaciju: *TaqMan*® SNP Genotyping Assay C\_\_8718197\_20 (40x) i *TaqMan*® SNP Genotyping Assay C\_\_15885167\_10 (40x) (Applied Biosystems)
- Smeša komponenata reakcije: *TaqMan*® Genotyping Master Mix (2x) (AmpliTaQ Gold® DNK polimeraza, dNTPs bez dUTP, pasivna referenca Rox) (Applied Biosystems)
- Voda bez nukleaza: Nuclease-Free Water (Ambion)

## Protokol

Determinacija genotipova polimorfizma DNK I123T (rs1050998) u genu za CXCL16 urađena je primenom *TaqMan*® komercijalnog eseja za genotipizaciju, C\_\_8718197\_20, koji se sastoji od para amplimera i para alel-specifičnih proba dizajniranih u okviru ciljne (kontekst) sekvence DNK :

AGATGCCCCCTCTGAGGCCTGAGAA[A/G]TTGGGGGGCTGGTAGGAAGTAAATG  
.  
[VIC/FAM]

Proba specifična za alel I123 (nukleotid A) obeležena je na 5' kraju fluorescentnom bojom VIC, a proba specifična za alel T123 (nukleotid G) bojom FAM.

Determinacija genotipova polimorfizma DNK A181V (rs2277680) u genu za CXCL16 urađena je korišćenjem *TaqMan*® komercijalnog eseja za genotipizaciju, C\_\_15885167\_10, koji se sastoji od para amplimera i para alel-specifičnih proba dizajniranih u okviru ciljne (kontekst) sekvence DNK :

CTGGTTCTCCCCAGCCTCAGGCCCA[A/G]CTGCCAGACTGTGGCCCGCAGTGTG.  
[VIC/FAM]

Proba specifična za alel A181 (nukleotid G) obeležena je na 5' kraju fluorescentnom bojom FAM, a proba specifična za alel V181 (nukleotid A) bojom VIC.

Komponente PCR reakcije prikazane su u *tabeli M7*. U svakoj reakciji, finalne koncentracije *TaqMan* PCR smeše (*TaqMan*® Genotyping Master Mix) i *TaqMan* eseja (*TaqMan*® SNP Genotyping Assay C\_\_8718197\_20 ili C\_\_15885167\_10) bile su 1x. Amplifikacija je izvedena na aparatu 7500 Real-time PCR sistem uz primenu kompjuterskog programa SDS Software v1.4.0., a temperaturni profil reakcije prikazan je u *tabeli M8*.

Tabela M7. Komponente PCR reakcije za genotipizaciju svakog pojedinačnog polimorfizma DNK, I123T ili A181V, u genu za CXCL16.

Komponente za PCR	Zapremina, $\mu$ l
TaqMan® Genotyping Master Mix (2x)	6,25 (1x)
TaqMan® SNP Genotyping Assay (20x) C__8718197_20 ili C__15885167_10	0,625 (1x)
razblazenje gDNK	5,625 (125 ng DNK)
<b>Ukupno</b>	<b>12,5 <math>\mu</math>l</b>

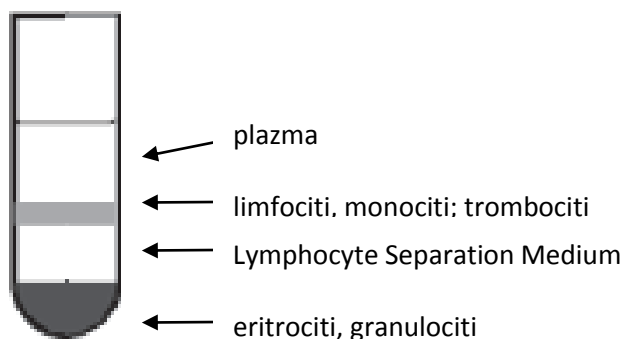
Tabela M8. Temperaturni profil PCR reakcija za genotipizaciju polimorfizama DNK, I123T i A181V, u genu za CXCL16.

Broj ciklusa	Faza reakcije	Temperatura (°C)	Vreme trajanja faze (min)
1	“Pre-read run” (determiniše početni nivo fluorescence koja potiče od komponenata reakcije pre amplifikacije)	60	1
1	Inicijalna denaturacija	95	10
40	Denaturacija + Hibridizacija amplimera i proba, i elongacija	95 60	0,25 1
1	“Post-read run” (nakon amplifikacije poništava početni nivo fluorescence izmerene u toku “Pre-read run”, i omogućava determinaciju alela)	60	1

### 3.2.10. Izdvajanje mononuklearnih leukocita iz pune periferne krvi

Za analizu genske ekspresije u ovom radu, od svih ispitanika uzimano je po 3 ml krvi iz kubitalne vene, i puna krv sa antikoagulansom EDTA odmah je iskorišćena za izdvajanje mononuklearnih ćelija i izolaciju ukupne RNK iz njih.

Princip procedure razdvajanja ćelija krvi zasniva se na primeni medijuma za separaciju limfocita (Lymphocyte Separation Medium), čija je osnovna komponenta Ficoll. Ficoll je polisaharidni agens (polimer sukroze) za agregaciju eritrocita. Njegova mala viskoznost čini ga pogodnim za izdvajanje limfocita iz krvi, pri malim brzinama centrifugiranja. Diferencijalna migracija ćelija krvi u toku centrifugiranja u medijumu za separaciju limfocita, rezultuje formiranjem slojeva koji sadrže različite tipove ćelija, zavisno od njihove gustine (*slika M4*).



*Slika M4.* Diferencijalna migracija ćelija krvi u toku centrifugiranja u medijumu za separaciju limfocita (Lymphocyte Separation Medium).

Zbog relativno male gustine (<1,077 g/ml), limfociti i monociti se nalaze u interfazi između plazme i reagensa za separaciju, dok se na dnu epruvete nalazi sloj potpuno sedimentisanih eritrocita sa granulocitima (*slika M4*). Ovom procedurom dobija se oko 60% od ukupnog broja mononukleara iz originalnog uzorka krvi, tj. oko  $1,5 \times 10^6$  po 1 ml krvi.

#### Reagensi

Lymphocyte Separation Medium, LSM 1077 (PAA)

Fiziološki rastvor (0,9% NaCl) (Hemofarm)



## **Protokol**

- 1) Uzorak od 3 ml sveže krvi sa antikoagulansom (EDTA) razblažen je dodavanjem iste zapremine (3 ml) 0,9% NaCl.
- 2) U epruvetu (prečnika 12-15 mm) je prvo sipano 3 ml Lymphocyte Separation Medium-a (LSM), pa je zatim pažljivo dodato 6 ml razblažene krvi, tako da nije došlo do mešanja krvi i LSM.
- 3) Uzorak je centrifugiran na 800 x g, 20 min, na sobnoj temperaturi.
- 4) Nakon centrifugiranja, mononuklearne ćelije su se nalazile u interfazi (*slika M4*). Interfaza je izdvojena Pasterovom pipetom i preneti je u sterilnu epruvetu.
- 5) Izdvojena frakcija mononukleara je isprana sa 6 ml 0,9% NaCl i ćelije su precipitirane centrifugiranjem na 250 x g, 10 min.

### **3.2.11. Izolacija ukupne RNK iz mononuklearnih leukocita krvi primenom reagensa TRI Reagent Solution**

Nakon izdvajanja limfocita i monocita iz uzoraka od 3 ml krvi, iz precipitata ovih ćelija izolovana je ukupna RNK korišćenjem reagensa TRI Reagent Solution, prema protokolu proizvođača (Ambion). Ovaj reagens je industrijski pripremljena smeša koja omogućava primenu modifikovane metode izolacije RNK po autorima Chomczynski i Sacchi (1987), u jednom koraku, te je pogodan za brzu izolaciju ukupne ćelijske RNK uz dobijanje zadovoljavajućeg kvantiteta i kvaliteta izolovane RNK.

#### **Reagensi**

TRI Reagent Solution (Ambion)

Hloroform (CHCl<sub>3</sub>, Mr=119,38, 1l=1,47 kg, Kemika)

Izopropanol (C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O, Mr=60,10, 1l=0,78kg, LachNer)

Etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, min 95%, Mr=46,07, Zorka Pharma)

Voda tretirana DEPC-om

## **Protokol**

- 1) Precipitat mononuklearnih ćelija krvi je liziran dodavanjem 1 ml TRI Reagent Solution-a (dovoljno za lizu  $5-10 \times 10^6$  ćelija) i sadržaj je sipan u mikroepruvetu 1,5 ml.
- 2) Uzorak je inkubiran 5 min na sobnoj temperaturi, kako bi se postigla potpuna liza ćelija.
- 3) Uzorku je dodato 200  $\mu$ l hloroforma (na 1ml TRI Reagent Solution), dobro je promućkan 15 sec i inkubiran 15 min na sobnoj temperaturi.
- 4) Uzorak je centrifugiran na  $12\ 000 \times g$ , 15 min,  $4^\circ\text{C}$  i zatim je vodena faza, koja sadrži RNK, prenetu u novu mikroepruvetu.
- 5) Vodenoj fazi je dodato 500  $\mu$ l izopropanola (na 1 ml TRI Reagent Solution), uzorak je vorteksovan umerenom brzinom 10 sec i inkubiran na sobnoj temperaturi 10 min, kako bi RNK precipitirala.
- 6) Uzorak je centrifugiran na  $12\ 000 \times g$ , 8 min,  $4^\circ\text{C}$  i zatim je odbačen supernatant: na dnu mikroepruvete je zapažen beli talog RNK.
- 7) Talog RNK je ispran dodavanjem 1 ml 75% etanola (na 1 ml TRI Reagent Solution-a) pripremljenog sa vodom tretiranom DEPC-om.
- 8) Uzorak je centrifugiran na  $7\ 500 \times g$ , 5 min,  $4^\circ\text{C}$ .
- 9) Uklonjen je sav etanol, pomoću mikropipete sa tankim nastavkom.
- 10) Talog RNK je osušen na vazduhu, 5-10 min.
- 11) Talog RNK je rastvoren u 20  $\mu$ l vode tretirane DEPC-om, provlačenjem sadržaja nekoliko puta kroz nastavak mikropipete i inkubacijom 10 min na  $55-60^\circ\text{C}$ .
- 12) Uzorci izolovane RNK su čuvani na  $-70^\circ\text{C}$ .

### **3.2.12. Merenje koncentracije i provera kvaliteta izolovane RNK**

Koncentracija i čistoća uzoraka ukupne ćelijske RNK određene su spektrofotometrijski, na aparatu BioSpec-nano. Koncentracija uzoraka RNK je izmerena i vrednosti su izražene u ng/ $\mu$ l. Merenje apsorbancije RNK na 260nm i 280nm korišćeno je za utvrđivanje čistoće uzoraka. Čistoća uzoraka RNK je bila zadovoljavajuća, jer su imali odnos  $A_{260}/A_{280}$  u opsegu 1,8-2,2. Kvalitet i integritet ukupne ćelijske RNK provereni su elektroforezom uzoraka na čipu, primenom kita

RNA 6000 Nano Kit (Agilent) na aparatu 2100 Bioanalyzer (Agilent). Kvalitet testiranih uzoraka je bio zadovoljavajući, pošto su na elektroforetogramima bile jasno uočljive frakcije ukupne ćelijske RNK a vrednosti parametra RIN (*skr. od engl. RNA Integrity Number*), koji je pokazatelj integriteta RNK, iznosile prosečno 8-9 u ukupnom opsegu vrednosti od 0 do 10.

### 3.2.13. Obrada uzoraka RNK dezoksiribonukleazom I (DNKazaI)

Uzorci izolovane RNK su obradjeni dezoksiribonukleazom I pre reakcije reverzne transkripcije, kako bi se uklonili jednolančani i dvolančani molekuli DNK. DNKazaI je endonukleaza koja se aktivira u prisustvu jona  $Mg^{++}$  i, sečenjem lanaca, digestira jednolančane i dvolančane molekule DNK.

#### Reagensi

DNaseI (DNKaza I) (Fermentas)

10x DNaseI reakcioni pufer sa  $MgCl_2$  (100mM Tris-HCl (pH 7.5 na 25 °C), 25mM  $MgCl_2$ , 1mM  $CaCl_2$ ) (Fermentas)

25mM EDTA (Fermentas)

Voda tretirana DEPC-om

#### Protokol

1) Za svaki uzorak RNK napravljena je smeša prikazana u tabeli M9, na ledu. U svakoj seriji uzoraka bila je prisutna negativna kontrola koja sadrži sve komponente iz *tabele M9* osim RNK umesto koje je dodata odgovarajuća zapremina vode tretirane DEPC-om.

*Tabela M9.* Komponente reakcione smeše za tretman RNK enzimom DNKaza I.

<b>10 x DNaseI Buffer</b>	1 $\mu$ l
<b>RNK</b>	0,5 $\mu$ g *
<b>DNaseI (1U/<math>\mu</math>l)</b>	1 $\mu$ l (1U)
<b>Voda tretirana DEPC-om</b>	do ukupne zapremine smeše 10 $\mu$ l

\* Zapremina uzorka RNK koja sadrži 0,5 µg izračunava se kao: 0,5 µg / [RNK] (µg/µl).

- 2) Smeša je inkubirana na 37°C, 30 min (optimalni uslovi za digestiju DNK).
- 3) Smeši na ledu je dodato 1 µL 25mM EDTA, u cilju hemijske inaktivacije DNKazeI.
- 4) Smeša je inkubirana na 65°C, 10 min, radi termičke inaktivacije DNKazeI.
- 5) Smeša je ostavljena na ledu 1 min.
- 6) Smeša je kratko centrifugirana i dalje korišćena za reverznu transkripciju.

### **3.2.14. Reverzna transkripcija (RT) uzoraka RNK, nakon tretmana DNKazomI**

Reverzna transkripcija (RT) je reakcija katalizovana enzimom reverznom transkriptazom koja sintetiše molekule jednolančane DNK (cDNK), koristeći molekul RNK kao matricu. Poput DNK polimeraza, i ovaj enzim sintetiše lanac nukleinske kiseline (cDNK) dodavanjem nukleotida na oligonukleotidni amplimer koji je komplementaran lancu nukleinske kiseline molekula matrice (RNK) sa kojim hibridizuje. Za RT u ovom radu korišćen je oligo-dT amplimer, zato što omogućava selektivnu reverznu transkripciju poli(A)<sup>+</sup> frakcije RNK, koja je od interesa za dalju kvantitativnu analizu genske ekspresije Real-time PCR metodologijom.

#### **Reagensi**

Oligo(dT)<sub>18</sub> amplimer (0,5 µg/µl) (Fermentas)

dNTP mix (10 mM) (Fermentas)

RiboLock (40U/µl) (Fermentas)

5x RT Buffer (Fermentas)

RevertAid Premium Reverse Transcriptase (200 U/µl) (Fermentas)

Voda tretirana DEPC-om

#### **Protokol**

Reakciona smeša je pripremljena na ledu, a njene komponente su prikazane u *tabeli M10*.

*Tabela M10.* Komponente smeše za reakciju reverzne transkripcije.

<b>Komponente smeše za reverznu transkripciju</b>	<b>Zapremina</b>
Smeša posle tretmana 0,5 µg totalne RNK enzimom DNKaza I (prikazana u protokolu za obradu RNK dezoksiribonukleazom I)	11 µl
Oligo(dT) <sub>18</sub> amplimer (0,5 µg/µl)	1 µl (100 pmol)
Reakcioni pufer, 5x RT buffer	4 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl (0,5 mM)
Ribonukleazni inhibitor, RiboLock (40U/µl)	0,5 µl (20U)
Reverzna transkriptaza, RevertAid Premium RT (200 U/µl)	1 µl (200U)
DEPC-om tretirana voda	1,5 µl
<b>Ukupno</b>	<b>20 µl</b>

- 1) Smeši sa RNK (11 µl uzorka iz tretmana DNKazomI) dodat je amplimer oligo(dT)<sub>18</sub>, promešana je i kratko centrifugirana.
- 2) Smeša je inkubirana na 70°C 5 min (pogodno za RNK koje su GC-bogate ili sa sekundarnom strukturom), pa stavljena na led.
- 3) Smeši su dodate ostale komponente reakcije: 5x reakcioni pufer, 10mM dNTPs, ribonukleazni inhibitor, DEPC-om tretirana voda i reverzna transkriptaza. Sve zajedno je promešano i kratko centrifugirano.
- 4) Smeša je inkubirana na 50°C 30 min (optimalni uslovi za reakciju reverzne transkripcije).
- 5) Reakcija je zaustavljena zagrevanjem smeše na 85°C 5 min, pa zatim hlađenjem na ledu.
- 6) Dobijeni produkt cDNK je odmah korišćen za Real-time PCR, ili je čuvan na -20°C ili dugotrajno na -70°C, pre analize.

### **3.2.15. Određivanje nivoa relativne ekspresije gena za hemokine CX3CL1 i CXCL16 i njihove receptore, CX3CR1 i CXCR6, metodom PCR u realnom vremenu (Real-time PCR)**

PCR u realnom vremenu (*engl.* Real-time PCR) je kvantitativna PCR metoda koja omogućava najpreciznije određivanje količine prisutnih cDNK dobijenih reverznom transkripcijom odgovarajućih iRNK. Precizna kvantifikacija je rezultat praćenja toka PCR reakcije, pri čemu se količina ciljne cDNK određuje na osnovu vremenskog trenutka detektovanja njene amplifikacije, a ne na osnovu količine produkta na kraju PCR reakcije. Vremenski trenutak detektovanja amplifikacije ciljne sekvence odgovara ulasku u eksponencijalnu fazu reakcije PCR, tj. onom broju ciklusa na kome se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag (*engl.* treshold) i koji se označava kao Ct (*engl.* treshold Cycle). Relativna kvantifikacija genske ekspresije definiše razliku nivoa ekspresije ciljne iRNK (cDNK) u ispitivanom uzorku u odnosu na odgovarajući kontrolni uzorak. Pritom se nivoi ekspresije ciljnog gena u ispitivanom uzorku u odnosu na kontrolni normalizuju na izmerene nivoe odgovarajućeg stabilno eksprimiranog kontrolnog gena (endogene kontrole) u njima.

U ovom radu, za određivanje nivoa relativne ekspresije gena za hemokine i njihove receptore korišćeni su odgovarajući *TaqMan*® komercijalni eseji za gensku ekspresiju, čije su karakteristike prikazane u *tabeli M11*. *TaqMan*® eseji za gensku ekspresiju bazirani su na 5' nukleaznoj hemiji koja koristi *TaqMan*® MGB probe. Svaki esej čine set amplimera i specifična *TaqMan*® MGB proba obeležena fluorescentnom bojom na 5' kraju i dizajnirana tako da se za ciljnu sekvencu vezuje između mesta vezivanja dva specifična amplimera. Na taj način se postiže maksimalna specifičnost detektovanja amplifikacije sekvence od interesa. Merenjem povećanja fluorescence nakon dostizanja ciklusa na kome se detektuje fluorescentni signal koji prelazi prag (Ct), procenjuje se količina sintetisanog amplikona. Dizajn i validacija eseja urađeni su od strane proizvođača (Applied Biosystems).

#### **Reagensi**

- Komercijalni eseji za gensku ekspresiju: *TaqMan*® Gene Expression Assay (20x) (Applied Biosystems) (*Tabela M11*)

- Smeša komponenata reakcije: *TaqMan*® Gene Expression Master Mix (2x) (*AmpliTag* Gold® DNK polimeraza, uracil-DNK glikozilaza, dNTPs sa dUTP, pasivna referenca Rox) (Applied Biosystems)

- Voda bez nukleaza: Nuclease-Free Water (Ambion)

*Tabela M11.* Karakteristike eseja korišćenih za detekciju i kvantifikaciju transkripata ciljnih gena.

Oznaka gena	Oznaka eseja	NCBI pristupni br. sekvence transkripta	Granica egzona (pozicija probe)	Dužina amplikona, bp
CX3CL1	Hs00171086_m1	NM_002996.3	1-2	72
CXCL16	Hs01055223_g1	NM_001100812.1 NM_022059.2	2-3	62
CX3CR1	Hs01922583_s1	NM_001171174.1 NM_001171172.1 NM_001171171.1 NM_001337.3	2-2	162
CXCR6	Hs01890898_s1	NM_006564.1	2-2	152
GAPDH	Hs99999905_m1	NM_002046.3	3-3	122
PPIA (CYCLA)	Hs99999904_m1	NM_021130.3	4-4	98
18S rRNK	Hs99999901_s1	X03205.1	-	187

Oznaka eseja:

Hs: vrsta za koju je dizajniran esej (Hs - Homo sapiens),

Broj od 8 cifara: identifikacija eseja,

\_m1: esej koji pokriva granicu između dva egzona, visokospecifičan za ciljnu iRNK

\_g1: esej kojim se pored ciljne iRNK mogu detektovati i sekvence genomske DNK (ukoliko nije urađen tretman DNKazom)

\_s1: esej koji se nalazi u okviru jednog egzona- pored ciljne iRNK mogu se detektovati i sekvence genomske DNK (ukoliko nije urađen tretman DNKazom)

## Protokol

Za svaki od analiziranih gena za hemokine, njihove receptore i endogene kontrole, komponente za Real-time PCR prikazane su u *tabeli M12*. U svakoj reakciji, finalne koncentracije *TaqMan* PCR smeše (*TaqMan*® Gene Expression Master Mix) i odgovarajućeg *TaqMan* eseja (*TaqMan*® Gene Expression Assay) bile su 1x. Sinteza amplikona je definisana ciklusom u kome je prvi put detektovan fluorescentni signal koji prelazi prag (Ct). Svaki uzorak analiziran je u duplikatu. Temperaturni uslovi Real-time PCR za svaki analizirani gen prikazani su u *tabeli M13*.

Kao endogene kontrole korišćeni su geni za: gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenazu (GAPDH), peptidilprolil izomerazu A/ ciklofilin A (PPIA/CYCLA) i 18S ribozomalnu RNK (18S rRNK). Od tri analizirane, za normalizaciju rezultata relativne ekspresije ciljnih gena iskorišćena je ona endogena kontrola koja je najstabilnije eksprimirana unutar i između ispitivanih ciljnih grupa kontrola i pacijenata.

*Tabela M12*. Komponente Real-time PCR za relativnu kvantifikaciju transkripata ciljnih gena.

Komponente za Real-time PCR	Zapremina, µl
<i>TaqMan</i> ® Gene Expression Master Mix (2x)	6,25 (1x)
<i>TaqMan</i> ® Gene Expression Assay (20x)	0,625 (1x)
Razblaženje cDNK (produkt RT razblažen u odnosu 1:2,5, za reakciju RT iz 0,5 µg RNK)	2,5
Voda bez nukleaza (Nuclease-Free Water)	3,125
<b>Ukupno</b>	<b>12,5 µl</b>



Tabela M13. Temperaturni uslovi Real-time PCR za relativnu kvantifikaciju transkripata ciljnih gena.

Broj ciklusa	Faza reakcije	Temperatura (°C)	Vreme trajanja faze (min)
1	UNG aktivacija	50	2
1	Inicijalna denaturacija	95	10
40	Denaturacija + Hibridizacija amplimera i probe, i elongacija	95 60	0,25 1

### 3.2.16. Statistička obrada podataka

Frekvencije genotipova i alela određene su metodom prebrojavanja (*engl.* gene counting method). Za ispitivanje slaganja distribucija dobijenih frekvencija genotipova u populaciji, sa očekivanim vrednostima po Hardy-Weinberg (HW) ravnoteži, primenjen je  $\chi^2$  test. Analiza razlike u distribuciji genotipova i alela između posmatranih grupa urađena je Pearsonovim  $\chi^2$  testom. Normalna distribucija vrednosti kontinualnih varijabli testirana je Kolmogorov-Smirnovim testom. Relacija između vrednosti kategorijskih i kontinualnih varijabli testirana je analizom varijanse (ANOVA) ukoliko su vrednosti kontinualnih varijabli bile u normalnoj raspodeli, ili primenom Kruskal-Wallis neparametrijske ANOVA-e ukoliko vrednosti kontinualnih varijabli nisu bile u normalnoj raspodeli. Za utvrđivanje razlike srednjih vrednosti kontinualnih varijabli koje su bile u normalnoj raspodeli korišćen je Studentov t-test za nezavisne uzorke, ili neparametrijski Mann-Whitney U test za kontinualne varijable čije vrednosti nisu bile u normalnoj raspodeli. Vrednosti fenotipskih varijabli predstavljene su kao brojevi i procenti, ili kao srednja vrednost sa standardnom devijacijom ( $\pm$ SD). Utvrđivanje asocijacije genotipova sa fenotipom rađeno je regresionom analizom. Mera asocijacije genotipova sa fenotipom od interesa izražena je kao odnos šansi, OR (*engl.* Odds Ratio), sa intervalom pouzdanosti 95% ( $\pm$ 95% CI, *engl.* Confidence Interval). U svim statističkim testovima, vrednost verovatnoće  $p < 0,05$  smatrana je značajnom. Sve

statističke analize genotipskih podataka i analize asocijacije genotip-fenotip urađene su korišćenjem programa Statistica 8.0 Software.

Genski lokusi čiji su aleli u međusobnoj korelaciji su nestohastički asocirani usled smanjene učestalosti rekombinacija u regionu u kome se lokusi nalaze, a statistička mera njihove asocijacije je tzv. neravnoteža vezanosti (LD, *skr. od engl. Linkage Disequilibrium*). LD se određuje za populaciju koja je u HW ravnoteži. LD se izračunava na osnovu odstupanja procenjenih relativnih frekvencija haplotipova od njihovih očekivanih teorijskih vrednosti (kada se pretpostavlja da su aleli nezavisni), što se predstavlja vrednostima statističkog parametra  $D'$ , koeficijenta korelacije  $r^2$  i empirijske verovatnoće (P) asocijacije parova SNPs, koje su izvedene iz višestrukih permutacija genotipskih podataka (Devlin i sar., 1995). Vrednost  $D'=1$  pokazuje apsolutnu statističku asocijaciju ispitivanih alela, tj. apsolutni LD. Za analizu LD polimorfizama V249I i T280M gena za CX3CR1 i I123T i A181V gena za CXCL16, korišćen je kompjuterski program JLIN (Carter i sar., 2006), baziran na algoritmu maksimalnog predviđanja tzv. EM (*skr. od engl. Expectation Maximization*) algoritmu koji omogućava razlaganje dvostrukih heterozigota na haplotipove (Excoffier, 1995) i izračunavanje dvostrukih LD između markera (Devlin i sar., 1995).

Haplotip predstavlja specifičnu kombinaciju alela koji su u LD. Za analizu haplotipova polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 korišćen je kompjuterski program Thesias (v3.1), baziran na SEM (*skr. od engl. Stochastic Expectation Maximization*) algoritmu (Tregouet i sar., 2004). Thesias omogućava procenu frekvencija haplotipova kod individua na osnovu genotipova dvoalelskih SNPs i analizu asocijacije haplotipova sa fenotipovima i ishodima od interesa. Mogu se analizirati različiti modeli definisani izborom ishoda od interesa, kao i efekti svih ili pojedinačnih haplotipova, uz uključivanje kovarijata kao faktora u odnosu na koje treba korigovati dobijeni rezultat. Analiza asocijacije haplotipova sa fenotipom postiže se regresionom analizom. Testiranje efekata haplotipova (čija je učestalost veća od 5%) na fenotip od interesa determiniše efekat pojedinačnih ređih haplotipova u odnosu na najčešći haplotip. Mera asocijacije haplotipa sa fenotipom od interesa izražena je kao odnos šansi (OR) sa intervalom pouzdanosti 95% ( $\pm 95\%$  CI).

Predviđanje efekata koje polimorfizmi u CX3CR1 (V249I i T280M) i CXCL16 (I123T i A181V) mogu imati na interakciju CX3CL1-CX3CR1 odnosno CXCL16-

CXCR6, urađeno je bioinformatičkom analizom zasnovanom na metodi informacionih spektara (*engl.* Information Spectrum Method, *skr.* ISM) (Veljković i sar., 2007). Da bi se dobio informacioni spektar (IS) za svaki od analiziranih proteina, aminokiselinska sekvenca proteina je prvo transformisana u numerički niz. Pritom, svaka aminokiselina je predstavljena preko vrednosti potencijala interakcije elektron-jon (*engl.* Electron-Ion Interaction Potential, *skr.* EIIP), koja odgovara srednjem energetsom stanju svih valentnih elektrona u toj aminokiselini. Vrednost EIIP za svaku aminokiselinu je izračunata po generalnom modelu pseudopotencijala:  $\langle k + q|w|k \rangle = 0.25Z\sin(\pi 1,04Z) / (2\pi)$ , gde je  $q$  promena momenta delokalizovanog elektrona koji interaguje sa potencijalom  $w$ , a  $Z = (\sum Z_i)/n$  gde je  $Z_i$  broj valentnih elektrona  $i$ -tog atoma aminokiseline, dok  $n$  predstavlja ukupan broj atoma aminokiseline. Primenom diskretne Furijeove transformacije numerički niz aminokiselina svakog proteina je pretvoren u frekvencijski domen, kako bi se kreirao IS. Diskretna Furijeova transformacija je definisana kao:  $X(n) = \sum x(m)e^{-j(2/N)nm}$ ,  $n = 1, 2, \dots, N/2$ , gde je  $x(m)$   $m$ -ti član datog numeričkog niza,  $N$  je ukupan broj članova niza, a  $X(n)$  predstavlja koeficijente transformacije. Koeficijenti diskretne Furijeove transformacije opisuju amplitudu, fazu i frekvenciju sinusoida originalnih signala. Apsolutna vrednost kompleksne Furijeove transformacije definiše spektre amplitude i faze u kojima je sadržana kompletna informacija o originalnoj sekvenci. Prilikom analize proteinske sekvence, relevantnu informaciju obezbeđuje spektar energetske gustine definisan kao:  $S(n) = X(n)X(n) = |X(n)|^2$ ,  $n = 1, 2, \dots, N/2$ . Na ovaj način pojedinačne sekvence su posmatrane kao diskretni signali. Pošto je rastojanje između aminokiselinskih rezidua u polipeptidnom lancu konstantno i iznosi oko  $3,8^\circ\text{A}$ , pretpostavljeno je da su tačke unutar numeričkog niza na jednakom rastojanju. To rastojanje ( $d$ ) je arbitrarno određeno da bude 1, pa maksimalna frekvencija u spektru iznosi  $F = 1/2d = 0,5$ . U cilju izdvajanja zajedničkih spektralnih karakteristika dve sekvence, matematičko filtriranje je urađeno množenjem kompleksne Furijeove transformacije Furijeovom transformacijom ciljnog signala:  $C(n) = S_1(n)S_2(n)$ ,  $n = 1, 2, \dots, N/2$ . Rezultat je „kros-spektralna” (*engl.* Cross-Spectrum, *skr.* CS) funkcija. Najviši pik u CS funkciji označava zajedničku frekvencijsku komponentu analiziranih proteina. Prema konceptu ISM analize, aminokiselinske varijante u sekvenci proteina koje dovode do promene amplitude na toj karakterističnoj zajedničkoj frekvenciji utiču na efikasnost interakcije analiziranih proteina.

Izbor optimalne endogene kontrole za normalizaciju rezultata relativne ekspresije gena za hemokine i njihove receptore postignut je uz pomoć analize profila amplifikacije i primene kompjuterskog programa NormFinder v19 (Excel add-in NormFinder.xla) (Jensen i sar., 2009). NormFinder je algoritam baziran na matematičkom modelu genske ekspresije, koji koristi statistički pristup za procenu variranja ekspresije ispitivanih endogenih kontrola unutar svake pojedinačne grupe uzoraka (npr. samo pacijenata, tj. samo kontrola), kao i između ciljnih grupa uzoraka (npr. pacijenata i kontrola) (Andersen i sar., 2004). Ct vrednosti ekspresije endogenih kontrola, koje su dobijene u Real-time PCR, treba transformisati u linearni opseg kvantiteta metodom standardne krive ili  $\Delta Ct$  metodom, pošto program zahteva da ulazni podaci budu u linearnom opsegu. Primenjeni matematički model zahteva da u analizu bude uključeno najmanje tri gena i dva uzorka, po grupi. Rezultati analize u programu NormFinder određuju stabilnost ekspresije gena na osnovu vrednosti za stabilnost (*engl.* stability value). Najmanja „stability value“ odgovara najmanjoj vrednosti varijanse (unutargrupne i međugrupne) i njome je definisan najstabilnije eksprimirani gen kao optimalna endogena kontrola i najstabilnije eksprimirani par gena kao optimalna kombinacija endogenih kontrola, unutar svake pojedinačne grupe uzoraka i između grupa. Naime, najstabilniju gensku ekspresiju definišu najmanje i međusobno najpribližnije vrednosti prosečne unutargrupne varijanse (prosečna vrednost dobijena na osnovu varijansi svih analiziranih pojedinačnih grupa) i međugrupne varijanse, za odgovarajući gen odnosno par gena.

Za određivanje nivoa relativne ekspresije gena za hemokine i njihove receptore, u odgovarajućoj ciljnoj grupi u odnosu na kontrolnu, primenjene su formule iz Zimmermann i sar., 2003:

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

pri čemu MNE (*skr.* od *engl.* Mean Normalized Expression) predstavlja srednju normalizovanu ekspresiju ciljnog gena u pojedinačnom uzorku, E je efikasnost PCR amplifikacije endogene kontrole/ciljnog gena, srCt je srednja vrednost Ct duplikata pojedinačnog uzorka pri amplifikaciji endogene kontrole/ciljnog gena;

$$SE_{MNE} = MNE * [(\ln E_{\text{endogena kontrola}} * SE_{srCt_{\text{endogena kontrola}}})^2 + (\ln E_{\text{ciljni gen}} * SE_{srCt_{\text{ciljni gen}}})^2]^{1/2},$$

pri čemu  $SE_{MNE}$  (*skr. od engl. Standard Error of Mean Normalized Expression*) predstavlja standardnu grešku srednje normalizovane ekspresije ciljnog gena u pojedinačnom uzorku, MNE (*skr. od engl. Mean Normalized Expression*) predstavlja srednju normalizovanu ekspresiju ciljnog gena u pojedinačnom uzorku, E je efikasnost PCR amplifikacije endogene kontrole/ciljnog gena,  $SE_{srCt}$  je standardna greška srednje vrednosti Ct duplikata pojedinačnog uzorka pri amplifikaciji endogene kontrole/ciljnog gena.

Pošto *TaqMan*® eseji za gensku ekspresiju imaju efikasnost amplifikacije od 100% tj.  $E_{endogena\ kontrola} = E_{ciljni\ gen} = 2$  (Applied Biosystems, 2004), gore navedene formule postaju:

$$MNE = 2^{srCt\ endogena\ kontrola} / 2^{srCt\ ciljni\ gen} = 2^{(srCt\ endogena\ kontrola - srCt\ ciljni\ gen)} = 2^{-(srCt\ ciljni\ gen - srCt\ endogena\ kontrola)} = 2^{-\Delta Ct},$$

$$SE_{MNE} = MNE * [(ln2 * SE_{srCt\ endogena\ kontrola})^2 + (ln2 * SE_{srCt\ ciljni\ gen})^2]^{1/2}.$$

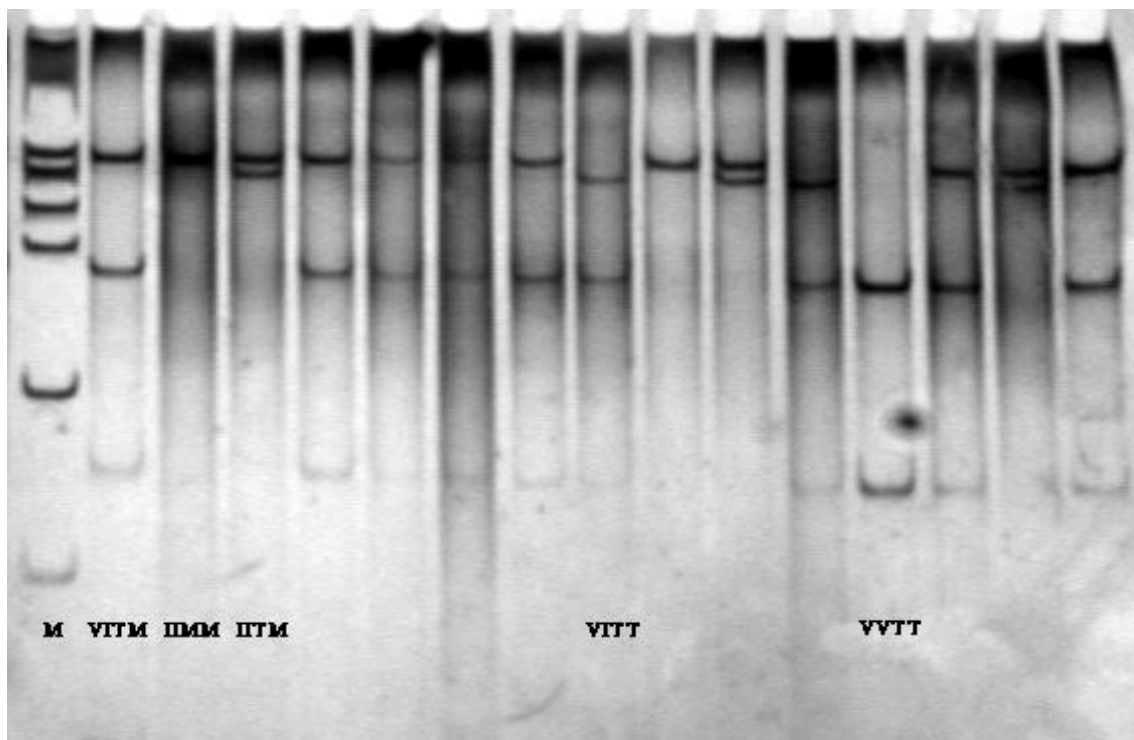
Izračunate vrednosti MNE uzoraka upoređene su između analiziranih grupa, primenom Mann-Whitney U testa. U ovom testu vrednosti  $p < 0,05$  predstavljale su statistički značajnu razliku relativne ekspresije ciljnog gena u ispitivanoj grupi uzoraka, u odnosu na kontrolnu grupu. Dobijeni rezultati relativne genske ekspresije su provereni u kompjuterskom programu REST08 (Relative Expression Software Tool 2008) v 2.0.7 (Pfaffl i sar., 2002), na osnovu odgovarajućih ulaznih vrednosti: Ct i efikasnosti PCR amplifikacije za svaki ispitivani gen i endogenu kontrolu u okviru ispitivanih grupa uzoraka. Cilj primene programa REST08 je da se utvrdi da li postoji značajna razlika u ekspresiji odgovarajućeg gena između grupe ispitivanih uzoraka i grupe kontrola, uzimajući u obzir efikasnost reakcije i normalizaciju na referentni gen-endogenu kontrolu. Rezultati statističke analize u ovom programu su relativni nivoi ekspresije gena prikazani tabelarno i grafički kao srednje vrednosti sa dva intervala standardne greške i njima odgovarajućim intervalom pouzdanosti 95% (95% CI). Testiranjem hipoteze provereno je da li je rezultat statistički značajan, na osnovu vrednosti p ( $p < 0,05$  predstavlja značajnu razliku).

## 4. REZULTATI

### 4.1. Asocijacija polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 sa nastankom i progresijom multiple skleroze

#### 4.1.1. Detekcija genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1

a)



b)

<b>Genotipovi polimorfizama V249I i T280M</b>	<b>Dužine restrikcionih fragmenata (PCR-RFLP), bp</b>
II / MM (PCR produkt)	294
II / TM	294 + 270
II / TT	270
VV / TT	175 + 95
VV / TM	175 + 119 + 95
VV / MM	175 + 119
VI / MM	294 + 175 + 119
VI / TT	270 + 175 + 95
VI / TM	294 + 270 + 175 + 119 + 95

*Slika R1.* Prikaz rezultata metode za detekciju polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 zasnovane na PIRA PCR-RFLP analizi: determinacija genotipova oba polimorfizma na 8% poliakrilamidnom gelu obojenom srebronitratom (*a*), prema očekivanoj dužini restrikcionih fragmenata (*b*).

Određivanje genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na 8% poliakrilamidnom gelu obojenom srebronitratom, prema očekivanoj dužini restrikcionih fragmenata, prikazana je na *slici R1, a) i b)*. Metoda za detekciju ovih polimorfizama, koja je zasnovana na PIRA PCR-RFLP analizi, detaljno je opisana u poglavlju: 3.2.7.

#### 4.1.2. Analiza efekata genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na nastanak i progresiju multiple skleroze

Tabela R1. Opis ciljne grupe kontrola i pacijenata.

Parametar	Kontrole (n =278)	RR MS (n = 319)	SP MS (n =66)	PP MS (n =12)	RR+SP MS (n =385)
Pol (žene/muškarci)	147/131	204/115	39/27	6/6	243/142
Starost (godine)	40,9 ± 15,0	35,1 ± 9,3	42,4 ± 10,5	46,3 ± 8,1	36,4 ± 9,9
Starost na početku bolesti (godine)	-	28,5 ± 8,2	29,9 ± 9,2	43,2 ± 8,3	28,7 ± 8,4
Trajanje bolesti (godine)	-	6,7 ± 5,5	12,7 ± 6,7	3,1 ± 2,2	7,8 ± 6,2
EDSS	-	2,6 ± 1,2	5,9 ± 1,7	3,4 ± 1,7	3,1 ± 1,8
MSSS	-	4,8 ± 2,3	7,0 ± 2,6	6,7 ± 2,1	5,2 ± 2,5

Vrednosti kontinualnih parametara su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD); n-ukupan broj kontrola/pacijenata, RR MS - pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP MS - pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom, PP MS - pacijenti sa primarno-progresivnim tokom multiple skleroze.

U tabeli R1 su prikazani relevantni parametri za kontrolnu grupu (pol, starost) i grupu pacijenata sa multiplom sklerozom (pol, starost, starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS i MSSS), u okviru kojih su određeni genotipovi polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1. Srednja vrednost godina starosti kontrola i pacijenata iznosi oko 40. U grupi pacijenata broj žena je oko 1,6 puta veći nego muškaraca, što potvrđuje opšti trend veće učestalosti bolesti u ženskom polu. U statističku analizu efekata alela, genotipova i haplotipova genskih polimorfizama nisu uključeni pacijenti sa PP tokom bolesti, zbog njihove male brojnosti (n=12).



Tabela R2. Frekvencije genotipova i alela polimorfizama u genu za CX3CR1 kod kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom, i vrednosti kliničkih parametara kod pacijenata nosilaca različitih genotipova ispitivanih polimorfizama:

a) distribucija frekvencija genotipova i alela polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 kod kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom

<b>Genotipovi polimorfizma</b>	<b>Kontrole</b>	<b>Pacijenti</b>	<b>OR (<math>\pm 95\% \text{CI}</math>)</b>	<b>p (<math>\chi^2</math>)</b>
	<b>n (%)</b>	<b>RR+SP n (%)</b>		
<b>V249I</b>	278	385		
<b>VV</b>	134 (48,2)	174 (45,2)	referentni genotip	
<b>VI</b>	125 (45,0)	176 (45,7)	1,08 (0,78-1,49)	0,65
<b>II</b>	19 (6,8)	35 (9,1)	1,42 (0,78-2,59)	0,25
<b>Alel I</b>	0,29	0,32	1,14 (0,89-1,46)	0,30
<b>T280M</b>	278	385		
<b>TT</b>	186 (66,9)	239 (62,1)	referentni genotip	
<b>TM</b>	78 (28,1)	129 (33,5)	1,28 (0,91-1,79)	0,16
<b>MM</b>	14 (5,0)	17 (4,4)	0,94 (0,45-1,97)	0,88
<b>Alel M</b>	0,19	0,21	1,13 (0,86-1,48)	0,37

n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata, RR - pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP - pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom bolesti, OR - "odds ratio" (odnos šansi), CI - "confidence interval" (interval pouzdanosti);

b) distribucija vrednosti kliničkih parametara (starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS i MSSS) kod pacijenata (RR i SP) nosilaca odgovarajućih genotipova polimorfizama V249I i T280M

<b>Genotipovi polimorfizma V249I</b>	<b>Starost na početku bolesti (godine)</b>	<b>Trajanje bolesti (godine)</b>	<b>EDSS</b>	<b>MSSS</b>
<b>VV</b>	29,9 ± 8,8	7,4 ± 6,3	3,2 ± 1,7	5,4 ± 2,5
<b>VI</b>	28,7 ± 9,1	7,8 ± 5,4	3,2 ± 1,9	5,3 ± 2,4
<b>II</b>	29,8 ± 8,1	6,9 ± 4,9	2,8 ± 1,9	4,9 ± 2,9
<b>p (Kruskal-Wallis ANOVA)</b>	0,43	0,35	0,44	0,76
<b>Genotipovi polimorfizma T280M</b>	<b>Starost na početku bolesti (godine)</b>	<b>Trajanje bolesti (godine)</b>	<b>EDSS</b>	<b>MSSS</b>
<b>TT</b>	29,6 ± 8,8	7,4 ± 6,3	3,1 ± 1,8	5,3 ± 2,6
<b>TM</b>	28,6 ± 8,8	7,7 ± 4,8	3,2 ± 2,0	5,2 ± 2,4
<b>MM</b>	31,5 ± 9,7	8,2 ± 5,2	3,5 ± 2,1	6,0 ± 2,7
<b>p (Kruskal-Wallis ANOVA)</b>	0,54	0,27	0,85	0,69

vrednosti kliničkih parametara su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija;

c) distribucija frekvencija genotipova i alela polimorfizama V249I i T280M kod pacijenata sa RR i SP tokom multiple skleroze

<b>Genotipovi polimorfizma</b>	<b>Pacijenti RR n (%)</b>	<b>Pacijenti SP n (%)</b>	<b>OR (<math>\pm</math>95%CI)</b>	<b>p (<math>\chi^2</math>)</b>
<b>V249I</b>	319	66		
<b>VV</b>	144 (45,3)	36 (54,0)	referentni genotip	
<b>VI</b>	140 (43,8)	28 (42,9)	0,80 (0,46-1,38)	0,42
<b>II</b>	35 (10,9)	2 (3,1)	0,23 (0,05-0,99)	<b>0,05</b>
<b>Alel I</b>	0,33	0,24	0,65 (0,42-1,00)	<b>0,05</b>
<b>T280M</b>	319	66		
<b>TT</b>	201(62,9)	42 (63,5)	referentni genotip	
<b>TM</b>	102 (31,6)	23 (34,9)	1,08 (0,61-1,89)	0,79
<b>MM</b>	16 (5,5)	1 (1,6)	0,30 (0,04-2,32)	0,25
<b>Alel M</b>	0,21	0,19	0,88 (0,55-1,41)	0,60

n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata, RR - pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP - pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom bolesti, OR-“odds ratio” (odnos šansi), CI - “confidence interval” (interval pouzdanosti).

Na osnovu rezultata  $\chi^2$  testa utvrđeno je da se frekvencije genotipova i alela polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 ne razlikuju značajno između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa multiplom sklerozom ( $p>0,05$ ) (*tabela R2 a*)), tj. da ova dva polimorfizma nisu genetski faktori rizika za nastanak multiple skleroze. Nema odstupanja od ravnoteže po Hardy-Weinberg-u za analizirane polimorfizme ( $\chi^2$ ,  $p>0,05$ ). Nema značajnih razlika u frekvencijama genotipova i alela ovih polimorfizama prema polu - niti između žena i muškaraca kontrola, odnosno pacijenata, niti unutar svakog pojedinačnog pola između kontrola i pacijenata ( $\chi^2$ ,  $p>0,05$ ) (rezultati nisu prikazani). U analiziranoj grupi pacijenata srednje vrednosti kliničkih parametara, kao što su: starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS i MSSS, ne razlikuju se značajno između nosilaca različitih genotipova polimorfizama V249I i T280M (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p>0,05$ ) (*tabela R2 b*)). Nema značajne razlike učestalosti

genotipova i alela polimorfizama V249I i T280M između pacijenata sa relapsno-remitentnim (RR) i sekundarno-progresivnim (SP) tokom multiple skleroze (*tabela R2 c*)), mada postoji trend da pacijenti nosioci genotipa II (u odnosu na nosioce češćeg homozigota, VV, kao referentnog) tj. nosioci alela I (u odnosu na nosioce češćeg alela, V) imaju manju šansu za progresiju RR u SP formu multiple skleroze ( $\chi^2$ ,  $p=0,05$ ;  $OR \pm 95\%CI \leq 1$ ) (*tabela R2 c*)).

#### 4.1.3. Analiza efekata haplotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na nastanak i progresiju multiple skleroze

*Tabela R3.* Procena distribucije haplotipova polimorfizama u genu za CX3CR1 kod kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom:

a) distribucija haplotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 kod kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom

Haplotipovi polimorfizama	Kontrole	Pacijenti		
	n (%)	RR+SP n (%)	OR ( $\pm 95\%CI$ )	p ( $\chi^2$ )
<b>V249I i T280M</b>	278	385		
<b>V<sub>249</sub>T<sub>280</sub></b>	195 (70,09)	260 (67,61)	referentni haplotip	
<b>I<sub>249</sub>M<sub>280</sub></b>	50 (18,48)	80 (20,73)	1,16 (0,88-1,54)	0,29
<b>I<sub>249</sub>T<sub>280</sub></b>	31 (10,84)	43 (11,22)	1,09 (0,76-1,58)	0,64
<b>V<sub>249</sub>M<sub>280</sub></b>	2 (0,59)	2 (0,44)	-	-

n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata, RR-pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP-pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom bolesti, OR-“odds ratio” (odnos šansi), CI- “confidence interval” (interval pouzdanosti);

b) distribucija haplotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 kod pacijenata sa multiplom sklerozom, u odnosu na tok bolesti

Haplotipovi polimorfizama	Pacijenti RR	Pacijenti SP	OR ( $\pm 95\%$ CI)	p ( $\chi^2$ )
	n (%)	n (%)		
<b>V249I i T280M</b>	319	66		
V <sub>249</sub> T <sub>280</sub>	213 (66,74)	49 (74,96)	referentni haplotip	
I <sub>249</sub> M <sub>280</sub>	65 (20,28)	13 (19,49)	0,85 (0,50-1,44)	0,54
I <sub>249</sub> T <sub>280</sub>	39 (12,37)	4 (5,55)	<b>0,39 (0,17-0,92)</b>	<b>0,03*</b>
V <sub>249</sub> M <sub>280</sub>	2 (0,61)	0 (0,00)	-	-

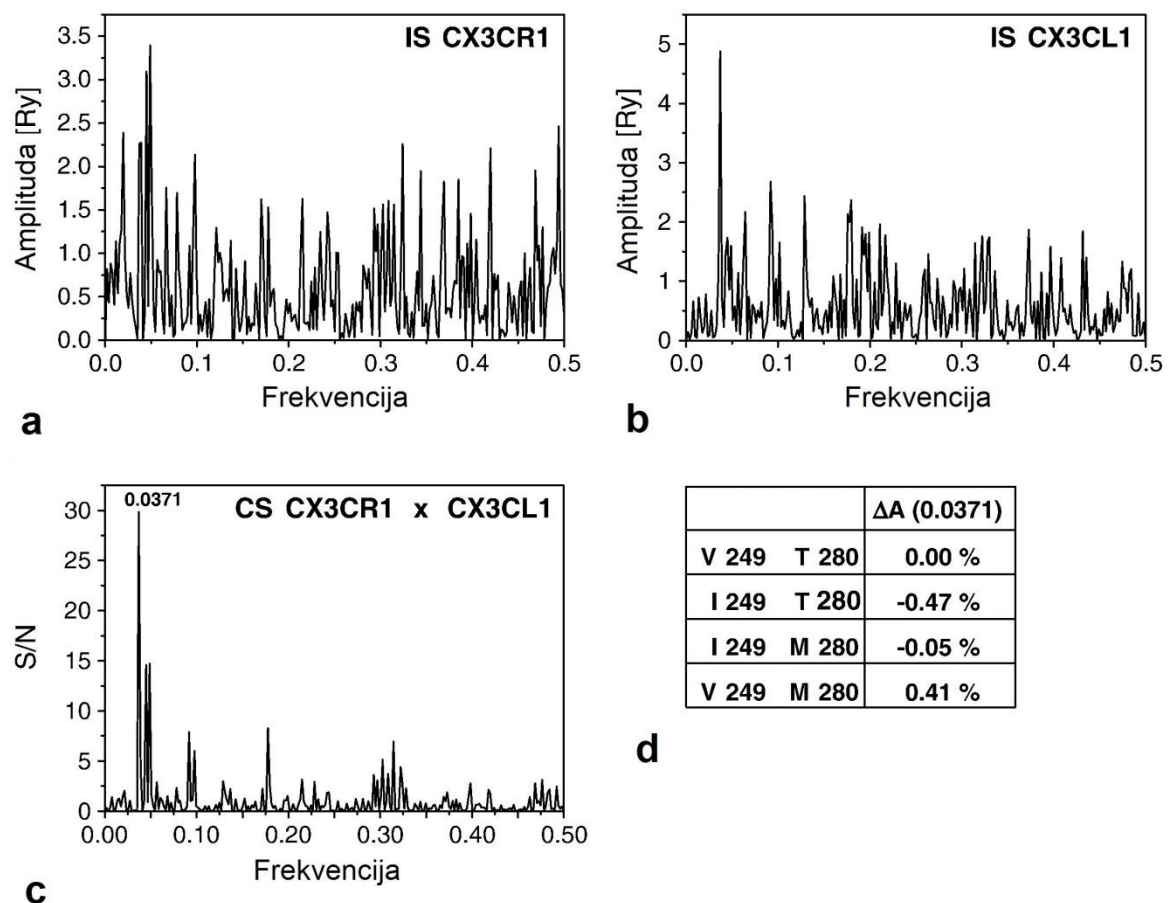
n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata, RR-pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP-pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom bolesti, OR-“odds ratio” (odnos šansi), CI- “confidence interval” (interval pouzdanosti). Asterisk (\*) predstavlja statističku značajnost, kada je  $p < 0,05$ .

Izražen “linkage disequilibrium” postoji između polimorfizama V249I i T280M, što je pokazano na osnovu vrednosti statističkog parametra D' koje su bliske vrednosti 1, a iznose 0,96 u kontrolnoj grupi i 0,97 u grupi pacijenata. Shodno tome, u obe grupe je procenjeno prisustvo tri dominantna haplotipa: V<sub>249</sub>T<sub>280</sub>, I<sub>249</sub>M<sub>280</sub>, I<sub>249</sub>T<sub>280</sub>, i jednog retkog haplotipa, V<sub>249</sub>M<sub>280</sub> (*tabela R3 a*). Haplotip V<sub>249</sub>M<sub>280</sub> nije uključen u analizu, zbog izrazito niske frekvencije (<1%). Efekti haplotipova I<sub>249</sub>M<sub>280</sub> i I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> na rizik za nastanak multiple skleroze i sekundarnu progresiju bolesti su procenjeni u odnosu na najčešći haplotip, V<sub>249</sub>T<sub>280</sub>, kao referentni. Nije utvrđena statistički značajna razlika učestalosti ovih haplotipova između grupa kontrola i pacijenata ( $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ) (*tabela R3 a*), što ukazuje da analizirani haplotipovi polimorfizama V249I i T280M nisu genetski faktori rizika za nastanak multiple skleroze.

Haplotip I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> ima značajno veću učestalost kod pacijenata sa RR tokom bolesti, u odnosu na pacijente sa SP tokom, što znači da pacijenti RR toka koji su nosioci ovog haplotipa (u odnosu na nosioce referentnog haplotipa, V<sub>249</sub>T<sub>280</sub>) imaju značajno manju šansu za progresiju bolesti u SP formu ( $\chi^2$ ,  $p = 0,03$ ; OR

( $\pm 95\% \text{CI}$ )=0,39(0,17-0,92)) (tabela R3 b)). Ne postoji statistički značajna razlika vrednosti ispitivanih kliničkih parametara između pacijenata nosilaca različitih haplotipova (rezultati nisu prikazani).

#### 4.1.4. Bioinformatička analiza predviđanja efekata polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 na interakciju CX3CR1-CX3CL1



Slika R2. Analiza informacionih spektara CX3CR1 i CX3CL1.

a) Informacioni spektar (IS) za CX3CR1. b) IS za CX3CL1.

c) “Kros-spektralna” (CS) analiza CX3CR1 i CX3CL1: dominantna zajednička frekvencija iznosi 0,037. Vrednosti frekvencije dobijene Furijeovom transformacijom

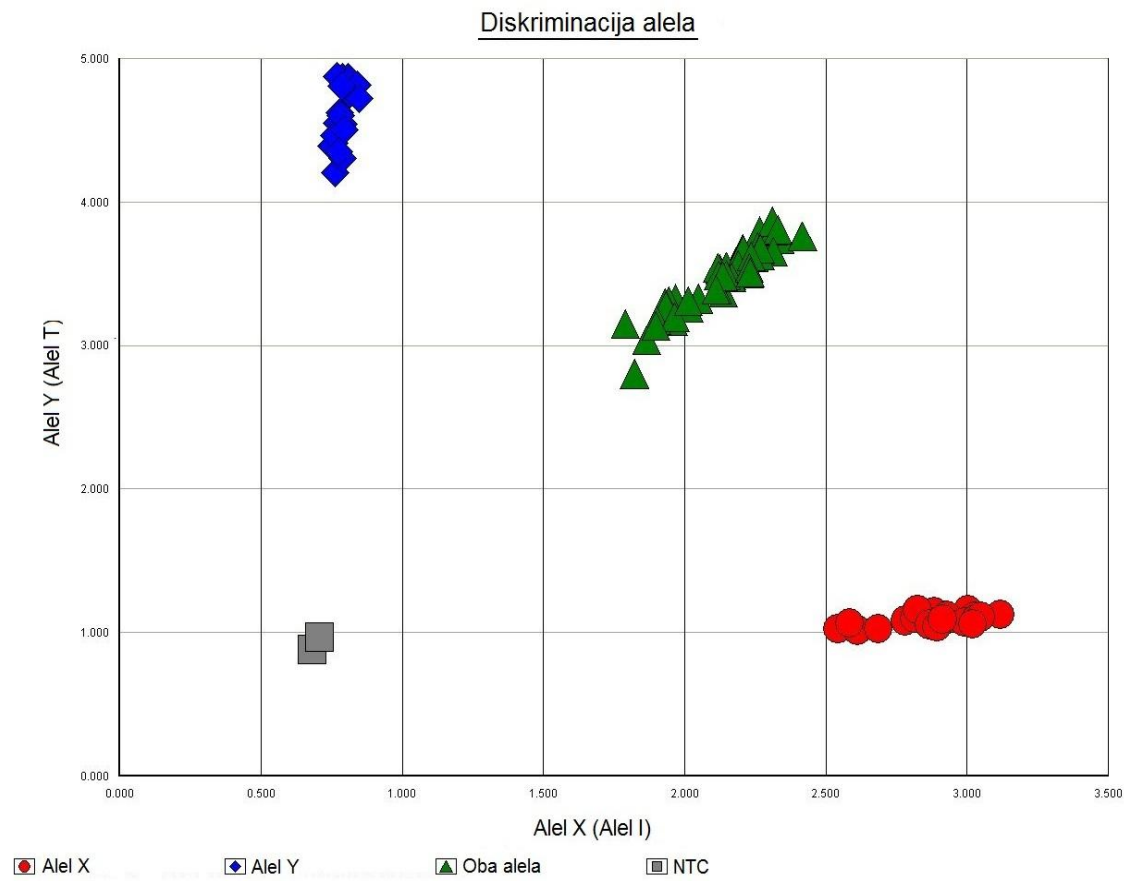
numeričkog niza potencijala interakcije elektron-jon (EIIP), koji odgovara aminokiselinskoj sekvenci proteina, su prikazane na apscisi. Najniža frekvencija je 0,00, a najviša je 0,50. Vrednosti amplitude su izražene u arbitrarnim jedinicama koje odgovaraju frekvencijskim komponentama informacionog spektra i prikazane su na ordinati.

d) Relativna promena amplitude ( $\Delta A$ ) pri karakterističnoj frekvenciji od 0,037 u informacionim spektrima tri polimorfne varijante CX3CR1, u odnosu na najčešću varijantu (V249T280).

Informacioni spektri (IS) CX3CR1 i CX3CL1 su određeni (*slika R2 a*) i *b*) i, nakon “kros-spektralnog” filtriranja, identifikovana je zajednička Furijeova frekvencija od 0,037 koja je karakteristična za interakciju receptora i liganda (*slika R2 c*). Određene su vrednosti amplitude pri karakterističnoj zajedničkoj frekvenciji (0,037) za četiri proteinske varijante CX3CR1 koje su kodirane od strane četiri odgovarajuća haplotipa. Nije detektovana značajna promena amplitude ( $\Delta A$ ) na frekvenciji 0,037 za proteinsku varijantu I249M280, u odnosu na najčešću izoformu V249T280 ( $\Delta A \sim 0,00$ ) (*slika R2 d*). Vrednosti  $\Delta A$  (0,037) za preostale dve varijante, I249T280 i V249M280, se značajno razlikuju u odnosu na V249T280. Najveća promena amplitude je detektovana za I249T280 varijantu CX3CR1 ( $\Delta A = -0,47\%$ ) (*slika R2 d*). Ovi rezultati ukazuju da potencijalno najjače efekte na interakciju CX3CR1-CX3CL1 imaju varijante CX3CR1 kodirane haplotipovima koji su sastavljeni od po jednog češćeg i jednog ređeg alela polimorfizama V249I i T280M.

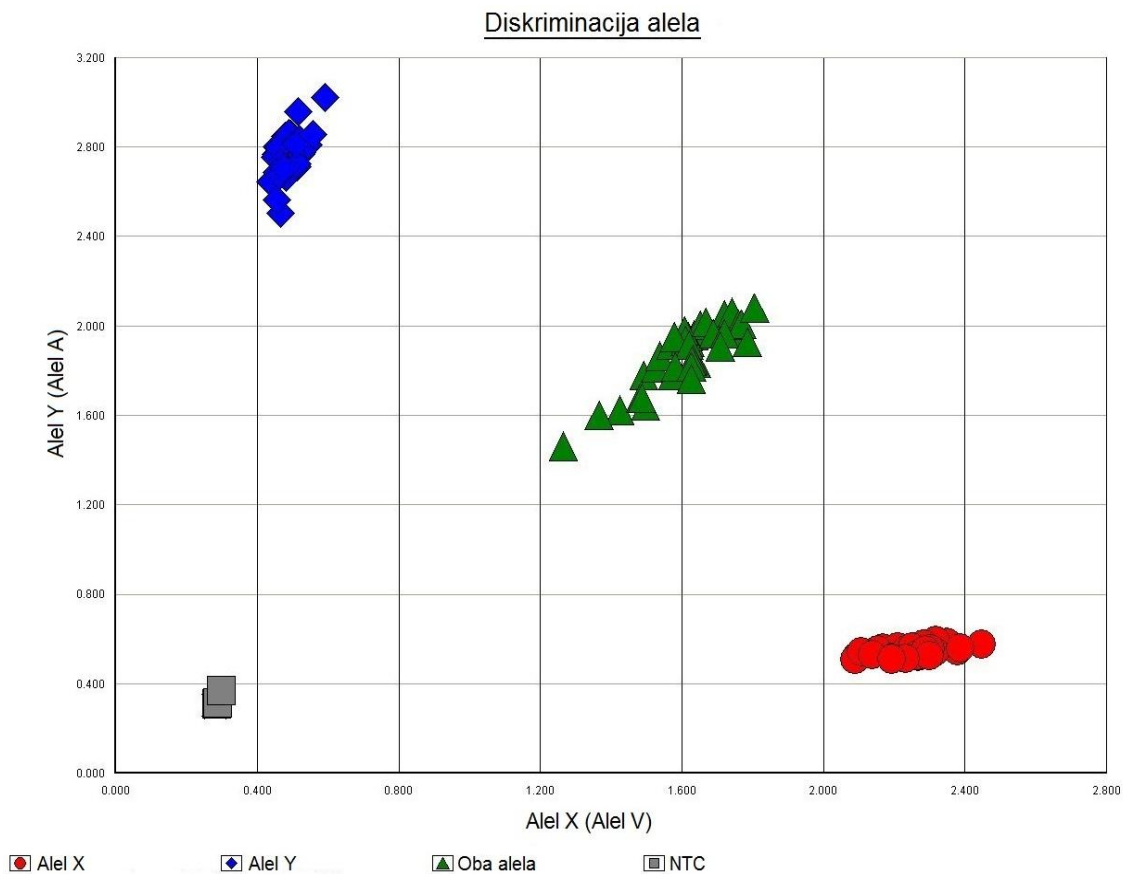
#### 4.1.5. Detekcija genotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16

a)





b)



*Slika R3.* Prikaz određivanja genotipova polimorfizama: (a) I123T i (b) A181V, u genu za CXCL16, primenom *TaqMan*<sup>®</sup> SNP eseja za genotipizaciju (7500 Real-time PCR system, Applied Biosystems).

Prikaz očitavanja genotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 dat je na *slici R3, a) i b)*. Detaljni opis metode za detekciju ovih polimorfizama, koja je zasnovana na primeni *TaqMan*<sup>®</sup> eseja za genotipizaciju, nalazi se u poglavlju: 3.2.9.

#### 4.1.6. Analiza efekata genotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 na nastanak i progresiju multiple skleroze

Tabela R4. Opis ciljne grupe kontrola i pacijenata.

Parametar	Kontrole (n =275)	RR MS (n =303)	SP MS (n =77)	PP MS (n =12)	RR+SP MS (n =380)
Pol (žene/muškarci)	148/150	191/112	48/29	7/5	239/141
Starost (godine)	39,6 ± 10,7	36,4 ± 9,6	43,1 ± 10,4	46,5 ± 9,6	39,7 ± 10,0
Starost na početku bolesti (godine)	-	29,5 ± 8,9	29,7 ± 8,7	43,0 ± 10,4	29,6 ± 8,8
Trajanje bolesti (godine)	-	7,0 ± 5,5	13,4 ± 7,2	3,5 ± 2,3	10,2 ± 6,3
EDSS	-	2,6 ± 1,2	5,8 ± 1,6	3,7 ± 1,7	4,2 ± 1,4
MSSS	-	4,2 ± 2,3	6,9 ± 2,1	7,0 ± 2,0	5,5 ± 2,2

n - ukupan broj kontrola/pacijenata; RR MS - pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP MS - pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom, PP MS - pacijenti sa primarno-progresivnim tokom multiple skleroze; vrednosti kontinualnih parametara su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD).

U tabeli R4 su prikazani relevantni parametri za kontrolnu grupu (pol, starost) i grupu pacijenata sa multiplom sklerozom (pol, starost, starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS, MSSS), u okviru kojih je urađena determinacija genotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16. Srednja vrednost godina starosti kontrola i pacijenata iznosi oko 40. U grupi pacijenata broj žena je oko 1,6 puta veći nego muškaraca, što potvrđuje opšti trend veće učestalosti bolesti u ženskom polu. U statističku analizu efekata alela, genotipova i haplotipova genskih polimorfizama nisu uključeni pacijenti sa PP tokom bolesti, zbog njihove male brojnosti (n=12).

Tabela R5. Frekvencije genotipova i alela polimorfizama u genu za CXCL16 kod kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom, i vrednosti kliničkih parametara kod pacijenata nosilaca odgovarajućih genotipova ispitivanih polimorfizama:

a) distribucija frekvencija genotipova i alela polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 kod kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom

Genotipovi polimorfizma	Kontrole	Pacijenti	OR ( $\pm 95\% \text{CI}$ )	p ( $\chi^2$ )
	n (%)	RR+SP n (%)		
<b>I123T</b>	298	380		
<b>II</b>	102 (34,2)	100 (26,3)	referentni genotip	
<b>IT</b>	143 (48,0)	199 (52,4)	<b>1,42 (1,00-2,01)</b>	<b>0,049*</b>
<b>TT</b>	53 (17,8)	81 (21,3)	<b>1,56 (1,00-2,43)</b>	<b>0,049*</b>
<b>Alel T</b>	0,42	0,47	<b>1,26 (1,02-1,56)</b>	<b>0,04*</b>
<b>A181V</b>	298	380		
<b>AA</b>	102 (34,2)	100 (26,3)	referentni genotip	
<b>AV</b>	144 (48,3)	199 (52,4)	<b>1,41 (0,99-2,00)</b>	<b>0,05</b>
<b>VV</b>	52 (17,5)	81 (21,3)	<b>1,59 (1,02-2,47)</b>	<b>0,04*</b>
<b>Alel V</b>	0,42	0,47	<b>1,27 (1,02-1,58)</b>	<b>0,04*</b>

n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata; RR - pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP - pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom bolesti; OR- "odds ratio" (odnos šansi), CI- "confidence interval" (interval pouzdanosti); asterisk (\*) predstavlja statističku značajnost, kada je  $p < 0,05$ ;

b) distribucija vrednosti kliničkih parametara (starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS i MSSS) kod pacijenata (RR i SP) nosilaca odgovarajućih genotipova polimorfizama I123T i A181V

<b>Genotipovi polimorfizma I123T</b>	<b>Starost na početku bolesti (godine)</b>	<b>Trajanje bolesti (godine)</b>	<b>EDSS</b>	<b>MSSS</b>
<b>II</b>	30,5 ± 8,9	7,9 ± 5,9	3,2 ± 1,8	5,0 ± 2,6
<b>IT</b>	28,9 ± 8,9	8,4 ± 6,8	3,3 ± 1,9	4,8 ± 2,5
<b>TT</b>	30,2 ± 8,7	8,3 ± 5,8	3,1 ± 1,7	4,5 ± 2,3
<b>p (Kruskal-Wallis ANOVA)</b>	0,27	0,76	0,94	0,46
<b>Genotipovi polimorfizma A181V</b>	<b>Starost na početku bolesti (godine)</b>	<b>Trajanje bolesti (godine)</b>	<b>EDSS</b>	<b>MSSS</b>
<b>AA</b>	30,5 ± 8,9	7,9 ± 5,9	3,2 ± 1,8	5,0 ± 2,6
<b>AV</b>	28,9 ± 8,9	8,4 ± 6,8	3,3 ± 1,9	4,8 ± 2,5
<b>VV</b>	30,2 ± 8,7	8,3 ± 5,8	3,1 ± 1,7	4,5 ± 2,3
<b>p (Kruskal-Wallis ANOVA)</b>	0,27	0,76	0,94	0,46

vrednosti kliničkih parametara su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija;

c) distribucija frekvencija genotipova i alela polimorfizama I123T i A181V kod pacijenata sa RR i SP tokom multiple skleroze

<b>Genotipovi polimorfizma</b>	<b>Pacijenti RR n (%)</b>	<b>Pacijenti SP n (%)</b>	<b>OR (<math>\pm 95\%</math>CI)</b>	<b>p (<math>\chi^2</math>)</b>
<b>I123T</b>	303	77		
<b>II</b>	80 (26,4)	20 (26,0)	referentni genotip	
<b>IT</b>	156 (51,5)	43 (55,8)	1,10 (0,61-2,00)	0,75
<b>TT</b>	67 (22,1)	14 (18,2)	0,84 (0,39-1,78)	0,64
<b>Alel T</b>	0,48	0,46	0,93 (0,65-1,33)	0,70
<b>A181V</b>	303	77		
<b>AA</b>	80 (26,4)	20 (26,0)	referentni genotip	
<b>AV</b>	156 (51,5)	43 (55,8)	1,10 (0,61-2,00)	0,75
<b>VV</b>	67 (22,1)	14 (18,2)	0,84 (0,39-1,78)	0,64
<b>Alel V</b>	0,48	0,46	0,93 (0,65-1,33)	0,70

n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata; RR - pacijenti sa relapsno-remitentnim tokom, SP - pacijenti sa sekundarno-progresivnim tokom bolesti; OR - "odds ratio" (odnos šansi), CI- "confidence interval" (interval pouzdanosti).

Frekvencije genotipova i alela polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 se značajno razlikuju između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa multiplom sklerozom, što čini ova dva polimorfizma genetskim faktorima rizika za nastanak multiple skleroze. Učestalosti ređih alela oba polimorfizma, T i V, kao i genotipova koji ih sadrže, značajno su veće kod pacijenata u odnosu na kontrole ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ), te nosioci navedenih alela i genotipova imaju značajno veću šansu da obole od multiple skleroze ( $OR \pm 95\%CI \geq 1$ ) (*tabela R5 a*). Nema odstupanja od ravnoteže po Hardy-Weinberg-u za analizirane polimorfizme ( $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ). U grupi pacijenata (RR i SP) srednje vrednosti kliničkih parametara (starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS i MSSS) se ne razlikuju značajno između nosilaca različitih genotipova polimorfizama I123T i A181V (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p > 0,05$ ) (*tabela R5 b*). Nema značajne razlike učestalosti genotipova i alela polimorfizama I123T i A181V između pacijenata

sa relapsno-remitentnim (RR) i sekundarno-progresivnim (SP) tokom multiple skleroze ( $\chi^2$ ,  $p > 0,05$ ) (tabela R5 c).

Tabela R6. Frekvencije genotipova i alela polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 kod žena kontrola i žena pacijenata (RR+SP).

Genotipovi Polimorfizma	Žene kontrole	Žene pacijenti		
	n (%)	RR+SP n (%)	OR ( $\pm 95\%$ CI)	p ( $\chi^2$ )
<b>I123T</b>	148	239		
<b>II</b>	56 (37,8)	57 (23,8)	referentni genotip	
<b>IT</b>	62 (41,9)	135 (56,5)	<b>2,14 (1,33-3,44)</b>	<b>0,002**</b>
<b>TT</b>	30 (20,3)	47 (19,7)	0,95 (0,56-1,61)	0,15
<b>IT+TT</b>	92 (62,2)	182 (76,2)	<b>1,94 (1,24-3,04)</b>	<b>0,003**</b>
<b>Alel T</b>	0,41	0,48	1,31 (0,98-1,76)	0,07
<b>A181V</b>	148	239		
<b>AA</b>	57 (38,5)	57 (23,8)	referentni genotip	
<b>AV</b>	62 (41,9)	135 (56,5)	<b>2,18 (1,35-3,50)</b>	<b>0,001**</b>
<b>VV</b>	29 (19,6)	47 (19,7)	1,62 (0,90-2,93)	0,11
<b>AV+VV</b>	91 (61,5)	182 (76,2)	<b>2,00 (1,28-3,12)</b>	<b>0,002**</b>
<b>Alel V</b>	0,40	0,48	<b>1,35 (1,01-1,81)</b>	<b>0,045*</b>

n (%) - ukupan broj (procenat) žena kontrola/pacijenata; OR - “odds ratio” (odnos šansi), CI - “confidence interval” (interval pouzdanosti); asterisk (\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,05$ , dvostruki asterisk (\*\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,01$ .

Određene su frekvencije genotipova i alela polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 kod žena kontrola i pacijenata (tabela R6) i muškaraca kontrola i pacijenata (rezultati nisu prikazani). Detektovana je značajno veća učestalost ( $\chi^2$ ,  $p < 0,05$ ) genotipova koji nose ređe alele (IT+TT i AV+VV), odnosno heterozigota IT i AV kod žena pacijenata u odnosu na žene kontrole. To znači da žene nosioci ovih

genotipova imaju oko dva puta veću šansu ( $OR \sim 2$ ) da obole od multiple skleroze u odnosu na žene nosioce referentnih genotipova II i AA (*tabela R6*). Nema značajnih razlika u srednjim vrednostima kliničkih parametara između pacijenata nosilaca različitih genotipova polimorfizama I123T i A181V u grupi žena (rezultati nisu prikazani). U grupi muškaraca pacijenata utvrđene su veće učestalosti genotipova TT i VV u odnosu na grupu muškaraca kontrola, ali nema značajne asocijacije polimorfizama sa nastankom niti sa progresijom multiple skleroze (rezultati nisu prikazani).

#### 4.1.7. Analiza efekata haplotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 na nastanak i progresiju multiple skleroze

*Tabela R7.* Haplotipovi polimorfizama u genu za CXCL16 kod kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom:

a) procena distribucije haplotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 kod kontrola i pacijenata (RR+SP)

Haplotipovi polimorfizama	Kontrole n (%)	Pacijenti RR+SP		
		n (%)	OR ( $\pm 95\% CI$ )	p ( $\chi^2$ )
<b>I123T i A181V</b>	298	380		
I <sub>123</sub> A <sub>181</sub>	173 (58,1)	199 (52,5)	referentni haplotip	
T <sub>123</sub> V <sub>181</sub>	123 (41,4)	181 (47,5)	<b>1,29 (1,03-1,60)</b>	<b>0,03*</b>
T <sub>123</sub> A <sub>181</sub>	1 (0,3)	0 (0,0)	-	-
I <sub>123</sub> V <sub>181</sub>	1 (0,2)	0 (0,0)	-	-

n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata; OR - “odds ratio” (odnos šansi), CI- “confidence interval” (interval pouzdanosti); asterisk (\*) predstavlja statističku značajnost, kada je  $p < 0,05$ ;

b) procena distribucije haplotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 kod žena

Haplotipovi polimorfizama	Žene kontrole	Žene pacijenti	OR ( $\pm 95\%$ CI)	p ( $\chi^2$ )
	n (%)	RR+SP n (%)		
<b>I123T i A181V</b>	148	239		
<b>I<sub>123</sub>A<sub>181</sub></b>	87 (58,8)	125 (52,1)	referentni haplotip	
<b>T<sub>123</sub>V<sub>181</sub></b>	60 (40,5)	114 (47,9)	<b>1,36 (1,02-1,82)</b>	<b>0,04*</b>
<b>T<sub>123</sub>A<sub>181</sub></b>	1 (0,7)	0 (0,0)	-	-
<b>I<sub>123</sub>V<sub>181</sub></b>	0 (0,0)	0 (0,0)	-	-

n (%) - ukupan broj (procenat) kontrola/pacijenata; OR - “odds ratio” (odnos šansi), CI- “confidence interval” (interval pouzdanosti); asterisk (\*) predstavlja statističku značajnost, kada je  $p < 0,05$ .

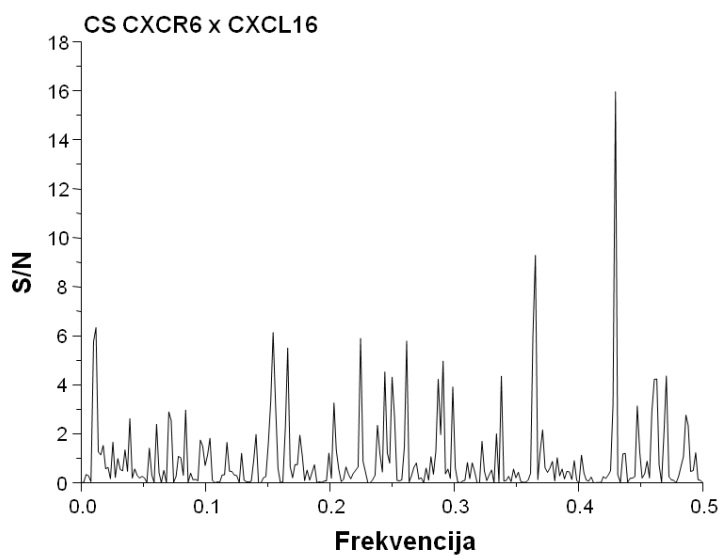
Polimorfizmi I123T i A181V su u apsolutnom “linkage disequilibrium”-u, s obzirom da vrednosti statističkog parametra D' iznose približno 1, tj. 0,99 u kontrolnoj grupi i 1,00 u grupi pacijenata (rezultati nisu prikazani). Stoga, u obe grupe je procenjeno prisustvo samo dva dominantna haplotipa, I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> i T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>, koji su uključeni u analizu (tabela R7). Efekat haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> na rizik za nastanak multiple skleroze je procenjen u odnosu na najčešći haplotip, I<sub>123</sub>A<sub>181</sub>, kao referentni. U odnosu na kontrole, pacijenti imaju značajno veću učestalost haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>, što čini ovaj haplotip značajnim faktorom rizika za nastanak multiple skleroze. Nosioци haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> imaju značajno veću šansu da obole, u odnosu na nosioce referentnog haplotipa I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> ( $\chi^2$ ,  $p=0,03$ ; OR( $\pm 95\%$ CI)=1,29(1,03-1,60)) (tabela R7 a)). U grupi žena dobijen je sličan rezultat. Žene nosioци haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> imaju značajno veću šansu da obole, u poređenju sa ženama nosiocima haplotipa I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> ( $\chi^2$ ,  $p=0,04$ ; OR( $\pm 95\%$ CI)=1,36(1,02-1,82)) (tabela R7 b)). U grupi muškaraca pacijenata nađena je veća učestalost haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> u odnosu na grupu muškaraca kontrola, ali nema značajne asocijacije sa nastankom multiple skleroze (rezultati nisu prikazani). Ne postoji statistički značajna razlika u srednjim vrednostima kliničkih parametara između



nosilaca dvaju različitih haplotipova u okviru cele grupe pacijenata, niti u okviru podgrupa pacijenata ženskog odnosno muškog pola (rezultati nisu prikazani).

#### 4.1.8. Bioinformatička analiza predviđanja efekata polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 na interakciju CXCL16-CXCR6

a)



b)

<b>CXCL16 varijanta</b>	<b><math>\Delta A</math> (0,429)</b>
I123A181	0,00 %
I123V181	5,37 %
T123A181	-13,10 %
T123V181	-7,10 %

Slika R4. Analiza informacionih spektara membranskog CXCL16 i CXCR6.

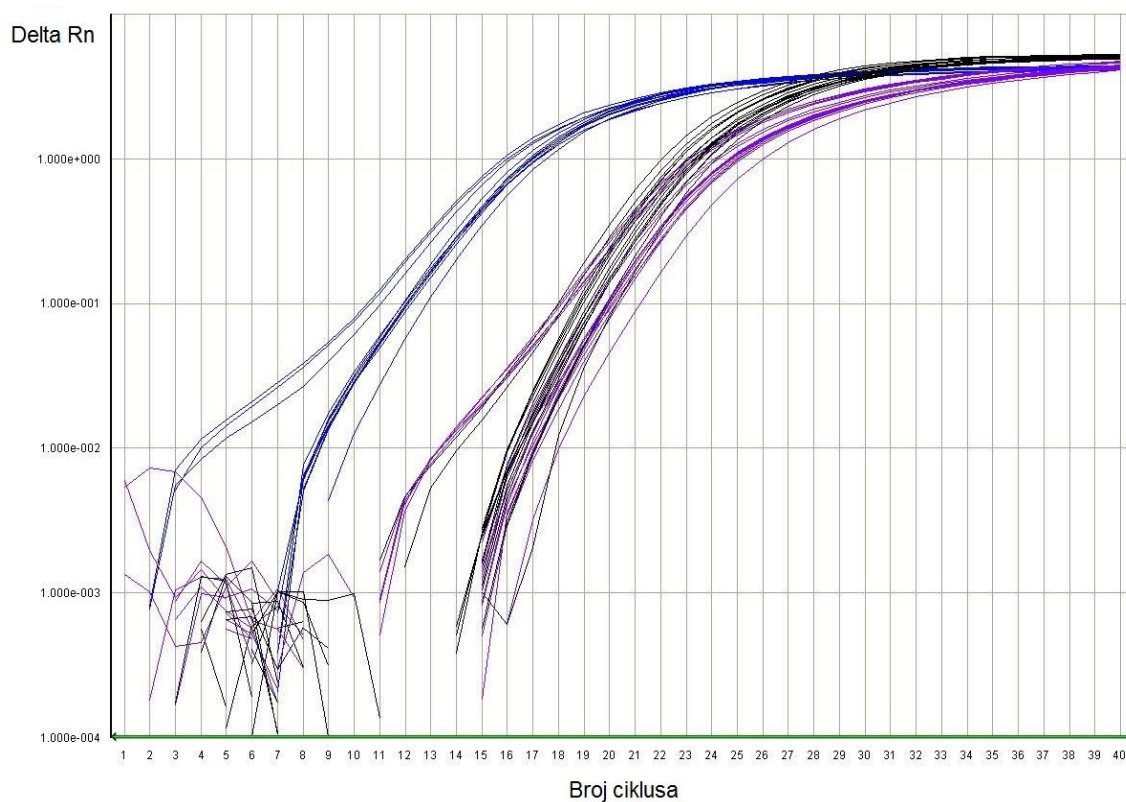
a) “Kros-spektralna” (CS) analiza CXCL16 i CXCR6: dominantna zajednička frekvencija iznosi 0,429. Vrednosti frekvencije dobijene Furijeovom transformacijom numeričkog niza potencijala interakcije elektron-jon (EIIP), koji odgovara aminokiselinskoj sekvenci proteina, su prikazane na apscisi u opsegu od 0,0 do 0,5. Vrednosti amplitude su izražene u arbitrarnim jedinicama koje odgovaraju frekvencijskim komponentama informacionog spektra i prikazane su na ordinati.

b) Relativna promena amplitude ( $\Delta A$ ) pri karakterističnoj frekvenciji od 0,429, u informacionim spektrima četiri polimorfne varijante CXCL16.

Informacioni spektri membranskog CXCL16 i CXCR6 su određeni, i “kros-spektralnim” filtriranjem je identifikovana zajednička Furijeova frekvencija od 0,429, koja je karakteristična za interakciju liganda i receptora (*slika R4 a*). Određene su vrednosti amplitude pri karakterističnoj zajedničkoj frekvenciji (0,429) za četiri proteinske varijante CXCL16 koje su kodirane od strane četiri odgovarajuća haplotipa. U odnosu na najčešću izoformu, I123A181, detektovane su značajne promene amplitude ( $\Delta A$ ) na frekvenciji 0,429 za preostale tri proteinske varijante CXCL16: I123V181, T123A181 i T123V181 (*slika R4 b*).

## 4.2. Ekspresija gena za CX3CL1, CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima, u patogenezi multiple skleroze

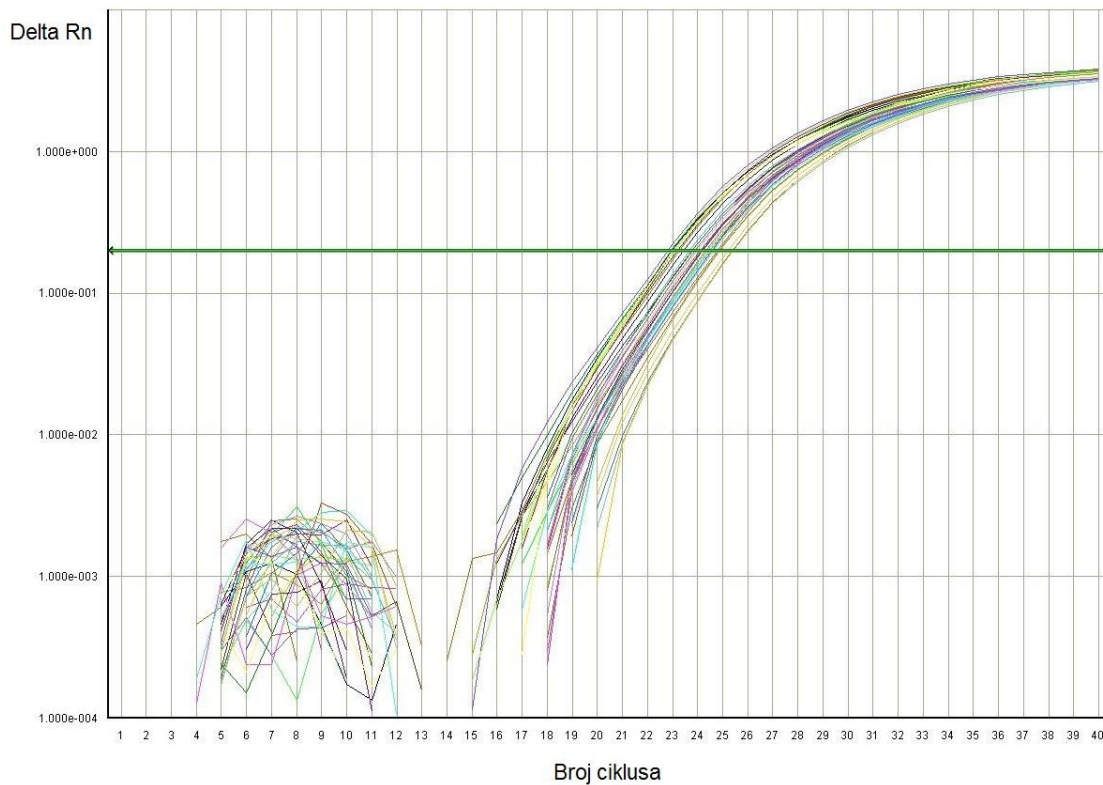
### 4.2.1. Izbor optimalne endogene kontrole za normalizaciju rezultata ekspresije ispitivanih ciljnih gena



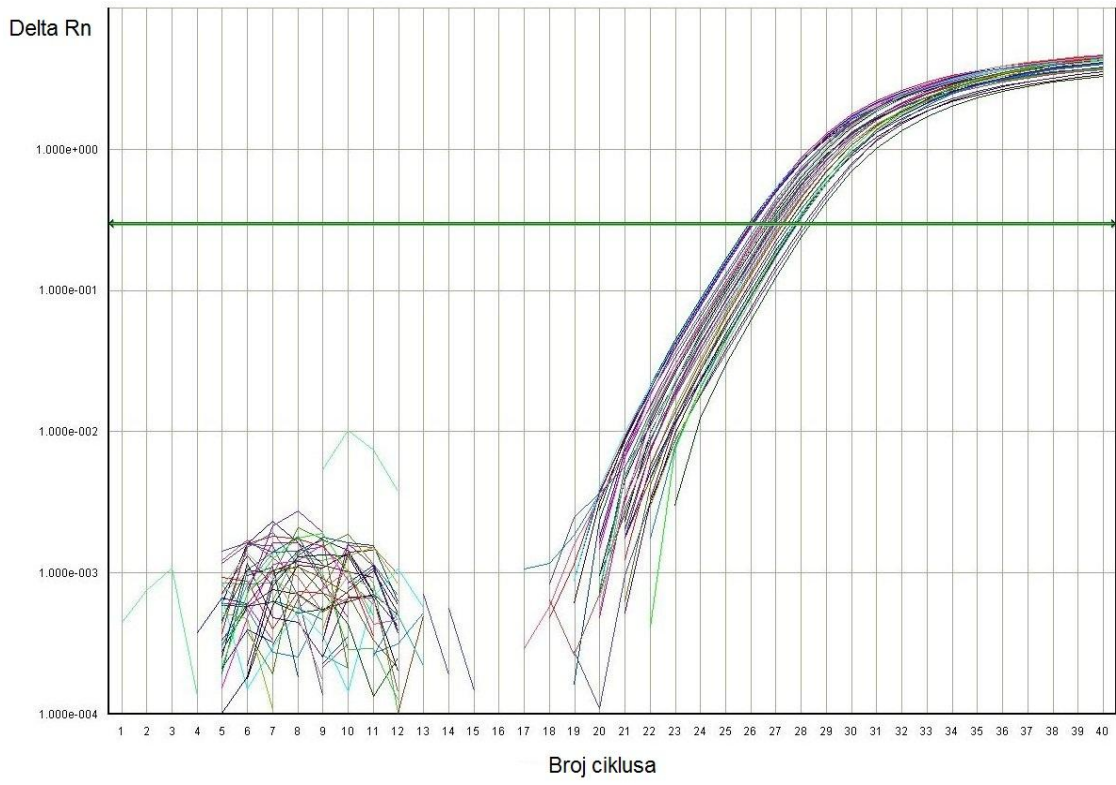
*Slika R5.* Prikaz amplifikacija iRNK (cDNK) testiranih endogenih kontrola u perifernim mononuklearnim leukocitima, metodom Real-time PCR: GAPDH (ljubičasto), CYCLA/PPIA (crno) i 18S rRNK (plavo).

Na slici R5 dat je logaritamski prikaz amplifikacije iRNK (cDNK), kao zavisnost delta Rn od broja ciklusa PCR, gena za: GAPDH (ljubičasto), CYCLA/PPIA (crno) i 18S rRNK (plavo), u mononuklearnim leukocitima periferne krvi kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, SDS software v1.4).

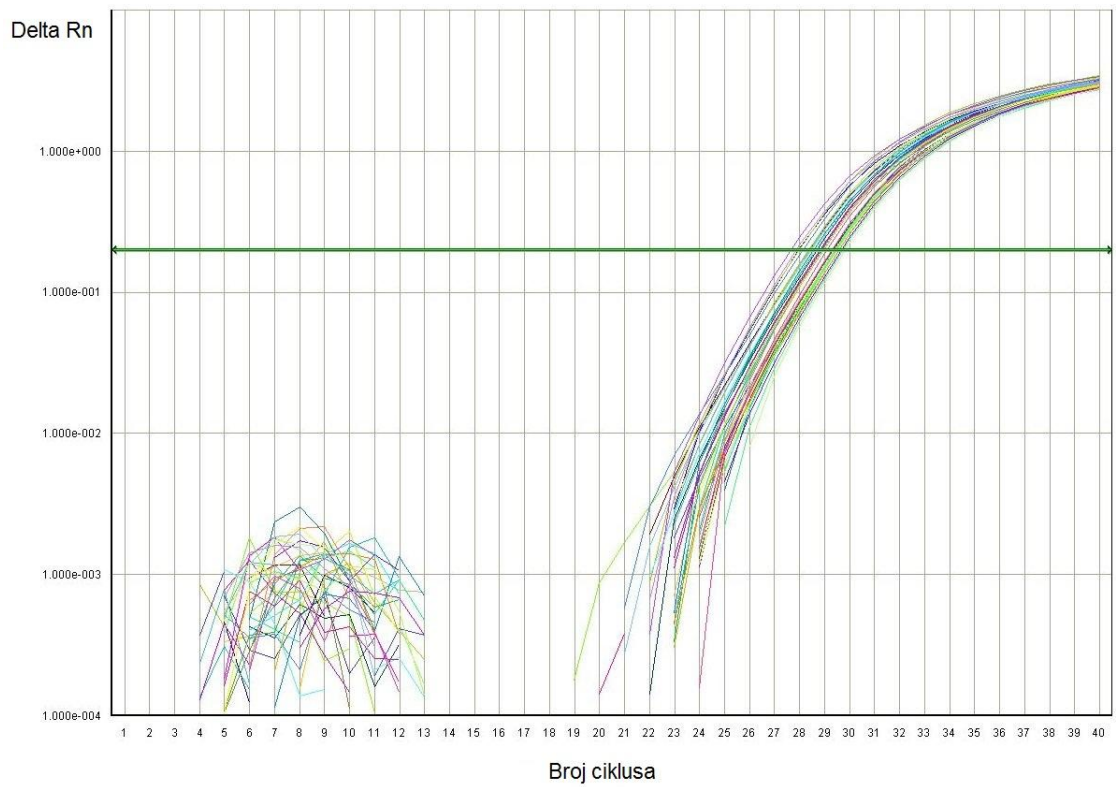
**a)**



**b)**



**c)**



*Slika R6.* Prikaz amplifikacija iRNK (cDNK) ispitivanih ciljnih gena u mononuklearnim leukocitima periferne krvi, metodom Real-time PCR: a) CX3CR1, b) CXCL16 i c) CXCR6.

Na *slici R6* prikazani su profili amplifikacije iRNK (cDNK) ciljnih gena za: a) CX3CR1, b) CXCL16 i c) CXCR6, u mononuklearnim leukocitima periferne krvi kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom. Na graficima je logaritamski prikaz amplifikacije, kao zavisnost delta Rn od broja ciklusa PCR. Zelena horizontalna linija predstavlja automatski podešen "threshold". Presek "threshold" linije sa eksponencijalnom fazom krive amplifikacije ciljne sekvence u analiziranom uzorku definiše vrednost Ct (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System, SDS software v1.4).

*Slika R5* i *slika R6* prikazuju profile amplifikacije iRNK (cDNK) testiranih endogenih kontrola (GAPDH, CYCLA i 18S rRNK) i ciljnih gena (CX3CR1, CXCL16 i CXCR6), dobijene metodom Real-time PCR, u uzorcima mononuklearnih leukocita periferne krvi kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom. U ispitanim uzorcima je detektovana amplifikacija iRNK svih ciljnih gena, osim gena za CX3CL1. Ispravnost eseja za kvantifikaciju ekspresije gena za CX3CL1 potvrđena je putem detekcije amplifikacije CX3CL1 iRNK u endotelnim ćelijama iz kulture, pošto je poznato da endotelne ćelije tipično eksprimiraju CX3CL1. Amplifikacija ciljnih iRNK je prikazana kao logaritamska zavisnost delta Rn od broja ciklusa PCR. Rn je "normalizovani reporter", koji predstavlja intenzitet fluorescentnog signala reporterske boje (kojom je obeležen 5' kraj *TaqMan*® probe) podeljen signalom pasivne referentne boje (ROX). Delta Rn predstavlja razliku Rn vrednosti eksperimentalne reakcije amplifikacije i Rn vrednosti bazalnog signala (*engl.* baseline) koji generiše instrument.

Tabela R8. Izbor optimalne endogene kontrole za normalizaciju rezultata ekspresije ciljnih gena:

a) određivanje vrednosti relativne ekspresije ( $2^{-\Delta Ct}$ ) gena za GAPDH, u uzorcima perifernih mononuklearnih leukocita, u grupama od po 8 kontrola i pacijenata sa relapsno-remitentnom formom multiple skleroze;

<b>Uzorak</b>	<b>Sr. Ct GAPDH</b>	<b><math>\Delta Ct</math> (sr. Ct – – sr. Ct min. u grupi)</b>	<b><math>2^{-\Delta Ct}</math> GAPDH</b>
kontrola 1	21,742	1,982	0,253139
kontrola 2	21,574	1,814	0,284401
kontrola 3	19,871	0,111	0,925946
kontrola 4	20,076	0,316	0,803294
kontrola 5	19,76	0	1
kontrola 6	20,838	1,078	0,473685
kontrola 7	20,094	0,334	0,793334
kontrola 8	20,173	0,413	0,75106
pacijent 1	22,681	1,681	0,311866
pacijent 2	21,798	0,798	0,575146
pacijent 3	21,444	0,444	0,735094
pacijent 4	21,451	0,451	0,731536
pacijent 5	21,356	0,356	0,781328
pacijent 6	21,388	0,388	0,764188
pacijent 7	21	0	1
pacijent 8	21,447	0,447	0,733567

b) određivanje vrednosti relativne ekspresije ( $2^{-\Delta Ct}$ ) gena za CYCLA, u uzorcima perifernih mononuklearnih leukocita, u grupama od po 8 kontrola i pacijenata sa relapsno-remitentnom formom multiple skleroze;

<b>Uzorak</b>	<b>Sr. Ct CYCLA</b>	<b><math>\Delta Ct</math> (sr. Ct – – sr. Ct min. u grupi)</b>	<b><math>2^{-\Delta Ct}</math> CYCLA</b>
kontrola 1	21,403	1,322	0,39998
kontrola 2	21,464	1,383	0,383421
kontrola 3	20,744	0,663	0,631564
kontrola 4	20,39	0,309	0,807201
kontrola 5	20,081	0	1
kontrola 6	20,81	0,729	0,603322
kontrola 7	21,862	1,781	0,290982
kontrola 8	20,631	0,55	0,68302
pacijent 1	22,189	1,189	0,438607
pacijent 2	21,151	0,151	0,900626
pacijent 3	21,403	0,403	0,756284
pacijent 4	21,861	0,861	0,550571
pacijent 5	21,486	0,486	0,714002
pacijent 6	21	0	1
pacijent 7	21,267	0,267	0,831046
pacijent 8	21,272	0,272	0,828171



c) određivanje vrednosti relativne ekspresije ( $2^{-\Delta Ct}$ ) gena za 18S, u uzorcima perifernih mononuklearnih leukocita, u grupama od po 8 kontrola i pacijenata sa relapsno-remitentnom formom multiple skleroze;

<b>Uzorak</b>	<b>Sr. Ct 18S</b>	<b><math>\Delta Ct</math> (sr. Ct – – sr. Ct min. u grupi)</b>	<b><math>2^{-\Delta Ct}</math> 18S</b>
kontrola 1	13,683	1,885	0,270744
kontrola 2	11,798	0	1
kontrola 3	13,311	1,513	0,350382
kontrola 4	13,769	1,971	0,255076
kontrola 5	12,49	0,692	0,618995
kontrola 6	13,779	1,981	0,253314
kontrola 7	13,863	2,065	0,238986
kontrola 8	13,933	2,135	0,227667
pacijent 1	14,429	2,619	0,162781
pacijent 2	14,123	2,313	0,201242
pacijent 3	13,521	1,711	0,305448
pacijent 4	13,611	1,801	0,286976
pacijent 5	11,81	0	1
pacijent 6	13,571	1,761	0,295044
pacijent 7	12,303	0,493	0,710546
pacijent 8	12,759	0,949	0,517991

d) određivanje vrednosti parametra “stability value”, koji odražava variranje genske ekspresije GAPDH, CYCLA i 18S unutar i između analiziranih grupa uzoraka, na osnovu dobijenih vrednosti  $2^{-\Delta Ct}$  za analizirane uzorke (korišćenjem programa NormFinder).

Gen	Unutargrupno variranje ekspresije		Međugrupno variranje ekspresije		“Stability value” (NormFinder)
	kontrole	pacijenti	kontrole	pacijenti	
<b>GAPDH</b>	0,057	0,008	0,016	-0,016	0,058
<b>CYCLA</b>	0,013	0,042	-0,038	0,038	<b>0,056</b>
<b>18S</b>	0,140	0,061	0,022	-0,022	0,110

Postupak za izbor optimalne endogene kontrole za normalizaciju rezultata ekspresije ciljnih gena je prikazan u *tabeli R8*. Vrednosti Ct su dobijene reakcijom amplifikacije cDNK endogenih kontrola, metodom Real-time PCR, u uzorcima perifernih mononukleara 8 zdravih kontrola i 8 pacijenata sa relapsno-remitentnom formom multiple skleroze. Vrednosti nivoa relativne ekspresije svake od tri testirane endogene kontrole (GAPDH, CYCLA i 18S) u svakom uzorku su određene kao  $2^{-\Delta Ct}$ , pri čemu je  $\Delta Ct$  razlika srednje vrednosti Ct (aritmetička sredina vrednosti Ct duplikata) pojedinačnog uzorka i minimalne srednje vrednosti Ct koju ima referentni uzorak, u datoj grupi kontrola tj. pacijenata (*tabela R8 a-c*). Na osnovu vrednosti  $2^{-\Delta Ct}$  za GAPDH, CYCLA i 18S u dve analizirane grupe, kontrola i pacijenata, u programu NormFinder su određene vrednosti parametra “stability value” koji odražava stabilnost odnosno variranje ekspresije ispitivanog gena unutar grupa i između grupa analiziranih uzoraka (*tabela R8 d*). Najmanje i međusobno najpribližnije vrednosti unutargrupne i međugrupne varijanse definišu najmanju “stability value” koja je, prema tome, karakteristična za najstabilnije ekspimirani gen kao optimalnu endogenu kontrolu (*tabela R8 d*). Na osnovu vrednosti parametra “stability value” dobijenih u programu NormFinder (*tabela R8 d*) i na osnovu poređenja profila amplifikacije testiranih

endogenih kontrola sa profilima amplifikacije ciljnih gena (*slika R5, slika R6*), ustanovljeno je da je CYCLA optimalna endogena kontrola za normalizaciju rezultata ekspresije ciljnih gena.

#### 4.2.2. Određivanje relativne ekspresije gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima kontrola i pacijenata sa relapsno-remitentnom formom multiple skleroze

*Tabela R9.* Osnovni demografski i klinički parametri grupa kontrola i pacijenata sa relapsno-remitentnom (RR) formom multiple skleroze.

<b>Parametar</b>	<b>Kontrole (n = 24)</b>	<b>Pacijenti, svi RR (n = 53)</b>	<b>Pacijenti u fazi relapsa (n=25)</b>	<b>Pacijenti u fazi remisije (n=28)</b>
<b>Pol (žene/muškarci)</b>	19/5	31/22	17/8	14/14
<b>Starost (godine)</b>	34,9 ± 10,0	34,1 ± 6,9	33,8 ± 8,2	34,3 ± 5,7
<b>Starost na početku bolesti (godine)</b>	-	29,2 ± 7,6	30,4 ± 7,9	28,3 ± 7,4
<b>Trajanje bolesti (godine)</b>	-	5,0 ± 5,6	3,9 ± 3,9	5,9 ± 6,5
<b>EDSS</b>	-	2,1 ± 1,0	1,8 ± 0,8	2,4 ± 1,1
<b>MSSS</b>	-	4,2 ± 2,1	3,7 ± 2,0	4,5 ± 2,1
<b>Učestalost relapsa (broj relapsa/trajanje bolesti)</b>	-	0,9 ± 0,6	0,9 ± 0,5	1,0 ± 0,7

n - ukupan broj kontrola/pacijenata; vrednosti kontinualnih parametara su predstavljene kao srednja vrednost ± standardna devijacija (SD).

U tabeli R9 su prikazani relevantni parametri za kontrolnu grupu (pol, starost) i grupu pacijenata sa relapsno-remitentnom formom multiple skleroze (pol, starost, starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS, MSSS, učestalost relapsa), u okviru kojih je urađena analiza relativne ekspresije gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6. Srednja vrednost godina starosti kontrola i pacijenata iznosi približno 34 godine. U celokupnoj grupi pacijenata (kao i u grupi kontrola) odnos broja žena i muškaraca je preko 1,4, što je u skladu sa činjenicom da je multipla skleroza češća kod žena.

*Tabela R10.* Relativna ekspresija ciljnih gena u perifernim mononuklearnim leukocitima kontrola i pacijenata sa multiplom sklerozom:

a) vrednosti nivoa ekspresije gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6, normalizovanih na endogenu kontrolu (CYCLA), u grupama zdravih kontrola i pacijenata sa RR formom multiple skleroze

<b>Genska ekspresija</b>	<b>Kontrole (n=24)</b>	<b>Pacijenti, svi RR (n=53)</b>	<b>Pacijenti u fazi relapsa (n=25)</b>	<b>Pacijenti u fazi remisije (n=28)</b>
<b>Sr <math>2^{-\Delta Ct}</math> CX3CR1</b>	0,07121	0,09589	0,10325	0,08932
Stdev $2^{-\Delta Ct}$ CX3CR1	0,03301	0,03948	0,04366	0,03482
Stgr $2^{-\Delta Ct}$ CX3CR1	0,00674	0,00542	0,00873	0,00658
<b>Sr <math>2^{-\Delta Ct}</math> CXCL16</b>	0,01457	0,02012	0,01710	0,02282
Stdev $2^{-\Delta Ct}$ CXCL16	0,00940	0,01046	0,01032	0,00999
Stgr $2^{-\Delta Ct}$ CXCL16	0,00192	0,00144	0,00206	0,00189
<b>Sr <math>2^{-\Delta Ct}</math> CXCR6</b>	0,00261	0,00260	0,00310	0,00216
Stdev $2^{-\Delta Ct}$ CXCR6	0,00151	0,00113	0,00112	0,00096
Stgr $2^{-\Delta Ct}$ CXCR6	0,00031	0,00016	0,00022	0,00018

vrednosti ekspresije svakog gena su prikazane kao: srednja vrednost svih uzoraka grupe (sr  $2^{-\Delta Ct}$ ), standardna devijacija srednje vrednosti svih uzoraka grupe (stdev  $2^{-\Delta Ct}$ ) i standardna greška srednje vrednosti svih uzoraka grupe (stgr  $2^{-\Delta Ct}$ ); za svaki uzorak se

određuju:  $2^{-\Delta Ct}$  (pri čemu  $\Delta Ct = srCt(\text{ciljni gen}) - srCt(\text{endogena kontrola})$ ), standardna devijacija za  $2^{-\Delta Ct}$  i standardna greška za  $2^{-\Delta Ct}$ ; n - broj kontrola/pacijenata;

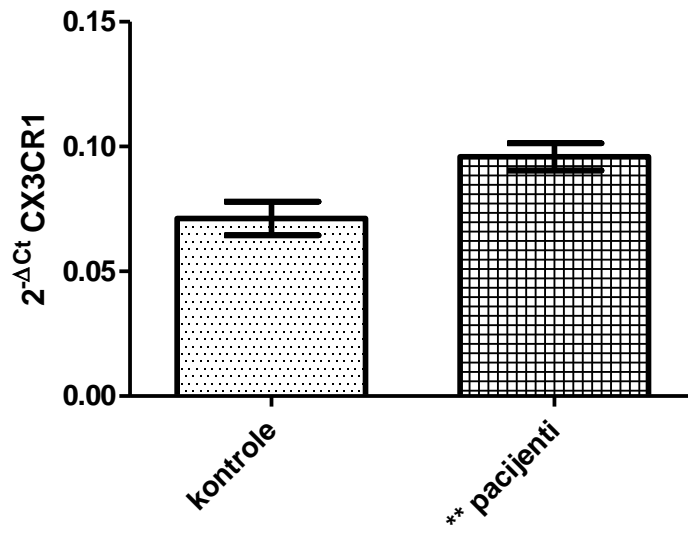
b) statistička analiza rezultata relativne genske ekspresije: poređenje vrednosti nivoa ekspresije gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 između odgovarajućih ciljnih grupa

p (Mann-Whitney U test)	Sr $2^{-\Delta Ct}$	Sr $2^{-\Delta Ct}$	Sr $2^{-\Delta Ct}$
	CX3CR1	CXCL16	CXCR6
<b>Kontrole / pacijenti svi (u relapsu i remisiji)</b>	<b>0,0042 **</b>	<b>0,0094 **</b>	0,6402
<b>Kontrole / pacijenti u relapsu</b>	<b>0,0038 **</b>	0,4009	0,0873
<b>Kontrole / pacijenti u remisiji</b>	<b>0,0332 *</b>	<b>0,0004 ***</b>	0,4299
<b>Pacijenti u relapsu / pacijenti u remisiji</b>	0,2027	<b>0,0182 *</b>	<b>0,0017 **</b>

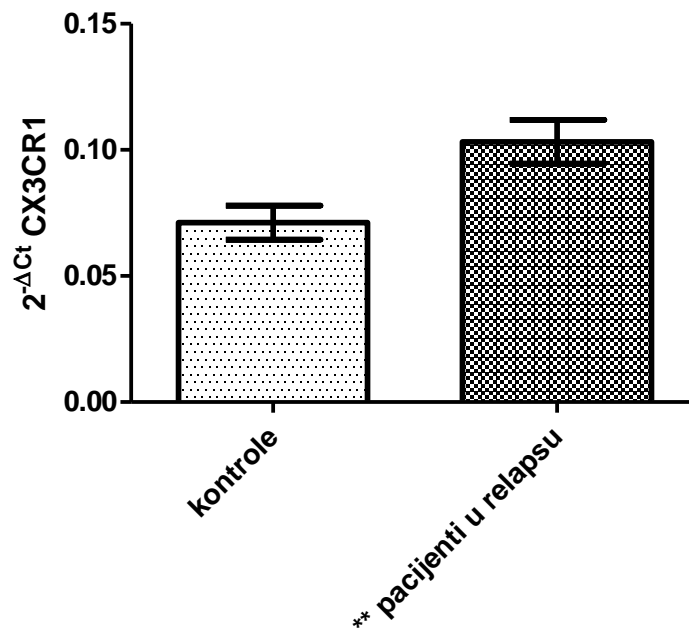
statistički značajnu razliku određuju vrednosti p (Mann-Whitney U test)  $<0,05$ ; asterisk (\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,05$ , dvostruki asterisk (\*\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,01$ , trostruki asterisk (\*\*\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,001$ .

Nakon kvantifikacije genske ekspresije, dobijene vrednosti su upoređene između odgovarajućih ciljnih grupa uzoraka i utvrđeno je da postoje značajne razlike relativnih nivoa ekspresije gena za: - CX3CR1 između kontrola i cele analizirane grupe pacijenata (u relapsu i remisiji), između kontrola i pacijenata u relapsu i između kontrola i pacijenata u remisiji; - CXCL16 između kontrola i pacijenata u remisiji i između pacijenata u relapsu i pacijenata u remisiji; - CXCR6 između pacijenata u relapsu i pacijenata u remisiji (Mann-Whitney U test,  $p < 0,05$ ) (tabela R10). Rezultati sa stitistički značajnom razlikom, u okviru analiziranih grupa uzoraka, su grafički prikazani (prikazane su srednje vrednosti  $2^{-\Delta Ct}$  sa opsegom standardne greške, za svaku analiziranu grupu); u opisu svakog grafika navedeni su statistički parametar p (Mann-Whitney U test) i razlika srednjih vrednosti genske ekspresije između grupa, koja pokazuje koliko je puta ekspresija ispitivanog gena viša/niša u ciljnoj grupi u odnosu na referentnu grupu uzoraka - *engl.* fold change (slika R7).

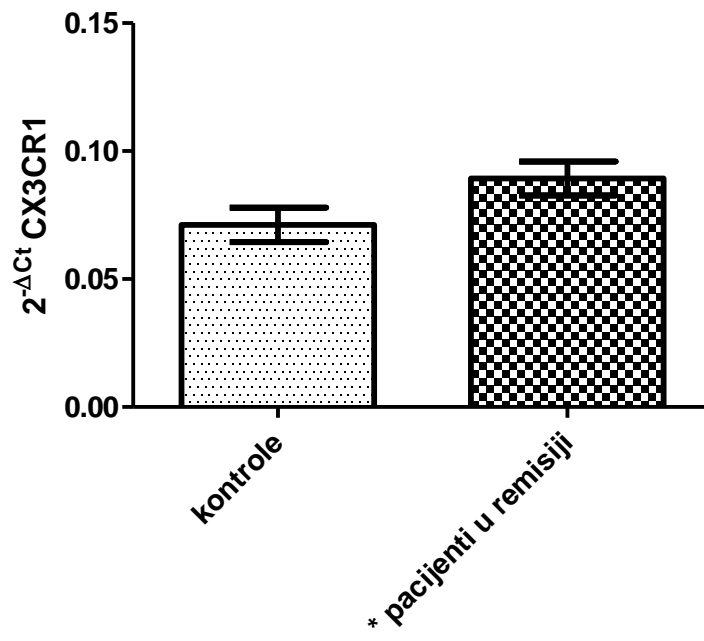
a)



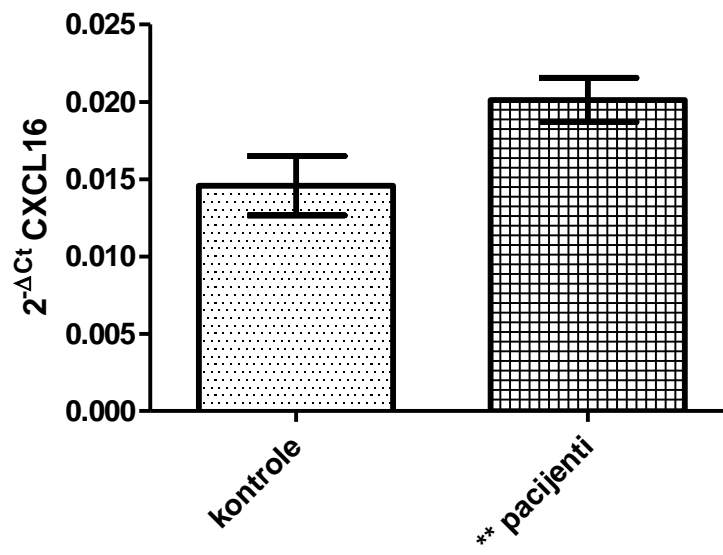
b)



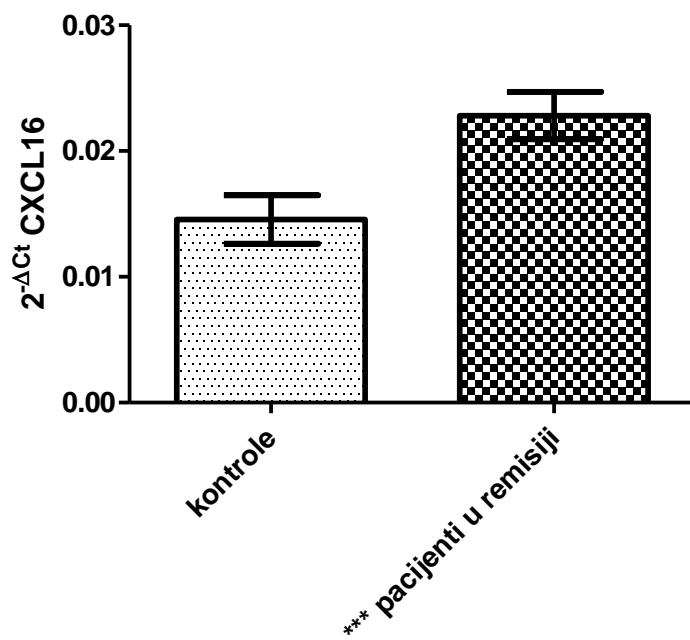
c)



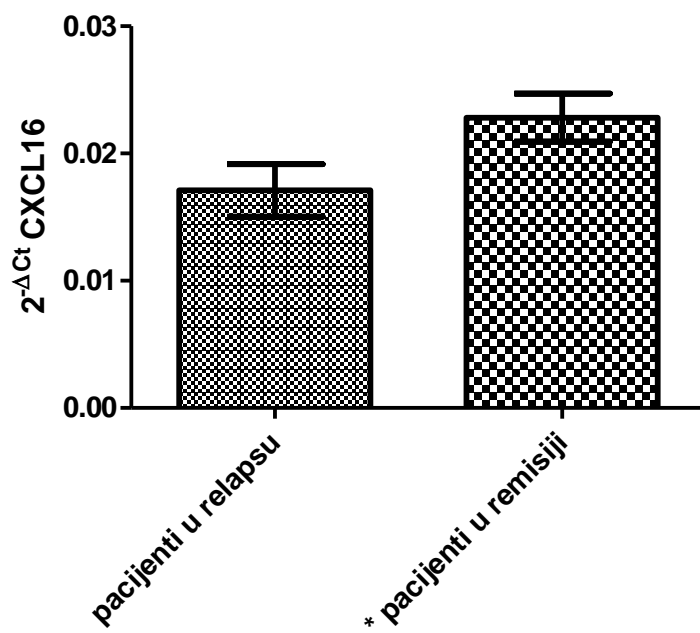
d)



e)

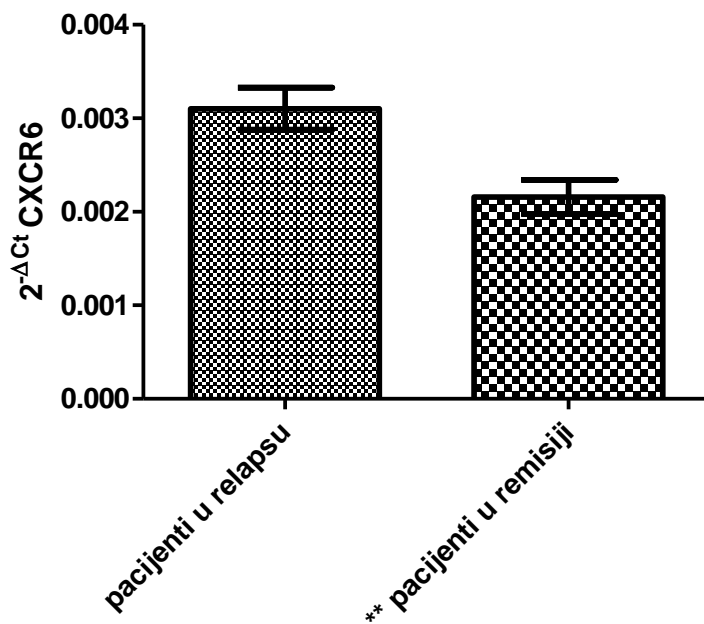


f)





g)



Slika R7. Prikaz statistički značajnih rezultata kvantifikacije ekspresije ispitanih gena:

- a) nivo ekspresije gena za CX3CR1 je 1,3 puta viši u celoj grupi pacijenata (u relapsu i remisiji) u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,0042^{**}$ , “fold change”= +1,3 puta);
- b) nivo ekspresije gena za CX3CR1 je 1,4 puta viši u grupi pacijenata u relapsu u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,0038^{**}$ , “fold change”= +1,4 puta);
- c) nivo ekspresije gena za CX3CR1 je 1,2 puta viši u grupi pacijenata u remisiji u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,0332^*$ , “fold change”= +1,2 puta);
- d) nivo ekspresije gena za CXCL16 je 1,4 puta viši u celoj grupi pacijenata (u relapsu i remisiji) u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,0094^{**}$ , “fold change”= +1,4 puta);
- e) nivo ekspresije gena za CXCL16 je 1,6 puta viši u grupi pacijenata u remisiji u odnosu na kontrolnu grupu ( $p=0,0004^{***}$ , “fold change”= +1,6 puta);
- f) nivo ekspresije gena za CXCL16 je 1,3 puta viši u grupi pacijenata u remisiji u odnosu na grupu pacijenata u relapsu ( $p=0,0182^*$ , “fold change”= +1,3 puta);
- g) nivo ekspresije gena za CXCR6 je 1,4 puta niži u grupi pacijenata u remisiji u odnosu na grupu pacijenata u relapsu ( $p=0,0017^{**}$ , “fold change”= -1,4 puta);

asterisk (\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,05$ , dvostruki asterisk (\*\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,01$ , trostruki asterisk (\*\*\*) predstavlja statističku značajnost kada je  $p < 0,001$ .

Nisu utvrđene značajne korelacije između vrednosti kliničkih parametara (EDSS, MSSS, učestalost relapsa) i nivoa ekspresije gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6, kod pacijenata u relapsu odnosno remisiji (Product-moment and partial correlations,  $p > 0,05$ ) (rezultati nisu prikazani). U podgrupama pacijenata u relapsu i pacijenata u remisiji, nivoi relativne ekspresije gena za CX3CR1 se ne razlikuju značajno u odnosu na genotipove polimorfizama V249I i T280M, niti ima značajnih razlika u nivoima ekspresije gena za CXCL16 u odnosu na genotipove polimorfizama I123T i A181V (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p > 0,05$ ) (rezultati nisu prikazani). Svi prikazani rezultati određivanja nivoa relativne ekspresije ciljnih gena naknadno su provereni i potvrđeni analizom u kompjuterskom programu REST08.

## **5. DISKUSIJA**

### **5.1. Polimorfizmi u genima za CX3CR1 i CXCL16 u nastanku i progresiji multiple skleroze**

#### **5.1.1. Polimorfizmi V249I i T280M u genu za CX3CR1**

Polimorfizmi V249I i T280M u četvrtom egzonu gena za CX3CR1 su asocirani sa nastankom i/ili progresijom hroničnih inflamatornih bolesti kao što su ateroskleroza, Kronova bolest i hronična insuficijencija bubrega (Apostolakis i sar., 2007; Zhao i sar., 2010; Debette i sar., 2009; McDermott i sar., 2001; Moatti i sar., 2001; Apostolakis i sar., 2009; Sabate i sar., 2008; Borkar i sar., 2011). Rezultati navedenih studija nisu konzistentni u pogledu efekata pojedinačnih alela/genotipova/haplotipova ovih polimorfizama na nastanak i klinički tok izučavanih bolesti. Pored naše studije (Stojković i sar., 2012), uloga polimorfizama V249I i T280M u patogenezi multiple skleroze do sada je analizirana samo u još jednoj studiji gena kandidata (Arl i sar., 2013) i jednoj studiji GWAS (IMSGC & VTCCC2, 2011). Slično rezultatima preostale dve studije, nismo pronašli asocijaciju genotipova niti alela dvaju polimorfizama u genu za CX3CR1 sa rizikom za nastanak multiple skleroze. U studiji GWAS nije utvrđena asocijacija ovih polimorfizama ni sa kliničkim tokom multiple skleroze (IMSGC & VTCCC2, 2011). U našoj studiji srednje vrednosti kliničkih parametara (starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS i MSSS) nisu značajno različite između nosilaca različitih genotipova polimorfizama V249I i T280M u analiziranoj grupi pacijenata. Takođe, nema značajne razlike učestalosti genotipova i alela polimorfizama V249I i T280M između podgrupe pacijenata sa relapsno-remitentnom i podgrupe sa sekundarno-progresivnom formom multiple skleroze. Postoji nešto veća učestalost alela I kod RR u odnosu na SP pacijente i statistički trend da pacijenti nosioci alela I (u odnosu na nosioce češćeg alela, V) imaju manju šansu za progresiju RR u SP formu multiple skleroze. U analizi polimorfizma V249I, Arli i sar. su

detektovali značajno veću učestalost genotipa VI nego II kod RR pacijenata, dok su SP pacijenti imali veću učestalost genotipa VV nego VI.

U analiziranoj grupi zdravih kontrolnih ispitanika iz Srbije učestalosti alela polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 su približne vrednostima dobijenim u drugim kavkazijanskim populacijama ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3732379](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3732379), [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3732378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3732378)). U srpskoj populaciji je detektovan izraženi “linkage disequilibrium” (*skr.* LD) (neravnoteža vezanosti) između V249I i T280M polimorfizama, što je u skladu sa rezultatima prethodnih studija (Faure i sar., 2000). Regioni sa visokim LD potencijalno olakšavaju nalaženje asocijacije gena (alela) sa patogenezom poligenских bolesti. Shodno postojanju značajnog LD između polimorfizama V249I i T280M, u analiziranim grupama kontrola i pacijenata je procenjeno prisustvo tri dominantna haplotipa:  $V_{249}T_{280}$ ,  $I_{249}M_{280}$ ,  $I_{249}T_{280}$ , i jednog retkog haplotipa,  $V_{249}M_{280}$  (haplotip  $V_{249}M_{280}$  nije statistički analiziran zbog niske frekvencije, <1%). Efekti haplotipova  $I_{249}M_{280}$  i  $I_{249}T_{280}$  na nastanak i progresiju multiple skleroze su analizirani u odnosu na najčešći haplotip,  $V_{249}T_{280}$  (sačinjen od češćih alela oba polimorfizma). Nijedan od haplotipova nije asociran sa rizikom za nastanak multiple skleroze. U poređenju sa studijama vezanim za druge hronične inflamatorne bolesti, naš rezultat je saglasan sa rezultatom haplotipske analize u studiji u kojoj je izučavana koronarna bolest (Matzhold i sar., 2009). U izvesnim studijama je pokazan protektivni uticaj haplotipa  $I_{249}M_{280}$ . Tako je u meta-analizi utvrđena značajno veća učestalost  $I_{249}M_{280}$  kod kontrola u odnosu na pacijente sa koronarnom bolešću (Apostolakis i sar., 2009). U drugoj studiji, samo nosioci haplotipa  $I_{249}M_{280}$  su imali smanjeni rizik za rekurentne glavobolje koje su posledica neuroinflamacije i oštećenja vaskularne funkcije (Combadiere i sar., 2008). U okviru naše studije, haplotipskom analizom utvrđena je značajno niža frekvencija haplotipa  $I_{249}T_{280}$  kod SP pacijenata u odnosu na RR pacijente, što znači da RR pacijenti nosioci ovog haplotipa imaju značajno manju šansu za progresiju u SP formu bolesti. Dakle, naši rezultati ukazuju na zaštitni efekat haplotipa  $I_{249}T_{280}$  na prelazak iz RR forme u SP fazu multiple skleroze. Haplotipovi ne utiču na brzinu kontinuirane progresije bolesti, jer nisu značajno asocirani sa vrednostima kliničkih parametara pacijenata, kao što je MSSS.

Strukturna analiza je pokazala da polimorfizmi V249I i T280M indukuju detektabilne konformacione promene u receptorskim domenima TM6 i TM7 u kojima se nalaze, kao i trećoj vanćelijskoj petlji koja spaja TM6 i TM7 (Darbandi-Tehrani i sar., 2010). Uzimajući u obzir ovu činjenicu i podatak da aminokiseline koje ulaze u sastav treće vanćelijske petlje receptora utiču na afinitet vezivanja CX3CL1 (Chen i sar., 2006), u našoj studiji je od značaja i bioinformatička analiza predviđanja efekata polimorfizama V249I i T280M na interakciju CX3CR1-CX3CL1. Dobijeni rezultati analize informacionih spektara predviđaju da polimorfne varijante I249T280 i V249M280 CX3CR1 (kodirane od strane haplotipova I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> i V<sub>249</sub>M<sub>280</sub>) mogu najviše menjati interakciju CX3CR1-CX3CL1 i da su njihovi efekti suprotni, s obzirom da vrednosti  $\Delta A(0,037)$  za I249T280 i V249M280 imaju suprotan predznak. Pošto haplotip V<sub>249</sub>M<sub>280</sub> praktično ne postoji u populaciji (njegova učestalost je manja od 1%), sledi da haplotip I<sub>249</sub>T<sub>280</sub>, preko proteinske varijante CX3CR1 koju kodira, značajno menja interakciju CX3CR1-CX3CL1, u odnosu na najčešću izoformu tj. haplotip V<sub>249</sub>T<sub>280</sub> CX3CR1. Ovaj rezultat se može povezati sa utvrđenim efektom haplotipa I<sub>249</sub>T<sub>280</sub> na tok multiple skleroze. Rezultati naše analize informacionih spektara sugerišu da između varijante I249M280 i najčešće izoforme CX3CR1, V249T280, ne postoji značajna razlika u uspostavljanju interakcije sa ligandom. U skladu sa ovim je i rezultat funkcionalne studije koja je pokazala da V249T280 i I249M280 varijante CX3CR1 imaju podjednak kapacitet vezivanja solubilnog CX3CL1 (Daoudi i sar., 2004). Izvesne studije pokazuju da haplotip I<sub>249</sub>M<sub>280</sub> ima protektivnu ulogu u pogledu rizika za nastanak određenih hroničnih inflamatornih bolesti (Apostolakis i sar., 2009). Rezultati naše i prethodnih studija (Combadiere i sar., 2008; Apostolakis i sar., 2009) sugerišu moguću zaštitnu ulogu alela I polimorfizma V249I u nastanku i progresiji inflamatornih bolesti, koja zavisi od haplotipske pozadine ovog alela. U ovoj studiji, detektovali smo trend smanjene frekvencije alela I kod SP u odnosu na RR pacijente. U haplotipskoj analizi ovaj alel ima značajno drugačiji efekat na prelazak RR u SP formu bolesti, u zavisnosti od haplotipske pozadine. U haplotipskoj pozadini sa alelom T280, alel I249 je pokazao značajan zaštitni uticaj na prelazak u SP formu bolesti u odnosu na alel V249. U studiji Arli i sar., takođe je sugerisana potencijalna zaštitna uloga alela I u sekundarnoj progresiji bolesti, kada je u heterozigotnom obliku, VI. Naime, u okviru ciljne grupe od 92 pacijenta sa multiplom

sklerozom detektovana je predominantna učestalost genotipa VI kod RR pacijenata, dok su SP pacijenti imali veću učestalost genotipa VV u odnosu na VI (Arli i sar., 2013). Zaštitni efekti alela I mogu biti povezani sa strukturno-funkcionalnim promenama ili promenama nivoa ekspresije CX3CR1, koje mogu da utiču na progresiju inflamatornog procesa. Značajno manja gustina vezivnih mesta za CX3CL1 je uočena na perifernim mononuklearnim leukocitima osoba nosilaca alela I u heterozigotnom obliku, kao kombinacije genotipova VI-TT ili VI-TM, u odnosu na leukocite nosilaca genotipova VV i TT. Na ovaj način se možda smanjuje CX3CR1-posredovana adhezija monocita za aktivirane endotelne ćelije koje ekspimiraju CX3CL1, pa je ovo jedan od potencijalnih mehanizama koji dovode do smanjenja progresije inflamacije (Moatti i sar., 2001). Leukociti homozigota MM koji su istovremeno nosioci genotipa VI ili II, imaju defektnu hemotaksiju u odgovoru na solubilni CX3CL1 (McDermott i sar., 2003), što takođe može uticati na smanjenje intenziteta inflamacije. Međutim, slično rezultatima genetskih studija asocijacije, i rezultati studija o funkcionalnim efektima polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 su nekonzistentni (Moatti i sar., 2001; McDermott i sar., 2003; Daoudi i sar., 2004), te su dalja istraživanja neophodna.

### **5.1.2. Polimorfizmi I123T i A181V u genu za CXCL16**

U našoj studiji polimorfizmi I123T i A181V u četvrtom egzonu gena za CXCL16 su prvi put analizirani u asocijaciji sa multiplom sklerozom. U ukupnoj grupi kontrola detektovana je veća učestalost homozigota za češće alele oba polimorfizma (II i AA), nego u ukupnoj grupi pacijenata. Učestalosti genotipova koji sadrže ređe alele ovih polimorfizama, T i V, su značajno veće kod pacijenata u odnosu na kontrole. Zdravi nosioci alela T (tj. genotipova IT i TT) i alela V (prevažodno u homozigotnom obliku, VV) imaju značajno veću šansu za oboljevanje od multiple skleroze, u odnosu na osobe koje nisu nosioci navedenih alela (genotipova). Shodno tome, polimorfizmi I123T i A181V u genu za CXCL16 su određeni kao genetski faktori rizika za nastanak multiple skleroze. U ukupnoj grupi pacijenata srednje vrednosti kliničkih parametara (starost na početku bolesti, trajanje bolesti, EDSS i MSSS) nisu značajno asociirane sa genotipovima polimorfizama I123T i A181V, niti postoji značajna razlika u distribuciji genotipova između pacijenata sa RR i SP formom multiple skleroze. Ovi rezultati

ukazuju na to da genski polimorfizmi I123T i A181V nisu faktori rizika za progresiju multiple skleroze. U dosadašnjim istraživanjima u oblasti patogeneze hroničnih inflamatornih bolesti analizirani su efekti polimorfizma A181V na nastanak i progresiju ateroskleroze i Kronove bolesti. U ovim studijama, za razliku od naše, nije utvrđena asocijacija ređeg alela V tj. homozigota VV sa nastankom bolesti, ali jeste sa progresijom bolesti (Petit i sar., 2011; Lundberg i sar., 2005; Wang i sar., 2010; Seiderer i sar., 2008). Pacijenti sa koronarnom bolešću koji su nosioci alela V imali su povećan stepen stenozе koronarnih arterija (Lundberg i sar., 2005), dok je genotip VV bio asociran sa težom kliničkom slikom Kronove bolesti (Seiderer i sar., 2008). Funkcionalni efekti zamene A181V nisu u potpunosti rasvetljeni. S obzirom da u strukturi transmembranskog CXCL16 ovaj polimorfizam rezultuje zamenom aminokiseline locirane u blizini ćelijske membrane (Petit i sar., 2011), postoji mogućnost da on utiče na proteolitičko sečenje CXCL16 i, samim tim, na odnos nivoa solubilne i transmembranske forme hemokina. Poznato je da solubilni CXCL16 stimuliše inflamatorni proces putem stimulacije regrutovanja leukocita u tkiva (Galkina i sar., 2007; Fukumoto i sar., 2004), te da povišeni nivo solubilnog CXCL16 može biti pokazatelj inflamatornog procesa u patogenezi određenih bolesti među kojima je i multipla skleroza (Yi i sar., 2008; Ueland i sar., 2012; van der Voort i sar., 2005; le Blanc i sar., 2006).

U ciljnoj grupi kontrolnih ispitanika iz Srbije učestalosti alela polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 su približne vrednostima u drugim kavkazijanskim populacijama ([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1050998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1050998), [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2277680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2277680)). HapMap podaci pokazuju da su polimorfizmi I123T i A181V u apsolutnom LD (International HapMap Consortium, 2003). I za srpsku populaciju se može reći da su ovi polimorfizmi u apsolutnom LD, pošto vrednosti statističkog parametra  $D'$  dobijene u ovoj studiji iznose približno 1. Zato je u analiziranim grupama ispitanika procenjeno prisustvo samo dva predominantna haplotipa,  $I_{123}A_{181}$  i  $T_{123}V_{181}$ , koji su statistički analizirani (frekvencije preostala dva,  $T_{123}A_{181}$  i  $I_{123}V_{181}$ , iznose 0-1%). Takođe, preko apsolutnog LD se objašnjava i specifična distribucija genotipova i alela oba polimorfizma unutar svake pojedinačne grupe/podgrupe kontrola/pacijenata: približno ili potpuno identične učestalosti imaju parovi genotipova II i AA, IT i AV, TT i VV, kao i parovi alela I i A,

T i V. Efekti haplotipa  $T_{123}V_{181}$  na rizik za nastanak multiple skleroze i njenu progresiju su procenjeni u odnosu na najčešći haplotip,  $I_{123}A_{181}$ , kao referentni. U odnosu na kontrole, kod kojih je učestaliji haplotip  $I_{123}A_{181}$ , pacijenti imaju značajno veću učestalost haplotipa  $T_{123}V_{181}$ . To znači da je haplotip  $T_{123}V_{181}$  faktor rizika za nastanak multiple skleroze tj. da zdravi nosioci haplotipa  $T_{123}V_{181}$  imaju značajno veću šansu da obole, u odnosu na nosioce referentnog haplotipa  $I_{123}A_{181}$ . Haplotipovi polimorfizama I123T i A181V nisu povezani sa rizikom za progresiju multiple skleroze, jer unutar cele grupe pacijenata vrednosti kliničkih parametara nisu značajno različite između nosilaca različitih haplotipova, niti postoji značajna razlika u distribuciji haplotipova između pacijenata sa RR i SP formom bolesti. Rezultati haplotipske analize su, naravno, u skladu sa analizom genotipova i alela, u kojoj su aleli T i V definisani kao faktori rizika za nastanak multiple skleroze.

Efekti genotipova, alela i haplotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 su analizirani i u odnosu na pol. Žene sa multiplom sklerozom imaju značajno veće frekvencije heterozigota oba polimorfizma, IT i AV. Zdrave žene koje nose ređe alele oba polimorfizma u heterozigotnom obliku imaju oko dva puta veću šansu da obole od multiple skleroze, u odnosu na žene nosioce referentnih homozigotnih genotipova, II i AA. Nije utvrđena polno zavisna asocijacija genotipova, ni sa progresijom bolesti ni sa njenim tokom. Zdrave žene nosioci haplotipa  $T_{123}V_{181}$  imaju značajno veću šansu da obole od multiple skleroze, u odnosu na one koje nose referentni haplotip  $I_{123}A_{181}$ . Ovaj rezultat je saglasan sa rezultatom analize haplotipova u celom uzorku kontrola i pacijenata u ovoj studiji. Haplotip  $T_{123}V_{181}$  je faktor rizika za nastanak multiple skleroze, kako u čitavoj analiziranoj grupi uzoraka, tako i u izdvojenoj grupi ispitanika ženskog pola. U celoj grupi pacijenata porast učestalosti haplotipa  $T_{123}V_{181}$  je rezultat većeg broja nosilaca homozigota TT i VV, u odnosu na kontrolne subjekte. Međutim, kod žena porast učestalosti haplotipa  $T_{123}V_{181}$  je pretežno posledica velikog broja pacijentkinja nosilaca oba heterozigotna genotipa, IT i AV, u odnosu na žene kontrole.

Poznato je da se interakcija CXCL16-CXCR6 ostvaruje preko hemokinskog domena CXCL16 (Liu i sar., 2011). S obzirom da se polimorfizmi I123T i A181V nalaze na suprotnim krajevima mucinskog domena CXCL16 i da je utvrđeno da upravo struktura mucinskog domena utiče na konformaciju hemokinskog domena CXCL16



(Petit i sar., 2008), u našoj studiji je od značaja bioinformatička analiza predviđanja mogućih efekata polimorfizama I123T i A181V na interakciju transmembranske forme CXCL16 sa CXCR6. Rezultati analize informacionih spektara predviđaju da polimorfna varijanta T123V181 CXCL16 (kodirana od strane haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>) značajno menja interakciju CXCL16-CXCR6, u odnosu na najčešću izoformu I123A181 tj. haplotip I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> CXCL16. Naši rezultati bioinformatičke analize se mogu dovesti u vezu sa procenjenim uticajem haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> na rizik za nastanak multiple skleroze, preko do sada poznatih funkcionalnih efekata polimorfizama I123T i A181V. U jednoj studiji je urađena *in vitro* i *ex vivo* funkcionalna analiza koja je otkrila da najčešća izoforma CXCL16, I123A181, poseduje sve tri funkcionalne karakteristike-funkciju receptora “čistača” za oxLDL i sposobnosti da indukuje hemotaksiju i adheziju CXCR6+ ćelija (Petit i sar., 2011). Razlika između I123A181 i T123V181 CXCL16 je nedostatak adhezivnog svojstva, pripisan varijanti T123V181. U ovoj funkcionalnoj studiji je pokazano da prisustvo V na poziciji 181, bilo u T123V181 ili I123V181 konstrukt, rezultuje gubitkom svojstva adhezije (Petit i sar., 2011). Pošto je u našoj studiji utvrđeno da su aleli T i V i haplotip T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> asocirani sa povećanim rizikom za nastanak multiple skleroze u analiziranoj grupi pacijenata, a zna se da varijantu T123V181 CXCL16 odlikuje odsustvo svojstva adhezije (Petit i sar., 2011), verovatno je da potencijalno izmenjena funkcija hemotaksije i/ili funkcija CXCL16 kao receptora “čistača” doprinosi patogenezi multiple skleroze. U skladu sa ovom pretpostavkom su i rezultati funkcionalne studije koji pokazuju da u patogenezi eksperimentalnog modela multiple skleroze CXCL16 ima važnu ulogu da stimuliše hemotaksiju i regrutovanje mononuklearnih leukocita u CNS (Fukumoto i sar., 2004).

U odnosu na celokupnu grupu pacijenata, kod kojih postoji značajno veći broj nosilaca haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> u dve kopije, u izdvojenoj grupi žena pacijenata je prisutno više nosilaca oba haplotipa, I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> i T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>. Uzimajući u obzir navedena funkcionalna svojstva I123A181 i T123V181 varijanti CXCL16 (Petit i sar., 2011) postoji mogućnost da u ženskom polu, osim svojstva hemotaksije (koje odlikuje obe varijante), i svojstvo adhezije (koje ima samo varijanta I123A181) takođe doprinosi riziku za nastanak multiple skleroze. U jednoj studiji je pokazano da među polnim hormonima isključivo ženski (estradiol i progesteron) imaju uticaj na stimulaciju adhezije mononuklearnih leukocita za endotelne ćelije stimulisane sa TNF-alfa i IFN-

gama (Cid i sar., 1994), a u kojima se inducibilno eksprimira i CXCL16 (Wuttge i sar., 2004; Hofnagel i sar., 2002). U svjetlu ove činjenice se može posmatrati potencijalni značaj adhezije posredovane preko CXCL16 u patogenezi multiple skleroze kod žena, koji smo pretpostavili na osnovu rezultata naše studije. Dodatno, funkcionalna studija je otkrila da, u poređenju sa I123A181, varijanta T123V181 može pokazivati trend ka nižim nivoima njene transmembranske forme koji istovremeno korelišu sa povišenim nivoima njene solubilne forme (Petit i sar., 2011). To sugerise na mogućnost efikasnije hemotaksije posredovane varijantom T123V181 nego varijantom I123A181 CXCL16. Stoga je moguće da postoji sinergizam između adhezije leukocita za aktivirani endotel posredovane preko I123A181 CXCL16 (koja kod žena može biti pojačana dejstvom estradiola (Cid i sar., 1994)) i efikasne hemotaksije leukocita posredovane solubilnom T123V181 varijantom CXCL16. U mehanizmu inflamacije, ovaj pretpostavljeni sinergizam mogao bi da doprinosi većoj infiltraciji leukocita iz krvi u ciljno tkivo (CNS) kod žena nosilaca heterozigota IT i AV, pošto su one nosioci oba haplotipa (I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> i T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>) tj. obe varijante CXCL16 (I123A181 i T123V181), u poređenju sa ženama nosiocima homozigota II i AA tj. samo haplotipa I<sub>123</sub>A<sub>181</sub> (varijante I123A181) CXCL16. Ovo može biti jedno od potencijalnih objašnjenja zašto smo našli značajno veću učestalost heterozigota IT i AV kod žena pacijenata, odnosno definisali ove genotipove polimorfizama I123T i A181V gena za CXCL16 kao faktore rizika za nastanak multiple skleroze kod žena.

Ovo je prva studija koja je ispitala efekte alela, genotipova i haplotipova polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 na patogenezu multiple skleroze. Naši rezultati analize polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 sugerisu na moguće zaštitno dejstvo alela I na sekundarnu progresiju RR forme multiple skleroze, samo kada je povezan sa alelom T u haplotipu I<sub>249</sub>T<sub>280</sub>. Analiza polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 pokazuje asocijaciju haplotipa T<sub>123</sub>V<sub>181</sub> sa povećanim rizikom za nastanak multiple skleroze. Replikacija i validacija rezultata u grupama ispitanika iz različitih populacija i dodatne funkcionalne studije su neophodne pre nego što se izvede konačni zaključak o efektima ciljnih polimorfizama u genima za CX3CR1 i CXCL16 na patogenezu multiple skleroze.

## **5.2. Relativna ekspresija gena za CX3CL1 i CXCL16 i njihove receptore, CX3CR1 i CXCR6, u patogenezi relapsno-remitentne forme multiple skleroze**

Za razliku od tkiva humanog CNS-a, koje ima veoma ograničenu dostupnost, periferna krv je lako dostupna i predstavlja izvor potencijalnih sistemskih markera. Zbog toga, jedan od glavnih ciljeva u izučavanju molekularne patogeneze multiple skleroze, kao inflamatorne i autoimunske bolesti, jeste identifikacija promena genske ekspresije u imunskom sistemu, koje se detektuju u ćelijama periferne krvi, a odražavaju patološke promene u ciljnom tkivu CNS-a kod obolelih. S obzirom da monociti/makrofazi i limfociti igraju ključnu ulogu u patogenezi multiple skleroze, cilj u našoj studiji je bila analiza relativne ekspresije gena za hemokine CX3CL1 i CXCL16 i njihove receptore, CX3CR1 i CXCR6, u uzorcima mononuklearnih leukocita periferne krvi zdravih kontrolnih subjekata i pacijenata sa RR formom multiple skleroze.

### **5.2.1. Relativna ekspresija gena za CX3CL1 i CX3CR1 u perifernim mononuklearnim leukocitima kontrola i pacijenata**

Dosadašnji rezultati studija ukazuju da, za razliku od većine drugih hemokina, CX3CL1 generalno nije prisutan u leukocitima periferne krvi zdravih osoba (Bazan i sar., 1997). Međutim, njegova ekspresija u leukocitima može biti specifična za određena stanja, odnosno patogenezu nekih bolesti. Tako je metodom protočne citometrije utvrđeno da izvestan broj CD4<sup>+</sup> i CD8<sup>+</sup> T-limfocita eksprimira CX3CL1 kod pacijenata sa reumatoidnim artritismom. CX3CL1 je bio predominantno ekspimiran u CD4<sup>+</sup> Th1 limfocitima, što sugeriše na njegovu ulogu u inflamatornom procesu tokom patogeneze reumatoidnog artritisa (Blaschke i sar., 2003). U navedenoj studiji (Blaschke i sar., 2003) ekspresija CX3CL1 je ipak bila ograničena na relativno mali broj T-limfocita. U našoj studiji nije detektovana ekspresija CX3CL1 iRNK u uzorcima ukupnih perifernih mononuklearnih leukocita, ni pacijenata sa RR formom multiple skleroze ni kontrola. U CNS-u CX3CL1 se konstitutivno eksprimira u neuronima (Harrison i sar., 1998), dok je

njegova inducibilna ekspresija pod delovanjem proinflamatornih citokina otkrivena u vaskularnim endotelnim ćelijama mozga (Hurst i sar., 2009). U koronarnim i moždanim krvnim sudovima CX3CL1 je detektovan isključivo na luminalnoj površini endotela (Harrison i sar., 1999; Pan i sar., 1997), odakle solubilni hemokinski domen CX3CL1 može biti isečen delovanjem metaloproteinaza ADAM10 i ADAM17 (Hundhausen i sar., 2003; Garton i sar., 2001). Pokazana je povišena ekspresija CX3CL1 na vaskularnim endotelnim ćelijama mozga tokom eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE) (Pan i sar., 1997; Fischer i sar., 2000). To je u saglasnosti sa analizom *in vitro* koja je pokazala inducibilnu ekspresiju i proteolitičko sečenje CX3CL1 sa površine endotelne ćelije u odgovoru na medijatore inflamacije (IL-1, TNFA, IFNG) tokom patogeneze inflamatornih bolesti CNS-a (Fraticeili i sar., 2001). Kod pacijenata sa RR formom multiple skleroze koji su u fazi relapsa (tj. pogoršanja neuroloških simptoma) detektovan je značajan porast nivoa solubilnog CX3CL1 u cirkulaciji, u odnosu na kontrole (Kastenbauer i sar., 2003). Metaloproteinaza ADAM17 stimuliše proteolitičko oslobađanje solubilnog CX3CL1 sa endotelne ćelije koje su aktivirane posredstvom TNFA i drugih proinflamatornih citokina. Pošto u lezijama CNS-a pacijenata sa multiplom sklerozom aktivirana mikroglia intenzivno produkuje TNFA (Benveniste, 1997), a ADAM17 deluje i kao TNFA-konvertujući enzim (Garton i sar., 2001; Tsou i sar., 2001), uloga ovog enzima sugerise na vezu između lokalne tkivne produkcije proinflamatornog citokina i proteolitičkog sečenja CX3CL1 na površini aktiviranih endotelne ćelije. Ovo inducibilno proteolitičko sečenje može biti glavni uzrok porasta solubilnog CX3CL1 u cirkulaciji tokom subakutne i hronične inflamacije u CNS-u, koja je karakteristična za multiplu sklerozu. U tom pogledu CX3CL1 može biti važan stimulator ekstravazacije leukocita (posredstvom aktivacije leukocitnog CX3CR1) iz krvi u tkivo CNS-a zahvaćeno inflamacijom (Sunnemark i sar., 2005).

U studiji na modelu EAE-a indukovanoj MOG-om detektovana je akumulacija mikroglialnih i drugih ćelija koje ekspimiraju CX3CR1, pretežno makrofaga i NK-ćelija, u inflamatornim lezijama mozga pacova (Sunnemark i sar., 2005). Ovo ukazuje na ulogu solubilnog CX3CL1 u stimulisanju migracije perifernih mononuklearnih leukocita u tkivo mozga tokom patogeneze eksperimentalnog modela multiple skleroze. U našoj studiji detektovan je značajno viši nivo ekspresije gena za CX3CR1 u

mononuklearnim leukocitima periferne krvi pacijenata sa RR formom multiple skleroze, u odnosu na zdrave kontrole. Značajna razlika je bila veća kada je podgrupa pacijenata u relapsu upoređena sa kontrolama, nego kada je podgrupa pacijenata u remisiji (tj. fazi između dva relapsa, tokom koje dolazi do potpunog ili delimičnog oporavka od posledica relapsa) upoređena sa kontrolama (na osnovu vrednosti statističkih parametara  $p$  i “fold change”). U prethodnoj studiji primenom genskog čipa je identifikovano 16 gena koji su bili različito eksprimirani kod 10 pacijenata sa RR formom multiple skleroze, u odnosu na 12 zdravih kontrola. Među ovim genima je i gen za CX3CR1, čija je ekspresija bila značajno niža kod pacijenata. U cilju provere rezultata, u istoj studiji je analizirana relativna ekspresija gena za CX3CR1 metodom Real-time PCR na uzorcima perifernih mononuklearnih leukocita 28 zdravih kontrola i 25 pacijenata sa RR formom multiple skleroze (Infante-Duarte i sar., 2005). Nasuprot rezultatu naše studije, studija Infante-Duarte i sar. je pokazala da je u ukupnoj grupi pacijenata nivo CX3CR1 iRNK značajno niži, u odnosu na kontrolnu grupu. Ovaj rezultat je korelisao sa nivoom CX3CR1 proteina: metodom protočne citometrije je utvrđeno da periferni mononukleari pacijenata u značajno manjoj meri eksprimiraju receptor, nego mononukleari zdravih kontrola (Infante-Duarte i sar., 2005). Zatim je analizirano prisustvo CX3CR1 na površini različitih mononuklearnih leukocita kao što su NK-ćelije, citotoksični CD8+ T-limfociti i CD4+ Th1 limfociti, koji eksprimiraju ovaj receptor. Utvrđeno je da značajno smanjenje ekspresije CX3CR1 kod pacijenata potiče od redukovane ekspresije receptora na NK-ćelijama tj. od redukovanog broja CX3CR1+ NK-ćelija. Broj citotoksičnih CD8+ T-limfocita koji eksprimiraju CX3CR1 je bio veći kod pacijenata u odnosu na kontrole ali nije dostignuta statistička značajnost, dok je broj CD4+ CX3CR1+ T-limfocita bio vrlo nizak i kod pacijenata i kod kontrola (Infante-Duarte i sar., 2005). Kada su analizirane dve podgrupe pacijenata, nađeno je da postoji značajno veći broj CX3CR1+ NK-ćelija kod pacijenata u relapsu nego kod pacijenata u remisiji (Infante-Duarte i sar., 2005). U istoj studiji je pokazano da CX3CR1+ NK-ćelije imaju veću citotoksičnu aktivnost nego CX3CR1– NK-ćelije. Zbog toga značajan porast broja NK-ćelija koje eksprimiraju CX3CR1 kod pacijenata koji su u relapsu, u odnosu na one u remisiji, ukazuje na potencijalnu ulogu subpopulacije CX3CR1+ NK-ćelija u egzacerbaciji bolesti (Infante-Duarte i sar., 2005). Za razliku od studije Infante-Duarte i sar., u našoj studiji je detektovan značajno viši nivo CX3CR1 iRNK u perifernim

mononuklearima kod pacijenata u relapsu u odnosu na kontrole i kod pacijenata u remisiji u odnosu na kontrole, dok nije bilo značajne razlike kada su upoređene podgrupe pacijenata u relapsu i remisiji. Poznato je da CX3CR1+ NK-ćelije imaju veću citotoksičnu aktivnost nego CX3CR1- NK-ćelije (Infante-Duarte i sar., 2005). Takođe je otkriveno da u krvi pacijenata sa multiplom sklerozom dolazi do ekspanzije citotoksičnih CD4+ CD28- CX3CR1+ T-limfocita, pri čemu CX3CR1 (u prisustvu gradijenta solubilnog CX3CL1) posreduje u regrutovanju ovih ćelija u moždano tkivo gde one ostvaruju svoje citotoksično dejstvo (Broux i sar., 2012). Pod pretpostavkom da postoji pozitivna korelacija između nivoa iRNK kvantifikovanih u našoj studiji i nivoa proteina CX3CR1 (kao što je pozitivna korelacija potvrđena u prethodnoj studiji Infante-Duarte i sar.) i uzimajući u obzir citotoksičnost subpopulacija CX3CR1+ mononuklearnih leukocita (Infante-Duarte i sar., 2005; Broux i sar., 2012), naši rezultati sugerišu na postojanje moguće veze između povišene ekspresije gena za CX3CR1 u mononuklearnim leukocitima pacijenata sa RR formom multiple skleroze i citotoksičnog dejstva CX3CR1+ leukocita putem kojeg bi ove ćelije doprinosile procesu inflamacije u CNS-u tokom patogeneze bolesti. Citotoksični efekti ovih subpopulacija CX3CR1+ mononuklearnih leukocita bi se ostvarivali i u fazi relapsa i u fazi remisije, a bili bi naročito izraženi u toku faze relapsa. Jedan od mogućih razloga neslaganja rezultata ekspresije gena za CX3CR1, dobijenih u našoj i prethodnoj studiji (Infante-Duarte i sar., 2005), je izostavljanje izvesnih kliničkih parametara prilikom analize rezultata. Bez analize tih parametara ne možemo znati u kolikoj meri su ove dve studije uporedive. Tako je npr. veći deo pacijenata u relapsu uključen u našu studiju u relativno kratkom vremenskom periodu nakon postavljanja dijagnoze multiple skleroze, dok su pacijenti u remisiji u trenutku uključivanja u studiju imali nešto duže trajanje bolesti (razlika postoji, mada nije statistički značajna). Dakle, prilikom analize genske ekspresije, pored osnovnih kriterijuma za upoređivanje uzoraka koji se tiču odsustva/prisustva bolesti, forme i faze bolesti (ovde RR forma multiple skleroze u kojoj su analizirane faze relapsa i remisije), treba uzeti u obzir i dodatne kliničke parametre kao što je trajanje bolesti, i dr.

### **5.2.2. Relativna ekspresija gena za CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima kontrola i pacijenata**

Hemokin CXCL16 i njegov receptor, CXCR6, su tipično eksprimirani u perifernim mononuklearnim leukocitima. U našoj studiji detektovan je značajno viši nivo ekspresije gena za CXCL16 u mononuklearnim leukocitima periferne krvi pacijenata sa RR formom multiple skleroze, u odnosu na zdrave kontrole. Kada je podgrupa pacijenata u fazi relapsa, tj. u fazi remisije, upoređena sa kontrolama, ustanovljeno je da značajni porast ekspresije gena za CXCL16 odlikuje pacijente u remisiji (kada se uporede sa kontrolama). Ekspresija gena za CXCR6 u mononuklearnim leukocitima nije značajno različita između pacijenata sa RR formom multiple skleroze i zdravih kontrola. Kada smo uporedili podgrupe pacijenata utvrdili smo da je nivo ekspresije gena za CXCL16 značajno viši, a za CXCR6 značajno niži, kod pacijenata u fazi remisije u odnosu na pacijente u fazi relapsa.

CXCL16 je eksprimiran predominantno u monocitima/makrofazima (Shimaoka i sar., 2000; Minami i sar., 2001; Tabata i sar., 2005). Proinflamatorni citokini (produkovani od strane CD4+ Th1 limfocita), IFNG i TNFA, indukuju ekspresiju CXCL16 u monocitima *in vitro* (Wuttge i sar., 2004), dok sam CXCL16 stimuliše produkciju proinflamatornih citokina (Gursel i sar., 2006). Ovi podaci ukazuju na ulogu CXCL16 kao proinflamatornog hemokina. Analiza moždanog tkiva obolelih od multiple skleroze pokazala je povišene nivoe CXCL16 iRNK i proteina duž oboda i oko hroničnih aktivnih plakova. Porast ekspresije CXCL16 u lezijama mozga je detektovan u “penastim” makrofazima na obodu hroničnih aktivnih plakova i u aktiviranim mikroglialnim ćelijama koje okružuju ove plakove (Hendrickx i sar., 2013). Ovi podaci ukazuju na to da je CXCL16, kao receptor „čistač“, uključen u degradaciju mijelinskog omotača i prezentovanje mijelinskih antigena od strane antigen-prezentujućih ćelija, te da je porast nivoa CXCL16 u aktiviranoj mikrogliji jedan od prvih događaja tokom iniciranja fagocitoze mijelina. Pojačana sinteza i proteolitičko sečenje membranskog CXCL16 od strane mikroglialnih ćelija i makrofaga u CNS-u može biti glavni uzrok značajnog porasta nivoa solubilnog CXCL16 koji je detektovan u uzorcima likvora pacijenata sa multiplom sklerozom, u odnosu na uzorke seruma ovih osoba (le Blanc i sar., 2006). U poređenju sa kontrolnim subjektima, nivoi solubilnog CXCL16 su bili

značajno viši i u likvoru i u serumu pacijenata sa multiplom sklerozom (le Blanc i sar., 2006). U toku neuroinflamacije, narušavanje krvno-moždane barijere i povišeni nivo CXCL16 u serumu mogu da olakšaju prodiranje aktiviranih mijelin-specifičnih CXCR6+ T-limfocita u tkivo CNS-a, što dovodi do pojačanog autoimunskog odgovora i oštećenja tkiva. Porast nivoa serumskog CXCL16 ukazuje na mogućnost povećane produkcije CXCL16 od strane monocita periferne krvi pacijenata. U našoj studiji detektovan je značajno viši nivo ekspresije gena za CXCL16 u perifernim mononuklearnim leukocitima pacijenata sa RR formom multiple skleroze, u odnosu na zdrave kontrole. Pritom smo ustanovili da ova razlika potiče od značajnog porasta ekspresije CXCL16 samo u podgrupi pacijenata u remisiji kada se uporede sa kontrolama.

CXCR6 je eksprimiran na NK-ćelijama, CD8+ T-limfocitima i CD4+ Th1 limfocitima (Fukumoto i sar., 2004; Matloubian i sar., 2000; Kim i sar., 2001). Poznato je da CXCL16 stimuliše hemotaksiju aktiviranih T-limfocita posredstvom aktivacije CXCR6 na njima (Matloubian i sar., 2000; Shimaoka i sar., 2003). Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, kao eksperimentalni model multiple skleroze, smatra se Th1-posredovanom autoimunskom bolešću (Steinman, 1996; Hemmer i sar., 2002). Sugerisano je da CXCL16, koji je eksprimiran u monocitima infiltriranim u tkivo CNS-a, indukuje hemotaksiju i akumulaciju MOG-specifičnih aktiviranih CD4+ CXCR6+ Th1 limfocita u CNS tokom patogeneze EAE-a (Fukumoto i sar., 2004). Shodno tome, težina kliničke slike akutnog EAE-a indukovanog MOG-om pozitivno je korelisala sa nivoima CXCL16 i CXCR6 u kičmenoj moždini miševa (Fukumoto i sar., 2004). U skladu sa ovim rezultatom dobijenim na eksperimentalnom modelu multiple skleroze i činjenicom da monociti eksprimiraju CXCL16, a CD4+ Th1 limfociti eksprimiraju CXCR6, očekivano bi bilo da ovi leukociti prisutni u perifernoj krvi obolelih od multiple skleroze pokazuju povišene nivoe ekspresije gena za CXCL16 i CXCR6. To bi se naročito odnosilo na pacijente koji su u fazi relapsa, s obzirom da akutni (monofazni) EAE odgovara fazi akutnog relapsa u RR formi multiple skleroze. U našoj studiji nije detektovana značajna razlika nivoa iRNK za CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearima, između kontrola i pacijenata u fazi relapsa. Međutim, pacijenti u fazi remisije imaju značajno viši nivo CXCL16 iRNK u odnosu na kontrole. Utvrdili smo i to da se podgrupa pacijenata u remisiji razlikuje od podgrupe u relapsu takođe po



značajnom porastu ekspresije gena za CXCL16, ali je to praćeno i značajnim smanjenjem ekspresije CXCR6. Prisustvo CXCR6 je značajan pokazatelj produkcije IFNG, pošto unutarćelijska sinteza IFNG značajno pozitivno koreliše sa ekspresijom CXCR6 na površini MBP-reaktivnih CD4+ Th1 limfocita (Calabresi i sar., 2002). Dakle, posredstvom aktivacije CXCR6, CXCL16 stimuliše produkciju proinflatornog citokina IFNG u autoreaktivnim Th1 limfocitima (Calabresi i sar., 2002), a sam IFNG indukuje ekspresiju CXCL16 u monocitima (Wuttge i sar., 2004). S obzirom na ovu činjenicu, očekivano je bilo da težina kliničke slike u eksperimentalnom modelu multiple skleroze pozitivno koreliše sa nivoima CXCL16 i CXCR6 u CNS-u tokom akutnog relapsa (Fukumoto i sar., 2004). Sa druge strane, u našoj studiji je pokazan značajan porast nivoa ekspresije gena za CXCL16 uz značajno sniženje ekspresije gena za CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima pacijenata u fazi remisije, u odnosu na pacijente u fazi relapsa. Ovo ukazuje na negativnu spregu koja bi mogla da smanji CXCL16-posredovanu produkciju IFNG i na taj način umanjiti inflamatorne efekte CXCL16 u toku faze remisije. Naši rezultati sugerišu da je ekspresija gena za CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima pacijenata sa RR formom multiple skleroze specifična za fazu bolesti (relaps/remisija).

Multipla skleroza je inflamatorna i autoimunska bolest, te analiza ekspresije gena u leukocitima periferne krvi predstavlja važan pristup za izučavanje imunološkog aspekta patogeneze ove bolesti. U ovoj studiji detektovali smo statistički značajne razlike u nivoima relativne ekspresije ispitivanih gena u uzorcima mononuklearnih leukocita periferne krvi, između zdravih kontrola i pacijenata sa RR formom multiple skleroze, kao i između podgrupa pacijenata u fazi relapsa i fazi remisije. Prethodne studije u kojima su ispitivani profili genske ekspresije ukazuju da, zajedno sa vrednošću parametra  $p$  kojim je definisana statistička značajnost razlike, treba uzimati u obzir i vrednost parametra “fold change” kada se analizira biološki smisao diferencijalne ekspresije gena. Autori navode da, u biološkom smislu, diferencijalna ekspresija gena postoji ukoliko je istovremeno  $p < 0,05$  i “fold change”  $\geq 1,5$  (Peart i sar., 2005; Raouf i sar., 2008), ili  $p < 0,02$  i “fold change”  $\geq 1,3$  (Huggins i sar., 2008). Na osnovu ovog kriterijuma (Huggins i sar., 2008) zaključujemo da naši rezultati imaju biološki značaj, tj. da se detektovane razlike na nivou genske ekspresije najverovatnije odražavaju i na

nivou sinteze proteina. Dobijena statistički značajna razlika ukazuje da ekspresija gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 na nivou njihovih iRNK može biti pokazatelj nastanka i kliničkog toka RR forme multiple skleroze. Zbog toga su potrebne replikacija i validacija rezultata genske ekspresije u većem broju studija, kako bi se molekuli iRNK (i proteina) koje kodiraju navedeni ciljni geni konačno mogli definisati kao molekularni markeri u patogenezi multiple skleroze.

## 6. ZAKLJUČCI

1. Utvrđeno je da se frekvencije alela i genotipova polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1 ne razlikuju značajno između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa multiplom sklerozom, tj. da ispitivani polimorfizmi nisu genetski faktori rizika za nastanak multiple skleroze.
2. Utvrđeno je da postoji izražen “linkage disequilibrium” između polimorfizama V249I i T280M u genu za CX3CR1. Shodno tome, u grupama kontrola i pacijenata procenjeno je prisustvo tri dominantna haplotipa:  $V_{249}T_{280}$ ,  $I_{249}M_{280}$  i  $I_{249}T_{280}$ . Analizirani haplotipovi polimorfizama V249I i T280M nisu genetski faktori rizika za nastanak multiple skleroze.
3. Haplotip  $I_{249}T_{280}$  u genu za CX3CR1 je značajan protektivni faktor za klinički tok multiple skleroze, koji određuje 2,6 puta manji odnos šansi za progresiju relapsno-remitentne (RR) u sekundarno-progresivnu (SP) formu bolesti.
4. U bioinformatičkoj analizi informacionih spektara CX3CL1 i CX3CR1 utvrđeno je da haplotip  $I_{249}T_{280}$ , značajno asociran sa kliničkim tokom bolesti, kodira varijantu proteina CX3CR1 koja može značajno da menja interakciju sa CX3CL1, u odnosu na najčešću varijantu ( $V_{249}T_{280}$ ) CX3CR1.
5. Utvrđeno je da se frekvencije alela i genotipova polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 značajno razlikuju između kontrolne grupe i grupe pacijenata sa multiplom sklerozom. Pokazano je da se polimorfizmi I123T i A181V nalaze u apsolutnom “linkage disequilibrium”-u. Haplotip  $T_{123}V_{181}$  predstavlja značajan genetski faktor rizika za nastanak multiple skleroze, povećavajući njegovim nosiocima šansu za oboljevanje za 1,3 puta.
6. Detektovana je polno zavisna asocijacija polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 sa nastankom multiple skleroze. Žene nosioci haplotipa  $T_{123}V_{181}$  imaju 1,4 puta značajno veću šansu da obole, u poređenju sa ženama nosiocima najčešćeg haplotipa,  $I_{123}A_{181}$ . Haplotip  $T_{123}V_{181}$  nije genetski faktor rizika za nastanak multiple skleroze kod muškaraca.
7. Nije utvrđena asocijacija polimorfizama I123T i A181V u genu za CXCL16 sa kliničkim tokom i progresijom multiple skleroze.

8. U bioinformatičkoj analizi informacionih spektara CXCL16 i CXCR6 utvrđeno je da haplotip T<sub>123</sub>V<sub>181</sub>, koji je genetski faktor rizika za nastanak multiple skleroze, kodira varijantu CXCL16 koja može značajno menjati interakciju sa CXCR6, u odnosu na najčešću varijantu (I123A181) CXCL16.
9. U uzorcima mononuklearnih leukocita periferne krvi zdravih kontrola i pacijenata sa RR formom multiple skleroze detektovana je i kvantifikovana ekspresija gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6, na nivou njihovih iRNK. Ekspresija gena za CX3CL1 nije detektovana u ispitivanim uzorcima.
10. Utvrđeno je da postoji značajno povišena (za 1,3 puta) ekspresija gena za CX3CR1 u perifernim mononuklearnim leukocitima svih pacijenata sa RR formom multiple skleroze, kao i podgrupa pacijenata u fazi relapsa i remisije, u odnosu na grupu zdravih kontrola. Prema tome, značajno povišen nivo CX3CR1 iRNK u perifernim mononuklearnim leukocitima može biti molekularni marker nastanka RR forme multiple skleroze.
11. Detektovana je značajno povišena (za 1,4 puta) ekspresija gena za CXCL16 u perifernim mononuklearnim leukocitima pacijenata sa RR formom multiple skleroze, u poređenju sa grupom zdravih kontrola. Značajno povišena ekspresija ovog gena je utvrđena i u podgrupi pacijenata u fazi remisije, u odnosu na podgrupu u fazi relapsa (za 1,3 puta) i u odnosu na kontrolnu grupu (za 1,6 puta). Rezultat ukazuje da povećanje nivoa CXCL16 iRNK u perifernim mononuklearnim leukocitima može biti molekularni marker za fazu remisije u RR formi multiple skleroze.
12. Utvrđeno je da ne postoje značajne razlike u nivoima ekspresije gena za CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima između grupe pacijenata sa RR formom multiple skleroze i grupe kontrola. Pacijenti u fazi remisije imaju značajno nižu (za 1,4 puta) ekspresiju gena za CXCR6, u odnosu na pacijente u fazi relapsa. Dakle, smanjenje nivoa CXCR6 iRNK u perifernim mononuklearnim leukocitima može biti molekularni marker za fazu remisije u RR formi multiple skleroze.
13. Ne postoje značajne korelacije između vrednosti kliničkih parametara i nivoa ekspresije gena za CX3CR1, CXCL16 i CXCR6 u perifernim mononuklearnim leukocitima pacijenata sa RR formom multiple skleroze.

## 7. LITERATURA

- Abbas AK, Lichtman AH. Osnovna imunologija, drugo obnovljeno izdanje. Data status 2006.
- Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat Rev Neurosci* 2006;7:41-53.
- Abel S, Hundhausen C, Mentlein R, Schulte A, Berkhout TA, Broadway N, Hartmann D, Sedlacek R, Dietrich S, Muetze B, Schuster B, Kallen KJ, Saftig P, Rose-John S, Ludwig A. The transmembrane CXC chemokine ligand 16 is induced by IFN-gamma and TNF-alpha and shed by the activity of the disintegrin-like metalloproteinase ADAM10. *J Immunol* 2004;172:6362-6372.
- Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol* 2004;55:410-417.
- Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurol* 2008;71:129-135.
- Ambrosini E, Aloisi F. Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochem Res* 2004;29(5):1017-1038.
- Ancuta P, Rao R, Moses A, Mehle A, Shaw SK, Luscinskas FW, Gabuzda D. Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J Exp Med* 2003;197:1701-1707.
- Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res* 2004;64(15):5245-5250.
- Ando DG, Clayton J, Kono D, Urban JL, Sercarz EE. Encephalitogenic T cells in the B10.PL model of experimental allergic encephalomyelitis (EAE) are of the Th-1 lymphokine subtype. *Cell Immunol* 1989;124:132-143.
- ANZgene. Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet* 2009;41:824-828.

- Apostolakis S, Amanatidou V, Papadakis EG, Spandidos DA. Genetic diversity of CX3CR1 gene and coronary artery disease: new insights through a meta-analysis. *Atherosclerosis* 2009;207:8-15.
- Apostolakis S, Baritaki S, Kochiadakis GE, Igoumenidis NE, Panutsopoulos D, Spandidos DA. Effects of polymorphisms in chemokine ligands and receptors on susceptibility to coronary artery disease. *Thromb Res* 2007;119:63-71.
- Applied Biosystems. Guide to performing relative quantitation of gene expression using Real-time quantitative PCR. 2004;7:34.
- Arli B, Irkeç C, Menevse S, Yilmaz A, Alp E. Fractalkine gene receptor polymorphism in patients with multiple sclerosis. *Int J Neurosci* 2013;123(1):31-37.
- Arthur AT, Armati PJ, Bye C. Southern MS Genetics Consortium. Genes implicated in multiple sclerosis pathogenesis from consilience of genotyping and expression profiles in relapse and remission. *BMC Med Genet* 2008;9:17.
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: noninfectious factors. *Ann Neurol* 2007;61:504-513.
- Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 2007;61(4):288-299.
- Aslanian AM, Charo IF. Targeted disruption of the scavenger receptor and chemokine CXCL16 accelerates atherosclerosis. *Circulation* 2006;114:583-590.
- Baeke F, Korf H, Overbergh L, Verstuyf A, Thorrez L, Van Lommel L, Waer M, Schuit F, Gysemans C, Mathieu C. The vitamin D analog, TX527, promotes a human CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup> regulatory T cell profile and induces a migratory signature specific for homing to sites of inflammation. *J Immunol* 2011;186(1):132-142.
- Bajetto A, Bonavia R, Barbero S, Schettini G. Characterization of chemokines and their receptors in the central nervous system: physiopathological implications. *J Neurochem* 2002;82:1311-1329.
- Balashov KE, Rottman JB, Weiner HL, Hancock WW. CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:6873-6878.

- Ban M, Goris A, Lorentzen AR, Baker A, Mihalova T, Ingram G, Booth DR, Heard RN, Stewart GJ, Bogaert E, Dubois B, Harbo HF, Celius EG, Spurkland A, Strange R, Hawkins C, Robertson NP, Dudbridge F, Wason J, De Jager PL, Hafler D, Rioux JD, Ivinson AJ, McCauley JL, Pericak-Vance M, Oksenberg JR, Hauser SL, Sexton D, Haines J, Sawcer S; Wellcome Trust Case-Control Consortium (WTCCC), Compston A. Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet* 2009;17:1309-1313.
- Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, Radue EW, Lindberg RL, Uitdehaag BM, Johnson MR, Angelakopoulou A, Hall L, Richardson JC, Prinjha RK, Gass A, Geurts JJ, Kragt J, Sombekke M, Vrenken H, Qualley P, Lincoln RR, Gomez R, Caillier SJ, George MF, Mousavi H, Guerrero R, Okuda DT, Cree BA, Green AJ, Waubant E, Goodin DS, Pelletier D, Matthews PM, Hauser SL, Kappos L, Polman CH, Oksenberg JR. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2009;18:767-778.
- Baranzini SE. Revealing the genetic basis of multiple sclerosis: are we there yet? *Curr Opin Genet Develop* 2011;21:317-324.
- Barlic J, McDermott DH, Merrell MN, Gonzales J, Via LE, Murphy PM. Interleukin (IL)-15 and IL-2 reciprocally regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1 through selective NFAT1- and NFAT2-dependent mechanisms. *J Biol Chem* 2004;279(47):48520-48534.
- Barlic J, Sechler JM, Murphy PM. IL-15 and IL-2 oppositely regulate expression of the chemokine receptor CX3CR1. *Blood* 2003;102:3494-3503.
- Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, Schlager C, Miljkovic D, Ellwart JW, Klinkert WE, Flugel-Koch C, Issekutz TB, Wekerle H, Flugel A. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nat* 2009;462:94-98.
- Bazan JF, Bacon KB, Hardiman G, Wang W, Soo K, Rossi D, Greaves DR, Zlotnik A, Schall TJ. A new class of membrane-bound chemokine with a CX3C motif. *Nat* 1997;385:640-644.
- Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 1997;75:165-173.

- Bergamaschi R. Prognostic factors in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007;79:423-447.
- Bhavsar PK, Sukkar MB, Khorasani N, Lee KY, Chung KF. Glucocorticoid suppression of CX3CL1 (fractalkine) by reduced gene promoter recruitment of NF-kappaB. *FASEB J* 2008;22(6):1807-1816.
- Birnbaum G, Kotilinek L. Heat shock or stress proteins and their role as autoantigens in multiple sclerosis. *Ann NY Acad Sci* 1997;835:157-167.
- Blaschke S, Koziolok M, Schwarz A, Benöhr P, Middel P, Schwarz G, Hummel KM, Müller GA. Proinflammatory role of fractalkine (CX3CL1) in rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 2003;30(9):1918-1927.
- Boehme SA, Lio FM, Maciejewski-Lenoir D, Bacon KB, Conlon PJ. The chemokine fractalkine inhibits Fas-mediated cell death of brain microglia. *J Immunol* 2000;165:397-403.
- Bomprezzi R, Ringnér M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, Elkahloun A, Yu A, Bielekova B, Meltzer PS, Martin R, McFarland HF, Trent JM. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet* 2003;12:2191-2199.
- Borkar M, Tripathi G, Sharma RK, Sankhwar SN, Agrawal S. Chemokine (CCR) and fractalkine (CX3CR) receptors and end stage renal disease. *Inflamm Res* 2011;60(4):399-407.
- Broux B, Pannemans K, Zhang X, Markovic-Plese S, Broekmans T, Eijnde BO, Van Wijmeersch B, Somers V, Geusens P, van der Pol S, van Horssen J, Stinissen P, Hellings N. CX(3)CR1 drives cytotoxic CD4(+)CD28(-) T cells into the brain of multiple sclerosis patients. *J Autoimmun* 2012;38(1):10-19.
- Burton JM, Kimball S, Vieth R, Bar-Or A, Dosch HM, Cheung R, Gagne D, D'Souza C, Ursell M, O'Connor P. A phase I/II dose-escalation trial of vitamin D3 and calcium in multiple sclerosis. *Neurol* 2010;74:1852-1859.
- Burton JM, O'Connor PW, Hohol M, Beyene J. Oral versus intravenous steroids for treatment of relapses in multiple sclerosis. *Cochrane Database Syst Rev* 2009;(3):CD006921.



- Calabresi PA, Yun SH, Allie R, Whartenby KA. Chemokine receptor expression on MBP-reactive T cells: CXCR6 is a marker of IFN $\gamma$ -producing effector cells. *J Neuroimmunol* 2002;127(1-2):96-105.
- Cantorna MT. Vitamin D and multiple sclerosis: an update. *Nutr Rev* 2008;66(10 Suppl.2):S135-138.
- Carlson T, Kroenke M, Rao P, Lane TE, Segal B. The Th17-ELR+ CXC chemokine pathway is essential for the development of central nervous system autoimmune disease. *J Exp Med* 2008;205:811-823.
- Carter KW, McCaskie PA, Palmer LJ. JLIN: A Java based Linkage Disequilibrium plotter. *BMC Bioinformatics* 2006;7:60.
- Carter KW, McCaskie PA, Palmer LJ. SimHap GUI: An intuitive graphical user interface for genetic association analysis. *BMC Bioinformatics* 2008;9:557.
- Chandrasekar B, Bysani S, Mummidi S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappaB and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *J Biol Chem* 2004;279:3188-3196.
- Chandrasekar B, Mummidi S, Valente AJ, Patel DN, Bailey SR, Freeman GL, Hatano M, Tokuhisa T, Jensen LE. The pro-atherogenic cytokine interleukin-18 induces CXCL16 expression in rat aortic smooth muscle cells via MyD88, interleukin-1 receptor-associated kinase, tumor necrosis factor receptor-associated factor 6, c-Src, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, c-Jun N-terminal kinase, and activator protein-1 signaling. *J Biol Chem* 2005;280(28):26263-26277.
- Chapman GA, Moores K, Harrison D, Campbell CA, Stewart BR, Strijbos PJ. Fractalkine cleavage from neuronal membranes represents an acute event in the inflammatory response to excitotoxic brain damage. *J Neurosci* 2000;20:RC87.
- Charcot J. Histologie de la sclérose en plaque. *Gazette des Hôpitaux* 1868;41:554-566.
- Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med* 2006;354:610-621.
- Chen S, Luo D, Streit WJ, Harrison JK. TGF- $\beta$ 1 upregulates CX3CR1 expression and inhibits fractalkine-stimulated signaling in rat microglia. *J Neuroimmunol* 2002;133:46-55.

- Chen Y, Green SR, Almazan F, Quehenberger O. The amino terminus and the third extracellular loop of CX3CR1 contain determinants critical for distinct receptor functions. *Mol Pharmacol* 2006;69(3):857-865.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162(1):156-159.
- Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, Schnaper HW, Fauci AS, Hoffman GS. Estradiol enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type 1, and vascular cell adhesion molecule type 1. *J Clin Invest* 1994;93(1):17-25.
- Clark AK, Yip PK, Malcangio M. The liberation of fractalkine in the dorsal horn requires microglial cathepsin S. *J Neurosci* 2009;29:6945-6954.
- Cockwell P, Chakravorty SJ, Girdlestone J, Savage CO. Fractalkine expression in human renal inflammation. *J Pathol* 2002;196:85-90.
- Colobran R, Pujol-Borrell R, Armengol MP, Juan M. The chemokine network. II. On how polymorphisms and alternative splicing increase the number of molecular species and configure intricate patterns of disease susceptibility. *Clin Exp Immunol* 2007;150:1-12.
- Columba-Cabezas S, Serafini B, Ambrosini E, Sanchez M, Penna G, Adorini L, Aloisi F. Induction of macrophage-derived chemokine/CCL22 expression in experimental autoimmune encephalomyelitis and cultured microglia: implications for disease regulation. *J. Neuroimmunol.* 2002;130:10-21.
- Comabella M, Craig DW, Camina-Tato M, Morcillo C, Lopez C, Navarro A, Rio J, Montalban X, Martin R. Identification of a novel risk locus for multiple sclerosis at 13q31.3 by a pooled genome-wide scan of 500,000 single nucleotide polymorphisms. *PLoS ONE* 2008;3:e3490
- Combadière C, Godin O, Vidal C, Cangialosi A, Proust C, Tzourio C. Common CX3CR1 alleles are associated with a reduced risk of headaches. *Headache* 2008;48:1061-1066.
- Combadière C, Potteaux S, Gao JL, Esposito B, Casanova S, Lee EJ, Debré P, Tedgui A, Murphy PM, Mallat Z. Decreased atherosclerotic lesion formation in CX3CR1/apolipoprotein E double knockout mice. *Circulat* 2003;107:1009-1016.

- Combadière C, Salzwedel K, Smith ED, Tiffany HL, Berger EA, Murphy PM. Identification of CX3CR1. A chemotactic receptor for the human CX3C chemokine fractalkine and a fusion coreceptor for HIV-1. *J Biol Chem* 1998;273:23799-23804.
- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet* 2002;359:1221-1231.
- Compston A. The genetic epidemiology of multiple sclerosis. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 1999;354:1623-1634.
- Confavreux C, Vukusic S. Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* 2006;129:595-605.
- Confavreux C, Vukusic S. Natural history of multiple sclerosis: implications for counselling and therapy. *Curr Opin Neurol* 2002;15(3):257-266.
- Confavreux C, Vukusic S. The clinical epidemiology of multiple sclerosis. *Neuroimaging Clin N Am* 2008;18(4):589-622.
- Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ. High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 2004;103:4222-4231.
- Cross AK, Woodrooffe MN. Chemokine modulation of matrix metalloproteinase and TIMP production in adult rat brain microglia and a human microglial cell line in vitro. *Glia* 1999;28:183-189.
- D'Netto MJ, Ward H, Morrison KM, Ramagopalan SV, Dymant DA, DeLuca GC, Handunnetthi L, Sadovnick AD, Ebers GC. Risk alleles for multiple sclerosis in multiplex families. *Neurol* 2009;72:1984-1988.
- Damas JK, Boullier A, Waehre T, Smith C, Sandberg WJ, Green S, Aukrust P, Quehenberger O. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, is elevated in coronary artery disease and is reduced during statin therapy. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:2567-2572.
- Daoudi M, Lavergne E, Garin A, Tarantino N, Debre P, Pincet F, Combadiere C, Deterre P. Enhanced adhesive capacities of the naturally occurring Ile249-Met280 variant of the chemokine receptor CX3CR1. *J Biol Chem* 2004;279:19649-19657.

- Darbandi-Tehrani K, Hermand P, Carvalho S, Dorgham K, Couvineau A, Lacapère JJ, Combadière C, Deterre P. Subtle conformational changes between CX3CR1 genetic variants as revealed by resonance energy transfer assays. *FASEB J* 2010;24(11):4585-4598.
- De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, Piccio L, Raychaudhuri S, Tran D, Aubin C, Briskin R, Romano S; International MS Genetics Consortium, Baranzini SE, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL, Gibson RA, Naeglin Y, Uitdehaag B, Matthews PM, Kappos L, Polman C, McArdle WL, Strachan DP, Evans D, Cross AH, Daly MJ, Compston A, Sawcer SJ, Weiner HL, Hauser SL, Hafler DA, Oksenberg JR. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet* 2009;41:776-782.
- Debette S, Bevan S, Dartigues JF, Sitzer M, Lorenz M, Ducimetière P, Amouyel P, Markus HS. Fractalkine receptor/ligand genetic variants and carotid intima-media thickness. *Stroke* 2009;40(6):2212-2214.
- Deng HK, Unutmaz D, KewalRamani VN, Littman DR. Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nat* 1997;388(6639):296-300.
- Devlin B, Risch N. A comparison of linkage disequilibrium measures for fine-scale mapping. *Genomics* 1995;29(2):311-322.
- Duggal P, An P, Beaty TH, Strathdee SA, Farzadegan H, Markham RB, Johnson L, O'Brien SJ, Vlahov D, Winkler CA. Genetic influence of CXCR6 chemokine receptor alleles on PCP-mediated AIDS progression among African Americans. *Genes Immun* 2003;4(4):245-250.
- Duthey B, Hubner A, Diehl S, Boehncke S, Pfeffer J, Boehncke WH. Anti-inflammatory effects of the GABA(B) receptor agonist baclofen in allergic contact dermatitis. *Exp Dermatol* 2010;19:661-666.
- Dutta R, McDonough J, Chang A, Swamy L, Siu A, Kidd GJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. Activation of the ciliary neurotrophic factor (CNTF) signaling pathway in cortical neurons of multiple sclerosis patients. *Brain* 2007;130:2566-2576.

- Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, Gudz T, Macklin WB, Lewis DA, Fox RJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006;59:478-489.
- Ebers GC. Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7(3):268–77.
- Epstein MA, Crawford DH. Gammaherpesviruses: Epstein-Barr virus. In: Maxy BWJ, Collier L. *Topley and Wilson's microbiology and microbial infections*. 9th ed London: Arnold 1999;p351-366.
- Excoffier L, Slatkin M. Maximum-likelihood estimation of molecular haplotype frequencies in a diploid population. *Mol Biol Evol* 1995;12:921-927.
- Faure S, Meyer L, Costagliola D, Vaneensberghe C, Genin E, Autran B, Delfraissy JF, McDermott DH, Murphy PM, Debré P, Théodorou I, Combadière C. Rapid progression to AIDS in HIV+ individuals with a structural variant of the chemokine receptor CX3CR1. *Science* 2000;287:2274-2277.
- Filippi M, Paty DW, Kappos L, Barkhof F, Compston DA, Thompson AJ, Zhao GJ, Wiles CM, McDonald WI, Miller DH. Correlations between changes in disability and T2-weighted brain MRI activity in multiple sclerosis: a follow-up study. *Neurol* 1995;45:255-260.
- Fischer FR, Santambrogio L, Luo Y, Berman MA, Hancock WW, Dorf ME. Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. *J Neuroimmunol* 2000;110(1-2):195-208.
- Flower DR. Modelling G-protein-coupled receptors for drug design. *Biochim Biophys Acta* 1999;1422:207-234.
- Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7:852-858.
- Fratelli P, Sironi M, Bianchi G, D'Ambrosio D, Albanesi C, Stoppacciaro A, Chieppa M, Allavena P, Ruco L, Girolomoni G, Sinigaglia F, Vecchi A, Mantovani A. Fractalkine (CX3CL1) as an amplification circuit of polarized Th1 responses. *J Clin Invest* 2001;107:1173-1181.

- Frohman EM, Racke MK, Raine CS. Multiple sclerosis- the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 2006;354:942-955.
- Fujimoto K, Imaizumi T, Yoshida H, Takanashi S, Okumura K, Satoh K. Interferon- $\gamma$  stimulates fractalkine expression in human bronchial epithelial cells and regulates mononuclear cell adherence. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2001;25:233-238.
- Fukumoto N, Shimaoka T, Fujimura H, Sakoda S, Tanaka M, Kita T, Yonehara S. Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2004;173(3):1620-1627.
- Furuichi K, Gao JL, Murphy PM. Chemokine receptor CX3CR1 regulates renal interstitial fibrosis after ischemia-reperfusion injury. *Am J Pathol* 2006;169:372-387.
- Galkina E, Harry BL, Ludwig A, Liehn EA, Sanders JM, Bruce A, Weber C, Ley K. CXCR6 promotes atherosclerosis by supporting T-cell homing, interferon-gamma production, and macrophage accumulation in the aortic wall. *Circulation* 2007;116:1801-1811.
- Garcia GE, Xia Y, Chen S, Wang Y, Ye RD, Harrison JK, Bacon KB, Zerwes HG, Feng L. NF-kappaB-dependent fractalkine induction in rat aortic endothelial cells stimulated by IL-1beta, TNF-alpha, and LPS. *J Leukoc Biol* 2000;67:577-584.
- Garin A, Pellet P, Deterre P, Debre P, Combadiere C. Cloning and functional characterization of the human fractalkine receptor promoter regions. *Biochem J* 2002;368:753-760.
- Garton KJ, Gough PJ, Blobel CP, Murphy G, Greaves DR, Dempsey PJ, Raines EW. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme (ADAM17) mediates the cleavage and shedding of fractalkine (CX3CL1). *J Biol Chem* 2001;276:37993-38001.
- Garton KJ, Gough PJ, Raines EW. Emerging roles for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. *J Leukoc Biol* 2006;79:1105-1116.
- Ge S, Song L, Pachter JS. Where is the blood-brain barrier...really? *J Neurosci Res* 2005;79:421-427.

- Geissmann F, Jung S, Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* 2003;19:71-82.
- Genain CP, Nguyen MH, Letvin NL, Pearl R, Davis RL, Adelman M, Lees MB, Linington C, Hauser SL. Antibody facilitation of multiple sclerosis-like lesions in a nonhuman primate. *J Clin Invest* 1995;96:2966-2974.
- Gerard C, Rollins BJ. Chemokines and disease. *Nat Immunol* 2001;2:108-115.
- Glad SB, Nyland HI, Aarseth JH, Riise T, Myhr K. Long-term follow-up of benign multiple sclerosis in Hordaland County, Western Norway. *Mult Scler* 2009;15:942-950.
- Gough PJ, Garton KJ, Wille PT, Rychlewski M, Dempsey PJ, Raines EW. A disintegrin and metalloproteinase 10-mediated cleavage and shedding regulates the cell surface expression of CXC chemokine ligand 16. *J Immunol* 2004;172:3678-3685.
- Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N. Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol* 2003;13:554-573.
- Greaves DR, Hakkinen T, Lucas AD, Liddiard K, Jones E, Quinn CM, Senaratne J, Green FR, Tyson K, Boyle J, Shanahan C, Weissberg PL, Gordon S, Ylä-Herttuala S. Linked chromosome 16q13 chemokines, macrophage-derived chemokine, fractalkine, and thymus- and activation-regulated chemokine, are expressed in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:923-929.
- Greer JM, McCombe PA. Role of gender in multiple sclerosis: Clinical effects and potential molecular mechanisms. *J Neuroimmunol* 2011;234:7-18.
- Gursel M, Gursel I, Mostowski HS, Klinman DM. CXCL16 influences the nature and specificity of CpG-induced immune activation. *J Immunol* 2006;177:1575-1580.
- Haas J, Hug A, Viehöver A, Fritzsche B, Falk CS, Filser A, Vetter T, Milkova L, Korporal M, Fritz B, Storch-Hagenlocher B, Krammer PH, Suri-Payer E, Wildemann B. Reduced suppressive effect of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup> regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 2005;35:3343-3352.

- Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357:851-862.
- Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, Plagnol V, Hinks A, Simmonds MJ, Stevens HE, Walker NM, Healy B, Howson JM, Maisuria M, Duley S, Coleman G, Gough SC; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Worthington J, Kuchroo VK, Wicker LS, Todd JA. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes Immun* 2009;10:5-10.
- Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Oksenberg JR, Lincoln R, Zhang DY, Banatao DR, Gatto N, Goodkin DE, Hauser SL. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 1998;7:1229-1234.
- Haliassos A, Chomel JC, Grandjouan S, Kruh J, Kaplan JC, Kitzis A. Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Res* 1989;17(20):8093-8099.
- Hara T, Katakai T, Lee JH, Nambu Y, Nakajima-Nagata N, Gonda H, Sugai M, Shimizu A. A transmembrane chemokine, CXC chemokine ligand 16, expressed by lymph node fibroblastic reticular cells has the potential to regulate T cell migration and adhesion. *Int Immunol* 2006;18:301-311.
- Harrison JK, Fong AM, Swain PAW, Chen S, Yu YRA, Salafranca MN, Greenleaf WB, Imai T, Patel DD. Mutational analysis of the fractalkine chemokine domain: basic amino acid residues differentially contribute to CX3CR1 binding, signaling and cell adhesion. *J Biol Chem* 2001;276(24):21632-21641.
- Harrison JK, Jiang Y, Chen S, Xia Y, Maciejewski D, McNamara RK, Streit WJ, Salafranca MN, Adhikari S, Thompson DA, Botti P, Bacon KB, Feng L. Role for neuronally derived fractalkine in mediating interactions between neurons and CX3CR1-expressing microglia. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:10896-10901.



- Harrison JK, Jiang Y, Wees EA, Salafranca MN, Liang HX, Feng L, Belardinelli L. Inflammatory agents regulate in vivo expression of fractalkine in endothelial cells of the rat heart. *J Leukoc Biol* 1999;66(6):937-944.
- Hase K, Murakami T, Takatsu H, Shimaoka T, Iimura M, Hamura K, Kawano K, Ohshima S, Chihara R, Itoh K, Yonehara S, Ohno H. The membrane-bound chemokine CXCL16 expressed on follicle-associated epithelium and M cells mediates lympho-epithelial interaction in GALT. *J Immunol* 2006;176:43-51.
- Haskell CA, Cleary MD, Charo IF. Unique role of the chemokine domain of fractalkine in cell capture. Kinetics of receptor dissociation correlate with cell adhesion. *J Biol Chem* 2000;275:34183-34189.
- Hatori K, Nagai A, Heisel R, Ryu JK, Kim SU. Fractalkine and fractalkine receptors in human neurons and glial cells. *J Neurosci Res* 2002;69:418-426.
- Hattermann K, Ludwig A, Gieselmann V, Held-Feindt J, Mentlein R. The chemokine CXCL16 induces migration and invasion of glial precursor cells via its receptor CXCR6. *Mol Cell Neurosci* 2008;39(1):133-141.
- Hattori H, Ito D, Tanahashi N, Murata M, Saito I, Watanabe K, Suzuki N. T280M and V249I polymorphisms of fractalkine receptor CX3CR1 and ischemic cerebrovascular disease. *Neurosci Lett* 2005;374:132-135.
- Hauser SL, Goodkin DE. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. In: Fauci AD, Braunwald E, Isselbacher JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, et al., editors. *Harrison's principle of internal medicine*. New York: McGraw Hill 1998;p2409-2419.
- Hauser SL, Goodkin SL. Multiple sclerosis and other demyelinating diseases. *Harrison's Principles in Internal Medicine* 2001;2452-2461.
- Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Curr Opin Neurol* 2002;15(3):227-231.
- Hendrickx DA, Koning N, Schuurman KG, van Strien ME, van Eden CG, Hamann J, Huitinga I. Selective upregulation of scavenger receptors in and around demyelinating areas in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2013;72(2):106-118.
- Hewison M. Vitamin D and the immune system: new perspectives on an old theme. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(2):365-379.

- Hofnagel O, Luechtenborg B, Plenz G, Robenek H. Expression of the novel scavenger receptor SR-PSOX in cultured aortic smooth muscle cells and umbilical endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002;22:710-711.
- Hohlfeld R, Wekerle H. Immunological update on multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol* 2001;14:299-304.
- Hohol MJ, Olek MJ, Orav EJ, Stazzone L, Hafler DA, Khoury SJ, Dawson DM, Weiner HL. Treatment of progressive multiple sclerosis with pulse cyclophosphamide/methylprednisolone: response to therapy is linked to the duration of progressive disease. *Mult Scler* 1999;5:403-409.
- Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1678S-1688S.
- Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM. The blood–brain barrier, chemokines and multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:220-230.
- Hoppenbrouwers IA, Aulchenko YS, Ebers GC, Ramagopalan SV, Oostra BA, van Duijn CM, Hintzen RQ. EVI5 is a risk gene for multiple sclerosis. *Genes Immun* 2008;9:334-337.
- Hoppenbrouwers IA, Aulchenko YS, Janssens AC, Ramagopalan SV, Broer L, Kayser M, Ebers GC, Oostra BA, van Duijn CM, Hintzen RQ. Replication of CD58 and CLEC16A as genome-wide significant risk genes for multiple sclerosis. *J Hum Genet* 2009;54(11):676-680.
- Hoppenbrouwers IA, Hintzen RQ. Genetics of multiple sclerosis. *Biochim Biophys Acta* 2011;1812:194-201.
- Hori S, Haury M, Coutinho A, Demengeot J. Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:8213-8218.
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CX3CR1%20homo%20sapiens>
- <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/publichtml/primer1.html>
- <http://cedar.genetics.soton.ac.uk/publichtml/primer2.html>
- <http://perlprimer.sourceforge.net>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/10663>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1524>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/58191>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/6376>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/68348719>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=1050998](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=1050998)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3732378](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3732378)

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=3732379](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=3732379)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CX3CL1%20homo%20sapiens>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CXCL16%20homo%20sapiens>

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp?term=CXCR6%20homo%20sapiens>

[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2277680](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2277680)

Huang D, Shi FD, Jung S, Pien GC, Wang J, Salazar-Mather TP, He TT, Weaver JT, Ljunggren HG, Biron CA, Littman DR, Ransohoff RM. The neuronal chemokine CX3CL1/fractalkine selectively recruits NK cells that modify experimental autoimmune encephalomyelitis within the central nervous system. *FASEB J* 2006;20(7):896-905.

Huang M, Han Y, Zhang X, Pei F, Deng J, Kang J, Yan C. An intron polymorphism in the CXCL16 gene is associated with increased risk of coronary artery disease in Chinese Han population: a large angiography-based study. *Atherosclerosis* 2010;210(1):160-165.

Hug A, Korporal M, Schröder I, Haas J, Glatz K, Storch-Hagenlocher B, Wildemann B. Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis. *J Immunol* 2003;171:432-437.

Huggins CE, Domenighetti AA, Ritchie ME, Khalil N, Favaloro JM, Proietto J, Smyth GK, Pepe S, Delbridge LM. Functional and metabolic remodelling in GLUT4-deficient hearts confers hyper-responsiveness to substrate intervention. *J Mol Cell Cardiol* 2008;44(2):270-280.

Hughes PM, Botham MS, Frentzel S, Mir A, Perry VH. Expression of fractalkine (CX3CL1) and its receptor, CX3CR1, during acute and chronic inflammation in the rodent CNS. *Glia* 2002;37:314-327.

Hulkower K, Brosnan CF, Aquino DA, Cammer W, Kulshrestha S, Guida MP, Rapoport DA, Berman JW. Expression of CSF-1, c-fms, and MCP-1 in the

- central nervous system of rats with experimental allergic encephalomyelitis. *J Immunol* 1993;150:2525-2533.
- Hulshof S, van Haastert ES, Kuipers HF, van den Elsen PJ, De Groot CJ, van der Valk P, Ravid R, Biber K. CX3CL1 and CX3CR1 expression in human brain tissue: noninflammatory control versus multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:899-907.
- Hundhausen C, Misztela D, Berkhout TA, Broadway N, Saftig P, Reiss K, Hartmann D, Fahrenholz F, Postina R, Matthews V, Kallen KJ, Rose-John S, Ludwig A. The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion. *Blood* 2003;102:1186-1195.
- Hundhausen C, Schulte A, Schulz B, Andrzejewski MG, Schwarz N, von Hundelshausen P, Winter U, Paliga K, Reiss K, Saftig P, Weber C, Ludwig A. Regulated shedding of transmembrane chemokines by the disintegrin and metalloproteinase 10 facilitates detachment of adherent leukocytes. *J Immunol* 2007;178:8064-8072.
- Hurst LA, Bunning RA, Couraud PO, Romero IA, Weksler BB, Sharrack B, Woodroffe MN. Expression of ADAM-17, TIMP-3 and fractalkine in the human adult brain endothelial cell line, hCMEC/D3, following pro-inflammatory cytokine treatment. *J Neuroimmunol* 2009;210(1-2):108-112.
- Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 2001;194:669-676.
- Ignatius R, Wei Y, Beaulieu S, Gettie A, Steinman RM, Pope M, Mojsov S. The immunodeficiency virus coreceptor, Bonzo/STRL33/TYMSTR, is expressed by macaque and human skin- and blood-derived dendritic cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 2000;16:1055-1059.
- Imai T, Hieshima K, Haskell C, Baba M, Nagira M, Nishimura M, Kakizaki M, Takagi S, Nomiyama H, Schall TJ, Yoshie O. Identification and molecular characterization of fractalkine receptor CX3CR1, which mediates both leukocyte migration and adhesion. *Cell* 1997;91:521-530.

- Imaizumi T, Matsumiya T, Fujimoto K, Okamoto K, Cui XF, Ohtaki U, Yoshida H, Satoh K. Interferon- $\gamma$  stimulates the expression of CX3CL1/fractalkine in cultured human endothelial cells. *Tohoku J Exp Med* 2000;192:127-139.
- Imaizumi T, Yoshida H, Satoh K. Regulation of CX3CL1/fractalkine expression in endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* 2004;11:15-21.
- IMSGC. Comprehensive follow-up of the first genome-wide association study of multiple sclerosis identifies KIF21B and TMEM39A as susceptibility loci. *Hum Mol Genet* 2010;19(5):953-962.
- IMSGC. Refining genetic associations in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008;7:567-569.
- IMSGC. The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes. *Genes Immun* 2009;10(1):11-14.
- IMSGC; Wellcome Trust Case Control Consortium. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nat* 2011;476:214-219.
- in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* 1981;127:1420-1423.
- Infante-Duarte C, Weber A, Kratzschmar J, Prozorovski T, Pikol S, Hamann I, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Dörr J, Wuerfel J, Stürzebecher CS, Zipp F. Frequency of blood CX3CR1-positive natural killer cells correlates with disease activity in multiple sclerosis patients. *FASEB J* 2005; express article 10.1096/fj.05-3832fje.
- Inoue A, Hasegawa H, Kohno M, Ito MR, Terada M, Imai T, Yoshie O, Nose M, Fujita S. Antagonist of fractalkine (CX3CL1) delays the initiation and ameliorates the progression of lupus nephritis in MRL/lpr mice. *Arthritis Rheum* 2005;52:1522-1533.
- International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nat* 2003;426:789-796.
- Isozaki T, Otsuka K, Sato M, Takahashi R, Wakabayashi K, Yajima N, Miwa Y, Kasama T. Synergistic induction of CX3CL1 by interleukin-1 $\beta$  and interferon- $\gamma$  in human lung fibroblasts: involvement of signal transducer and activator of transcription 1 signaling pathways. *Transl Res* 2011;157(2):64-70.

- IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res* 2002;22(10):1067-1068.
- Izquierdo MC, Sanz AB, Mezzano S, Blanco J, Carrasco S, Sanchez-Niño MD, Benito-Martín A, Ruiz-Ortega M, Egido J, Ortiz A. TWEAK (tumor necrosis factor-like weak inducer of apoptosis) activates CXCL16 expression during renal tubulointerstitial inflammation. *Kidney Int* 2012;81(11):1098-1107.
- Jakkula E, Leppä V, Sulonen AM, Varilo T, Kallio S, Kempainen A, Purcell S, Koivisto K, Tienari P, Sumelahti ML, Elovaara I, Pirttilä T, Reunanen M, Aromaa A, Oturai AB, Søndergaard HB, Harbo HF, Mero IL, Gabriel SB, Mirel DB, Hauser SL, Kappos L, Polman C, De Jager PL, Hafler DA, Daly MJ, Palotie A, Saarela J, Peltonen L. Genome-wide association study in a high-risk isolate for multiple sclerosis reveals associated variants in STAT3 gene. *Am J Hum Genet* 2010;86:285-291.
- Janes PW, Saha N, Barton WA, Kolev MV, Wimmer-Kleikamp SH, Nievergall E, Blobel CP, Himanen JP, Lackmann M, Nikolov DB. Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans. *Cell* 2005;123:291-304.
- Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1972;1(7762):1240-1241.
- Johanson CE, Duncan III JA, Klinge PM, Brinker T, Stopa EG, Silverberg GD. Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: new challenges in health and disease. *Cerebrospinal Fluid Res* 2008;5:10.
- Johnson KP. Control of multiple sclerosis relapses with immunomodulating agents. *J Neurol Sci* 2007;256(Suppl 1):S23–S28.
- Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, Butcher EC. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCRalpha beta NKT cell subsets. *J Immunol* 2003;171:2960–2969.
- Jones BA, Beamer M, Ahmed S. Fractalkine/CX3CL1: a potential new target for inflammatory diseases. *Mol Interv* 2010;10(5):263-270.
- Jung S, Aliberti J, Graemmel P, Sunshine MJ, Kreutzberg GW, Sher A, Littman DR. Analysis of fractalkine receptor CX(3)CR1 function by targeted deletion and

- green fluorescent protein reporter gene insertion. *Mol Cell Biol* 2000;20:4106-4114.
- Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med* 1948;4:653-662.
- Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* 2006;19(3):248-254.
- Kastenbauer S, Koedel U, Wick M, Kieseier BC, Hartung HP, Pfister HW. CSF and serum levels of soluble fractalkine (CX3CL1) in inflammatory diseases of the nervous system. *J Neuroimmunol* 2003;137:210-217.
- Ke X, Collins A, Ye S. PIRA PCR designer for restriction analysis of single nucleotide polymorphisms. *Bioinformatics* 2001;17:838-839.
- Kemppinen AK, Kaprio J, Palotie A, Saarela J. Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis. *BMJ Open* 2011;1:e000053.
- Khoury SJ, Guttmann CR, Orav EJ, Hohol MJ, Ahn SS, Hsu L, Kikinis R, Mackin GA, Jolesz FA, Weiner HL. Longitudinal MRI imaging in multiple sclerosis: correlation between disability and lesion burden. *Neurol* 1994;44:2120-2124.
- Kim CH, Johnston B, Butcher EC. Trafficking machinery of NKT cells: shared and differential chemokine receptor expression among V alpha 24(+)V beta 11(+) NKT cell subsets with distinct cytokine-producing capacity. *Blood* 2002;100:11-16.
- Kim CH, Kunkel EJ, Boisvert J, Johnston B, Campbell JJ, Genovese MC, Greenberg HB, Butcher EC. Bonzo/CXCR6 expression defines type 1-polarized T-cell subsets with extralymphoid tissue homing potential. *J Clin Invest* 2001;107(5):595-601.
- Kivisakk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, Khoury SJ. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol* 2009;65:457-469.
- Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, Campbell JJ, Ransohoff RM. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking

- through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8389-8394.
- Klein M, Paul R, Angele B, Popp B, Pfister HW, Koedel U. Protein expression pattern in experimental pneumococcal meningitis. *Microbes Infect* 2006;8(4):974-983.
- Koch M, Kingwell E, Rieckmann P, Tremlett H. The natural history of secondary progressive multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2010;81:1039-1043.
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, Sudo K, Iwakura Y. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:566-573.
- Koutsis G, Evangelopoulos ME, Andreadou E, Mandellos D, Karachalios G, Potagas C, Karantoni E, Karouli M, Chrysovitsanou C, Vassilopoulos D, Sfagos C. The onset of multiple sclerosis in Greece: a single-center study of 1,034 consecutive patients. *Eur Neurol* 2010;63:350-356.
- Kriegova E, Fillerova R, Tomankova T, Hutyrova B, Mrazek F, Tichy T, Kolek V, du Bois RM, Petrek M. T-helper cell type-1 transcription factor T-bet is upregulated in pulmonary sarcoidosis. *Eur Respir J* 2011;38(5):1136-1144.
- Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisakk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 2006;129:200-211.
- Kumar M, Putzki N, Limmroth V, Remus R, Lindemann M, Knop D, Mueller N, Hardt C, Kreuzfelder E, Grosse-Wilde H. CD4+CD25+FoxP3+ T lymphocytes fail to suppress myelin basic protein induced proliferation in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2006;180:178-184.
- Kunkel LM, Smith KD, Boyer SH, Borgaonkar DS, Wachtel SS, Miller OJ, Breg WR. Analysis of human Y chromosome specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977;74:1245-1249.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurol* 1983;33(11):1444-1452.
- Lalive PH. Autoantibodies in inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Swiss Med Wkly* 2008;138:692-707.



- Lavergne E, Labreuche J, Daoudi M, Debre P, Cambien F, Deterre P, Amarenco P, Combadiere C. Adverse associations between CX3CR1 polymorphisms and risk of cardiovascular or cerebrovascular disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2005;25:847-853.
- le Blanc LM, van Lieshout AW, Adema GJ, van Riel PL, Verbeek MM, Radstake TR. CXCL16 is elevated in the cerebrospinal fluid versus serum and in inflammatory conditions with suspected and proved central nervous system involvement. *Neurosci Lett* 2006;397(1-2):145-148.
- Lee SJ, Namkoong S, Kim YM, Kim CK, Lee H, Ha KS, Chung HT, Kwon YG, Kim YM. Fractalkine stimulates angiogenesis by activating the Raf-1/MEK/ERK- and PI3K/Akt/eNOS-dependent signal pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2836-H2846.
- Li DK, Zhao GJ, Paty DW. Randomized controlled trial of interferon-beta-1a in secondary progressive MS: MRI results. *Neurol* 2001;56:1505-1513.
- Liao F, Alkhatib G, Peden KW, Sharma G, Berger EA, Farber JM. STRL33, A novel chemokine receptor-like protein, functions as a fusion cofactor for both macrophage-tropic and T cell line-tropic HIV-1. *J Exp Med* 1997;185(11):2015-2023.
- Libbey JE, McCoy LL, Fujinami RS. Molecular mimicry in multiple sclerosis. *Int Rev Neurobiol* 2007;79:127-147.
- Limou S, Coulonges C, Herbeck JT, van Manen D, An P, Le Clerc S, Delaneau O, Diop G, Taing L, Montes M, van't Wout AB, Gottlieb GS, Therwath A, Rouzioux C, Delfraissy JF, Lelièvre JD, Lévy Y, Hercberg S, Dina C, Phair J, Donfield S, Goedert JJ, Buchbinder S, Estaquier J, Schächter F, Gut I, Froguel P, Mullins JJ, Schuitemaker H, Winkler C, Zagury JF. Multiple-cohort genetic association study reveals CXCR6 as a new chemokine receptor involved in long-term nonprogression to AIDS. *J Infect Dis* 2010;202(6):908-915.
- Lin Z, Gong Q, Zhou Z, Zhang W, Liao S, Liu Y, Yan X, Pan X, Lin S, Li X. Increased plasma CXCL16 levels in patients with chronic kidney diseases. *Eur J Clin Invest* 2011;41(8):836-845.
- Lindberg RL, De Groot CJ, Certa U, Ravid R, Hoffmann F, Kappos L, Leppert D. Multiple sclerosis as a generalized CNS disease-comparative microarray

- analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *J Neuroimmunol* 2004;152:154-167.
- Lindia JA, McGowan E, Jochnowitz N, Abbadie C. Induction of CX3CL1 expression in astrocytes and CX3CR1 in microglia in the spinal cord of a rat model of neuropathic pain. *J Pain* 2005;6:434-438.
- Link H, Sun JB, Wang Z, Xu Z, Löve A, Fredrikson S, Olsson T. Virus-reactive and autoreactive T cells are accumulated in cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1992;38:63-73.
- Liu W, Yin L, Chen C, Dai Y. Function modification of SR-PSOX by point mutations of basic amino acids. *Lipids Health Dis* 2011;10:59.
- Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med* 2002;8:500-508.
- Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurol* 1996;46(4):907-911.
- Lucas AD, Bursill C, Guzik TJ, Sadowski J, Channon KM, Greaves DR. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques express the fractalkine receptor CX3CR1 and undergo chemotaxis to the CX3C chemokine fractalkine (CX3CL1). *Circulation* 2003;108:2498-2504.
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 2000;47:707-717.
- Ludwig A, Berkhout T, Moores K, Groot P, Chapman G. Fractalkine is expressed by smooth muscle cells in response to IFN $\gamma$  and TNF- $\alpha$  and is modulated by metalloproteinase activity. *J Immunol* 2002;168:604-612.
- Ludwig A, Weber C. Transmembrane chemokines: versatile 'special agents' in vascular inflammation. *Thromb Haemost* 2007;97(5):694-703.

- Ludwig<sup>a</sup> A, Hundhausen C, Lambert MH, Broadway N, Andrews RC, Bickett DM, Leesnitzer MA, Becherer JD. Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol esterinducible shedding of cell surface molecules. *Comb Chem High Throughput Screen* 2005;8:161-171.
- Ludwig<sup>b</sup> A, Schulte A, Schnack C, Hundhausen C, Reiss K, Broadway N, Held-Feindt J, Mentlein R. Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. *J Neurochem* 2005;93(5):1293-1303.
- Lundberg GA, Kellin A, Samnegård A, Lundman P, Tornvall P, Dimmeler S, Zeiher AM, Hamsten A, Hansson GK, Eriksson P. Severity of coronary artery stenosis is associated with a polymorphism in the CXCL16/SR-PSOX gene. *J Intern Med* 2005;257(5):415-422.
- Luo Y, Berman MA, Zhai Q, Fischer FR, Abromson-Leeman SR, Zhang Y, Kuziel WA, Gerard C, Dorf ME. RANTES stimulates inflammatory cascades and receptor modulation in murine astrocytes. *Glia* 2002;39:19-30.
- Maciejewski-Lenoir D, Chen S, Feng L, Maki R, Bacon KB. Characterization of fractalkine in rat brain cells: migratory and activation signals for CX3CR1-expressing microglia. *J Immunol* 1999;163:1628-1635.
- Maghazachi AA. G protein-coupled receptors in natural killer cells. *J Leukoc Biol* 2003;74:16-24.
- Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisakk P, Tucky B, Kidd G, Kingsbury GA, Chang A, Fox RJ, Mack M, Sniderman MB, Ravid R, Staugaitis SM, Stins MF, Ransohoff RM. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain* 2006;129:212-223.
- Mahad DJ, Lawry J, Howell SJ, Woodroffe MN. Longitudinal study of chemokine receptor expression on peripheral lymphocytes in multiple sclerosis: CXCR3 upregulation is associated with relapse. *Mult Scler* 2003;9(2):189-198.
- Mandel M, Gurevich M, Pazner R, Kaminski N, Achiron A. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol* 2004;138:164-170.

- Mantovani A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. *Immunol Today* 1999;20:254-257.
- Matloubian M, David A, Engel S, Ryan JE, Cyster JG. A transmembrane CXC chemokine is a ligand for HIV-coreceptor Bonzo. *Nat Immunol* 2000;1:298-304.
- Matsumiya T, Imaizumi T, Fujimoto K, Cui X, Shibata T, Tamo W, Kumagai M, Tanji K, Yoshida H, Kimura H, Satoh K. Soluble interleukin-6 receptor alpha inhibits the cytokine- Induced fractalkine/CX3CL1 expression in human vascular endothelial cells in culture. *Exp Cell Res* 2001;269:35-41.
- Matsumiya T, Ota K, Imaizumi T, Yoshida H, Kimura H, Satoh K. Characterization of synergistic induction of CX3CL1/fractalkine by TNF-alpha and IFN-gamma in vascular endothelial cells: an essential role for TNF-alpha in post-transcriptional regulation of CX3CL1. *J Immunol* 2010;184(8):4205-4214.
- Matzhold EM, Trummer O, Grünbacher G, Zulus B, Boehm BO, März W, Renner W. Association of polymorphisms in the chemokine receptor CX3CR1 gene with coronary artery disease. *Cytokine* 2009;47:224-227.
- Mayne M, Moffatt T, Kong H, McLaren PJ, Fowke KR, Becker KG, Namaka M, Schenck A, Bardoni B, Bernstein CN, Melanson M. CYFIP2 is highly abundant in CD4+ cells from multiple sclerosis patients and is involved in T cell adhesion. *Eur J Immunol* 2004;34:1217-1227.
- McCandless EE, Budde M, Lees JR, Dorsey D, Lyng E, Klein RS. IL-1R signaling within the central nervous system regulates CXCL12 expression at the blood-brain barrier and disease severity during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2009;183:613-620.
- McCandless EE, Piccio L, Woerner BM, Schmidt RE, Rubin JB, Cross AH, Klein RS. Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172:799-808.
- McCandless EE, Wang Q, Woerner BM, Harper JM, Klein RS. CXCL12 limits inflammation by localizing mononuclear infiltrates to the perivascular space during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:8053-8064.
- McDermott DH, Fong AM, Yang Q, Sechler JM, Cupples LA, Merrell MN, Wilson PW, D'Agostino RB, O'Donnell CJ, Patel DD, Murphy PM. Chemokine receptor

- mutant CX3CR1–M280 has impaired adhesive function and correlates with protection from cardiovascular disease in humans. *J Clin Invest* 2003;111:1241-1250.
- McDermott DH, Halcox JP, Schenke WH, Waclawiw MA, Merrell MN, Epstein N, Quyyumi AA, Murphy PM. Association between polymorphism in the chemokine receptor CX3CR1 and coronary vascular endothelial dysfunction and atherosclerosis. *Circ Res* 2001;89:401-407.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
- McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol* 2007;8:913-919.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderson SM. Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 2005;175:3025-3032.
- Meucci O, Fatatis A, Simen AA, Miller RJ. Expression of CX3CR1 chemokine receptors on neurons and their role in neuronal survival. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:8075-8080.
- Minami M, Kume N, Shimaoka T, Kataoka H, Hayashida K, Akiyama Y, Nagata I, Ando K, Nobuyoshi M, Hanyuu M, Komeda M, Yonehara S, Kita T. Expression of SR-PSOX, a novel cell-surface scavenger receptor for phosphatidylserine and oxidized LDL in human atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001;21:1796-1800.
- Misko TP, Trotter JL, Cross AH. Mediation of inflammation by encephalitogenic cells: interferon gamma induction of nitric oxide synthase and cyclooxygenase 2. *J Neuroimmunol* 1995;61:195-204.
- Mizuno T, Kawanokuchi J, Numata K, Suzumura A. Production and neuroprotective functions of fractalkine in the central nervous system. *Brain Res* 2003;979:65-70.

- Moatti D, Faure S, Fumeron F, Amara MW, Seknadji P, McDermott DH, Debré P, Aumont MC, Murphy PM, de Prost D, Combadière C. Polymorphism in the fractalkine receptor CX3CR1 as a genetic risk factor for coronary artery disease. *Blood* 2001;97:1925-1928.
- Mortier A, Gouwy M, Van Damme J, Proost P. Effect of posttranslational processing on the in vitro and in vivo activity of chemokines. *Exp Cell Res* 2011;317:642-654.
- Mortier A, Van Damme J, Proost P. Regulation of chemokine activity by posttranslational modification. *Pharmacol Ther* 2008;120:197-217.
- Muehlhoefer A, Saubermann LJ, Gu X, Luedtke-Heckenkamp K, Xavier R, Blumberg RS, Podolsky DK, MacDermott RP, Reinecker HC. Fractalkine is an epithelial and endothelial cell-derived chemoattractant for intraepithelial lymphocytes in the small intestinal mucosa. *J Immunol* 2000;164:3368-3376.
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25 hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* 2006;296:2832-2838.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E, Hernán MA, Olek MJ, Willett WC, Ascherio A. Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurol* 2004;62:60-65.
- Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood* 2000;95:3032-3043.
- Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW. cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions: detection of genes associated with disease activity. *Brain* 2003;126:1048-1057.
- Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW. Microarray gene expression profiling of chronic active and inactive lesions in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg* 2004;106:223-229.
- Nagy Z, Peters H, Huttner I. Fracture faces of cell junctions in cerebral endothelium during normal and hyperosmotic conditions. *Lab Invest* 1984;50:313-322.
- Naito S, Namerow N, Mickey MR, Terasaki PI. Multiple sclerosis: association with HL-A3. *Tissue Antigens* 1972;2(1):1-4.
- Nakajima H, Fukuda K, Doi Y, Sugino M, Kimura F, Hanafusa T, Ikemoto T, Shimizu A. Expression of TH1/TH2-related chemokine receptors on peripheral T cells and correlation with clinical disease activity in patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 2004;52(3):162-168.

- Nakayama T, Hieshima K, Izawa D, Tatsumi Y, Kanamaru A, Yoshie O. Cutting edge: profile of chemokine receptor expression on human plasma cells accounts for their efficient recruitment to target tissues. *J Immunol* 2003;170:1136-1140.
- Navikas V, Link H. Review: cytokines and the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 1996;45:322-333.
- Neves SR, Ram PT, Iyengar R. G protein pathways. *Science* 2002;296:1636-1639.
- Newton CR, Heptinstall LE, Summers C, Super M, Schwarz M, Anwar R, Graham A, Smith JC, Markham AF. Amplification refractory mutation system for prenatal diagnosis and carrier assessment in cystic fibrosis. *Lancet* 1989;2(8678-8679):1481-1483.
- Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sorensen PS, Hjalgrim H. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 2007;64 (1):72-75.
- Niess JH, Brand S, Gu X, Landsman L, Jung S, McCormick BA, Vyas JM, Boes M, Ploegh HL, Fox JG, Littman DR, Reinecker HC. CX3CR1-mediated dendritic cell access to the intestinal lumen and bacterial clearance. *Science* 2005;307:254-258.
- Nischwitz S, Cepok S, Kroner A, Wolf C, Knop M, Muller-Sarnowski F, Pfister H, Roeske D, Rieckmann P, Hemmer B, Ising M, Uhr M, Bettecken T, Holsboer F, Müller-Myhsok B, Weber F. Evidence for VAV2 and ZNF433 as susceptibility genes for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2010;227:162-166.
- Nishimura M, Umehara H, Nakayama T, Yoneda O, Hieshima K, Kakizaki M, Dohmae N, Yoshie O, Imai T. Dual functions of fractalkine/CX3C ligand 1 in trafficking of perforin+/granzyme B+ cytotoxic effector lymphocytes that are defined by CX3CR1 expression. *J Immunol* 2002;168:6173–6180.
- Nishiyori A, Minami M, Ohtani Y, Takami S, Yamamoto J, Kawaguchi N, Kume T, Akaike A, Satoh M. Localization of fractalkine and CX3CR1 mRNAs in rat brain: does fractalkine play a role in signaling from neuron to microglia? *FEBS Lett* 1998;429:167-172.
- Nomiyama H, Imai T, Kusuda J, Miura R, Callen DF, Yoshie O. Human chemokines fractalkine (SCYD1), MDC (SCYA22) and TARC (SCYA17) are clustered on chromosome 16q13. *Cytogenet Cell Genet* 1998;81:10-11.

- Noseworthy JH, Lucchinetti C, Rodriguez M, Weinshenker BG. Multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2000;343(13):938-952.
- O'Connor RA, Prendergast CT, Sabatos CA, Lau CW, Leech MD, Wraith DC, Anderton SM. Cutting edge: Th1 cells facilitate the entry of Th17 cells to the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; 181:3750-3754.
- Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev* 2008;9:516-526.
- Olsson T, Zhi WW, Höjeberg B, Kostulas V, Jiang YP, Anderson G, Ekre HP, Link H. Autoreactive T lymphocytes in multiple sclerosis determined by antigen-induced secretion of interferon-gamma. *J Clin Invest* 1990;86:981-985.
- Owens GP, Ritchie AM, Burgoon MP, Williamson RA, Corboy JR, Gilden DH. Single-cell repertoire analysis demonstrates that clonal expansion is a prominent feature of the B cell response in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *J Immunol* 2003;171:2725-2733.
- Owens T, Bechmann I, Engelhardt B. Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008;67:1113-1121.
- Pan Y, Lloyd C, Zhou H, Dolich S, Deeds J, Gonzalo JA, Vath J, Gosselin M, Ma J, Dussault B, Woolf E, Alperin G, Culpepper J, Gutierrez-Ramos JC, Gearing D. Neurotactin, a membrane-anchored chemokine upregulated in brain inflammation. *Nat* 1997;387(6633):611-617.
- Parczewski M, Leszczyszyn-Pynka M, Kaczmarczyk M, Adler G, Binczak-Kuleta A, Loniewska B, Boron-Kaczmarska A, Ciechanowicz A. Sequence variants of chemokine receptor genes and susceptibility to HIV-1 infection. *J Appl Genet* 2009;50(2):159-166.
- Patel DN, Bailey SR, Gresham JK, Schuchman DB, Shelhamer JH, Goldstein BJ, Foxwell BM, Stemerman MB, Maranchie JK, Valente AJ, Mummidi S, Chandrasekar B. TLR4-NOX4-AP-1 signaling mediates lipopolysaccharide-induced CXCR6 expression in human aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2006;347(4):1113-1120.
- Pearl MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW. Identification and functional significance of genes regulated by



- structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102(10):3697-3702.
- Peraire J, Vidal F, Plana M, Domingo P, Coll B, Viladés C, Garcia F, Veloso S, Gatell JM, Broch M. Polymorphisms in the 3' untranslated region of the fractalkine (CX3CL1) gene and the risk of HIV-1 infection and disease progression. *AIDS* 2007;21(7):891-893.
- Petit SJ, Chayen NE, Pease JE. Site-directed mutagenesis of the chemokine receptor CXCR6 suggests a novel paradigm for interactions with the ligand CXCL16. *Eur J Immunol* 2008;38(8):2337-2350.
- Petit SJ, Wise EL, Chambers JC, Sehmi J, Chayen NE, Kooner JS, Pease JE. The CXCL16 A181V mutation selectively inhibits monocyte adhesion to CXCR6 but is not associated with human coronary heart disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2011;31(4):914-920.
- Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol* 1981;127(4):1420-1423.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 2002;30(9):e36.
- Pierce KL, Premont RT, Lefkowitz RJ. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2002;3:639-650.
- Plant D, Young HS, Watson RE, Worthington J, Griffiths CE. The CX3CL1-CX3CR1 system and psoriasis. *Exp Dermatol* 2006;15(11):900-903.
- Proost P, Loos T, Mortier A, Schutyser E, Gouwy M, Noppen S, Dillen C, Ronsse I, Conings R, Struyf S, Opdenakker G, Maudgal PC, Van Damme J. Citrullination of CXCL8 by peptidylarginine deiminase alters receptor usage, prevents proteolysis, and dampens tissue inflammation. *J Exp Med* 2008;205:2085-2097.
- Qin Y, Duquette P, Zhang Y, Talbot P, Poole R, Antel J. Clonal expansion and somatic hypermutation of V (H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Clin Invest* 1998;102:1045-1050.

- Raine CS. The Dale E. McFarlin Memorial Lecture: the immunology of the multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 1994;36:Suppl:S61-S72.
- Ramagopalan SV, Anderson C, Sadovnick AD, Ebers GE. Genome wide study of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2007;357:2199-2200.
- Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dyment DA, Deluca GC, Herrera BM, Chao MJ, Sadovnick AD, Ebers GC, Knight JC. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet* 2009;5(2):e1000369.
- Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Nguyen LT, Badgett D, Miller C, Patrick K, Brownscheidle C, Jacobs L. In vivo gene expression revealed by cDNA arrays: the pattern in relapsing-remitting multiple sclerosis patients compared with normal subjects. *J Neuroimmunol* 2001;116:213-219.
- Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, Shick HE, Major JA, Estes ML, Thomas DM, Tuohy VK. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J* 1993;7:592-600.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 2003;3:569-581.
- Ransohoff RM. Immunology: in the beginning. *Nat* 2009;462:41-42.
- Raouf A, Zhao Y, To K, Stingl J, Delaney A, Barbara M, Iscove N, Jones S, McKinney S, Emerman J, Aparicio S, Marra M, Eaves C. Transcriptome analysis of the normal human mammary cell commitment and differentiation process. *Cell Stem Cell* 2008;3(1):109-118.
- Reiss K, Ludwig A, Saftig P. Breaking up the tie: Disintegrin-like metalloproteinases as regulators of cell migration in inflammation and invasion. *Pharmacol Ther* 2006;111:985-1006.
- Rimaniol AC, Till SJ, Garcia G, Capel F, Godot V, Balabanian K, Durand-Gasselien I, Varga EM, Simonneau G, Emilie D, Durham SR, Humbert M. The CX3C chemokine fractalkine in allergic asthma and rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2003;112:1139-1146.
- Rollins BJ. Chemokines. *Blood* 1997;90:909-928.

- Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol* 2000;18:217-242.
- Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, Achiti I, Confavreux C, Coustans M, le Page E, Edan G, McDonnell GV, Hawkins S, Trojano M, Liguori M, Cocco E, Marrosu MG, Tesser F, Leone MA, Weber A, Zipp F, Mitterski B, Epplen JT, Oturai A, Sørensen PS, Celius EG, Lara NT, Montalban X, Villoslada P, Silva AM, Marta M, Leite I, Dubois B, Rubio J, Butzkueven H, Kilpatrick T, Mycko MP, Selmaj KW, Rio ME, Sá M, Salemi G, Savettieri G, Hillert J, Compston DA. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurol* 2005;64(7):1144-1151.
- Rubio JP, Stankovich J, Field J, Tubridy N, Marriott M, Chapman C, Bahlo M, Perera D, Johnson LJ, Tait BD, Varney MD, Speed TP, Taylor BV, Foote SJ, Butzkueven H, Kilpatrick TJ. Replication of KIAA0350, IL2RA, RPL5 and CD58 as multiple sclerosis susceptibility genes in Australians. *Genes Immun* 2008;9:624-630.
- Rusić-Stojiljković M. Osnovni principi molekularne neurobiologije. *Nova prosveta* 1998; 10:169-178.
- Ruth JH, Volin MV, Haines GK, 3rd, Woodruff DC, Katschke KJ, Jr., Woods JM, Park CC, Morel JC, Koch AE. Fractalkine, a novel chemokine in rheumatoid arthritis and in rat adjuvant-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 2001;44:1568-1581.
- Sabate JM, Ameziane N, Lamoril J, Jouet P, Farmachidi JP, Soule JC, Harnois F, Sobhani I, Jian R, Deybach JC, de Prost D, Coffin B. The V249I polymorphism of the CX3CR1 gene is associated with fibrostenotic disease behavior in patients with Crohn's disease. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2008;20:748-755.
- Sanna S, Pitzalis M, Zoledziwska M, Zara I, Sidore C, Murru R, Whalen MB, Busonero F, Maschio A, Costa G, Melis MC, Deidda F, Poddie F, Morelli L, Farina G, Li Y, Dei M, Lai S, Mulas A, Cuccuru G, Porcu E, Liang L, Zavattari P, Moi L, Deriu E, Urru MF, Bajorek M, Satta MA, Cocco E, Ferrigno P, Sotgiu S, Pugliatti M, Traccis S, Angius A, Melis M, Rosati G, Abecasis GR, Uda M, Marrosu MG, Schlessinger D, Cucca F. Variants within the immunoregulatory CBLB gene are associated with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2010;42:495-497.

- Sato T, Thorlacius H, Johnston B, Staton TL, Xiang W, Littman DR, Butcher EC. Role for CXCR6 in recruitment of activated CD8+ lymphocytes to inflamed liver. *J Immunol* 2005;174:277-283.
- Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damageregulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2005;18:537-550.
- Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Onoue H, Aranami T, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Saito T, Ohta M, Miyake S, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. T cell gene expression profiling identifies distinct subgroups of Japanese multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol* 2006;174:108-118.
- Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, Daly MJ, De Jager PL, Walsh E, Lander ES, Rioux JD, Hafler DA, Ivinson A, Rimmler J, Gregory SG, Schmidt S, Pericak-Vance MA, Akesson E, Hillert J, Datta P, Oturai A, Ryder LP, Harbo HF, Spurkland A, Myhr KM, Laaksonen M, Booth D, Heard R, Stewart G, Lincoln R, Barcellos LF, Hauser SL, Oksenberg JR, Kenealy SJ, Haines JL; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2005;77:454-467.
- Schafer A, Schulz C, Eigenthaler M, Fraccarollo D, Kobsar A, Gawaz M, Ertl G, Walter U, Bauersachs J. Novel role of the membrane-bound chemokine fractalkine in platelet activation and adhesion. *Blood* 2004;103:407-412.
- Schafer A, Schulz C, Fraccarollo D, Tas P, Leutke M, Eigenthaler M, Seidl S, Heider P, Ertl G, Massberg S, Bauersachs J. The CX3C chemokine fractalkine induces vascular dysfunction by generation of superoxide anions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007;27:55-62.
- Seiderer J, Dambacher J, Leistner D, Tillack C, Glas J, Niess JH, Pfennig S, Jürgens M, Müller-Myhsok B, Göke B, Ochsenkühn T, Lohse P, Reinecker HC, Brand S. Genotype-phenotype analysis of the CXCL16 p.Ala181Val polymorphism in inflammatory bowel disease. *Clin Immunol* 2008;127(1):49-55.

- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol* 2004;14:164-174.
- Sharron M, Pohlmann S, Price K, Lolis E, Tsang M, Kirchhoff F, Doms RW, Lee B. Expression and coreceptor activity of STRL33/Bonzo on primary peripheral blood lymphocytes. *Blood* 2000;96:41-49.
- Shashkin P, Simpson D, Mishin V, Chesnutt B, Ley K. Expression of CXCL16 in human T cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:148-149.
- Shiina T, Inoko H, Kulski JK. An update of the HLA genomic region, locus information and disease associations: 2004. *Tissue Antigens* 2004;64:631-649.
- Shimaoka T, Kume N, Minami M, Hayashida K, Kataoka H, Kita T, Yonehara S. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J Biol Chem* 2000;275:40663-40666.
- Shimaoka T, Nakayama T, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cutting edge: SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates bacterial phagocytosis by APCs through its chemokine domain. *J Immunol* 2003;171:1647-1651.
- Shimaoka<sup>a</sup> T, Nakayama T, Hieshima K, Kume N, Fukumoto N, Minami M, Hayashida K, Kita T, Yoshie O, Yonehara S. Chemokines generally exhibit scavenger receptor activity through their receptor-binding domain. *J Biol Chem* 2004;279(26):26807-26810.
- Shimaoka<sup>b</sup> T, Nakayama T, Fukumoto N, Kume N, Takahashi S, Yamaguchi J, Minami M, Hayashida K, Kita T, Ohsumi J, Yoshie O, Yonehara S. Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* 2004;75:267-274.
- Simpson<sup>a</sup> JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroffe MN. Expression of the interferon-gamma-inducible chemokines IP-10 and Mig and their receptor, CXCR3, in multiple sclerosis lesions. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2000;26:133-142.
- Simpson<sup>b</sup> J, Rezaie P, Newcombe J, Cuzner ML, Male D, Woodroffe MN. Expression of the beta-chemokine receptors CCR2, CCR3 and CCR5 in multiple sclerosis central nervous system tissue. *J Neuroimmunol* 2000;108(1-2):192-200.

- Sloka JS. The mechanism of action of methylprednisolone in the treatment of multiple sclerosis. *Mult Scler* 2005;11:425-432.
- Sodhi A, Montaner S, Gutkind JS. Viral hijacking of G-protein-coupled receptor signalling networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:998-1012.
- Sorensen TL, Tani M, Jensen J, Pierce V, Lucchinetti C, Folcik VA, Qin S, Rottman J, Sellebjerg F, Strieter RM, Frederiksen JL, Ransohoff RM. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest* 1999;103:807-815.
- Soriano SG, Amaravadi LS, Wang YF, Zhou H, Yu GX, Tonra JR, Fairchild-Huntress V, Fang Q, Dunmore JH, Huszar D, Pan Y. Mice deficient in fractalkine are less susceptible to cerebral ischemia-reperfusion injury. *J Neuroimmunol* 2002;125:59-65.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005;23:683-747.
- Sporer B, Kastenbauer S, Koedel U, Arendt G, Pfister HW. Increased intrathecal release of soluble fractalkine in HIV-infected patients. *AIDS Res Hum Retrovir* 2003;19:111-116.
- Stefflerl A, Storch MK, Linington C, Stadelmann C, Lassmann H, Pohl T, Holsboer F, Tilders FJ, Reul JM. Disease progression in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis is associated with reduced inflammation-driven production of corticosterone. *Endocrinology* 1991;142:3612-3616.
- Steinman L. Multiple sclerosis: a coordinated immunological attack against myelin in the central nervous system. *Cell* 1996;85(3):299-302.
- Stojković L, Djurić T, Stanković A, Dinčić E, Stančić O, Veljković N, Alavantić D, Zivković M. The association of V249I and T280M fractalkine receptor haplotypes with disease course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012;245(1-2):87-92.
- Strader CD, Fong TM, Tota MR, Underwood D, Dixon RA. Structure and function of G protein-coupled receptors. *Annu Rev Biochem* 1994;63:101-132.
- Sun Y, Chang Z, Zhang S. Increased serum CXCL16 level is a marker for acute coronary syndromes. *Arch Med Res* 2008;39(3):332-337.

- Sundqvist E, Baarnhielm M, Alfredsson L, Hillert J, Olsson T, Kockum I. Confirmation of association between multiple sclerosis and CYP27B1. *Eur J Hum Genet* 2010;18(12):1349-1352.
- Sunnemark D, Eltayeb S, Nilsson M, Wallstrom E, Lassmann H, Olsson T, Berg AL, Ericsson-Dahlstrand A. CX3CL1 (fractalkine) and CX3CR1 expression in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis: kinetics and cellular origin. *J Neuroinflammation* 2005;2:17.
- t Hart BA, Laman JD, Bauer J, Blezer E, van Kooyk Y, Hintzen RQ. Modelling of multiple sclerosis: lessons learned in a non-human primate. *Lancet Neurol* 2004;3(10):588-597.
- t Hart BA, Massacesi L. Clinical, pathological, and immunologic aspects of the multiple sclerosis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neuropathol Exp Neurol* 2009;68:341-355.
- Tabata S, Kadowaki N, Kitawaki T, Shimaoka T, Yonehara S, Yoshie O, Uchiyama T. Distribution and kinetics of SR-PSOX/CXCL16 and CXCR6 expression on human dendritic cell subsets and CD4+ T cells. *J Leukoc Biol* 2005;77:777-786.
- Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberga AE, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res* 2003;119:170-183.
- Takeda S, Kadowaki S, Haga T, Takaesu H, Mitaku S. Identification of G protein-coupled receptor genes from the human genome sequence. *FEBS Lett* 2002;520:97-101.
- Tarozzo G, Bortolazzi S, Crochemore C, Chen SC, Lira AS, Abrams JS, Beltramo M. Fractalkine protein localization and gene expression in mouse brain. *J Neurosci Res* 2003;73:81-88.
- Teupser D, Pavlides S, Tan M, Gutierrez-Ramos JC, Kolbeck R, Breslow JL. Major reduction of atherosclerosis in fractalkine (CX3CL1)-deficient mice is at the brachiocephalic artery, not the aortic root. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:17795-17800.
- Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nat Immunol* 2001;2:129-134.

- Thomas SY, Hou R, Boyson JE, Means TK, Hess C, Olson DP, Strominger JL, Brenner MB, Gumperz JE, Wilson SB, Luster AD. CD1d-restricted NKT cells express a chemokine receptor profile indicative of Th1-type inflammatory homing cells. *J Immunol* 2003;171:2571-2580.
- Traugott U, Lebon P. Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann Neurol* 1988;24:243-251.
- Tregouet DA, Escolano S, Tiret L, Mallet A, Golmard JL. A new maximum likelihood algorithm for haplotype-based association analysis: the SEM algorithm. *Ann Hum Genet* 2004;68:165-177.
- Tremblay K, Lemire M, Provost V, Pastinen T, Renaud Y, Sandford AJ, Laviolette M, Hudson TJ, Laprise C. Association study between the CX3CR1 gene and asthma. *Genes Immun* 2006;7:632-639.
- Tremlett H, Paty D, Devonshire V. Disability progression in multiple sclerosis is slower than previously reported. *Neurol* 2006;66:172-177.
- Trojano M, Pellegrini F, Paolicelli D, Fuiani A, Zimatore GB, Tortorella C, Simone IL, Patti F, Ghezzi A, Portaccio E, Rossi P, Pozzilli C, Salemi G, Lugaresi A, Bergamaschi R, Millefiorini E, Clerico M, Lus G, Vianello M, Avolio C, Cavalla P, Iaffaldano P, Drenzo V, D'Onghia M, Lepore V, Livrea P, Comi G, Amato MP. Post-marketing of disease modifying drugs in multiple sclerosis: an exploratory analysis of gender effect in interferon beta treatment. *J Neurol Sci* 2009;286:109-113.
- Tsou CL, Haskell CA, Charo IF. Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme mediates the inducible cleavage of fractalkine. *J Biol Chem* 2001;276(48):44622-44626.
- Ueland T, Smedbakken LM, Hallén J, Atar D, Januzzi JL, Halvorsen B, Jensen JK, Aukrust P. Soluble CXCL16 and long-term outcome in acute ischemic stroke. *Atherosclerosis* 2012;220(1):244-249.
- Umehara H, Bloom ET, Okazaki T, Nagano Y, Yoshie O, Imai T. Fractalkine in vascular biology: From basic research to clinical disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:34-40.
- Unutmaz D, Xiang W, Sunshine MJ, Campbell J, Butcher E, Littman DR. The primate lentiviral receptor Bonzo/STRL33 is coordinately regulated with CCR5 and its



- expression pattern is conserved between human and mouse. *J Immunol* 2000;165(6):3284-3292.
- Uzawa A, Mori M, Hayakawa S, Masuda S, Nomura F, Kuwabara S. Expression of chemokine receptors on peripheral blood lymphocytes in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *BMC Neurol* 2010;10:113.
- van der Voort R, van Lieshout AW, Toonen LW, Slöetjes AW, van den Berg WB, Figdor CG, Radstake TR, Adema GJ. Elevated CXCL16 expression by synovial macrophages recruits memory T cells into rheumatoid joints. *Arthritis Rheum* 2005;52(5):1381-1391.
- Vartanian T, Li Y, Zhao M, Stefansson K. Interferon-gamma-induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Mol Med* 1975;1:732-743.
- Veljković V, Veljković N, Esté JA, Hüther A, Dietrich U. Application of the EIIP/ISM bioinformatics concept in development of new drugs. *Curr Med Chem* 2007;14:441-453.
- Verge GM, Milligan ED, Maier SF, Watkins LR, Naeve GS, Foster AC. Fractalkine (CX3CL1) and fractalkine receptor (CX3CR1) distribution in spinal cord and dorsal root ganglia under basal and neuropathic pain conditions. *Eur J Neurosci* 2004;20:1150-1160.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA. Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 2004;199:971-979.
- Virgintino D, Robertson D, Errede M, Benagiano V, Girolamo F, Maiorano E, Roncali L, Bertossi M. Expression of P-glycoprotein in human cerebral cortex microvessels. *J Histochem Cytochem* 2002;50:1671-1676.
- Vyshkina T, Kalman B. Autoantibodies and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Lab Invest* 2008;88:796-807.
- Wagsater D, Olofsson PS, Norgren L, Stenberg B, Sirsjo A. The chemokine and scavenger receptor CXCL16/SR-PSOX is expressed in human vascular smooth muscle cells and is induced by interferongamma. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;325:1187-1193.

- Wan Y, Evans RM. Rosiglitazone activation of PPARgamma suppresses fractalkine signaling. *J Mol Endocrinol* 2010;44:135-142.
- Wang KD, Liu ZZ, Wang RM, Wang YJ, Zhang GJ, Su JR, Kang XX. Chemokine CXC Ligand 16 serum concentration but not A181V genotype is associated with atherosclerotic stroke. *Clin Chim Acta* 2010;411(19-20):1447-1451.
- Watts C. The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol* 2004;5(7):685-692.
- Waxman SG, Craner MJ, Black JA. Sodium channel expression along axons in multiple sclerosis and its models. *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:584-591.
- Weinshenker BG. Natural history of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1994;36(Suppl):S6-S11.
- Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol* 1999;46:425-428.
- Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE. Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol* 2001;121:40-48.
- Wilbanks A, Zondlo SC, Murphy K, Mak S, Soler D, Langdon P, Andrew DP, Wu L, Briskin M. Expression cloning of the STRL33/BONZO/TYMSTR ligand reveals elements of CC, CXC, and CX3C chemokines. *J Immunol* 2001;166:5145-5154.
- Wuttge DM, Zhou X, Sheikine Y, Wågsäter D, Stemme V, Hedin U, Stemme S, Hansson GK, Sirsjö A. CXCL16/SR-PSOX is an interferon-gamma-regulated chemokine and scavenger receptor expressed in atherosclerotic lesions. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:750-755.
- Yajima N, Kasama T, Isozaki T, Odai T, Matsunawa M, Negishi M, Ide H, Kameoka Y, Hirohata S, Adachi M. Elevated levels of soluble fractalkine in active systemic lupus erythematosus: potential involvement in neuropsychiatric manifestations. *Arthritis Rheum* 2005;52:1670-1675.
- Yang Q, Khoury MJ, Friedman J, Little J, Flanders WD. How many genes underlie the occurrence of common complex diseases in the population? *Int J Epidemiol* 2005;34(5):1129-1137.

- Ye S, Dhillon S, Ke X, Collins AR, Day INM. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res* 2001;29:E88-8.
- Yi GW, Zeng QT. Circulating CXCL16 is related to the severity of coronary artery stenosis. *Arch Med Res* 2008;39(5):531-535.
- Yoneda O, Imai T, Goda S, Inoue H, Yamauchi A, Okazaki T, Imai H, Yoshie O, Bloom ET, Domae N, Umehara H. Fractalkine-mediated endothelial cell injury by NK cells. *J Immunol* 2000;164:4055-4062.
- Yoneda O, Imai T, Nishimura M, Miyaji M, Mimori T, Okazaki T, Domae N, Fujimoto H, Minami Y, Kono T, Bloom ET, Umehara H. Membranebound form of fractalkine induces IFN-gamma production by NK cells. *Eur J Immunol* 2003;33:53-58.
- Yoshida H, Imaizumi T, Fujimoto K, Matsuo N, Kimura K, Cui X, Matsumiya T, Tanji K, Shibata T, Tamo W, Kumagai M, Satoh K. Synergistic stimulation, by tumor necrosis factor-alpha and interferon gamma, of fractalkine expression in human astrocytes. *Neurosci Lett* 2001;303:132-136.
- Yu P, Gregg RK, Bell JJ, Ellis JS, Divekar R, Lee HH, Jain R, Waldner H, Hardaway JC, Collins M, Kuchroo VK, Zaghouani H. Specific T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen. *J Immunol* 2005;174:6772-6780.
- Zamvil SS, Steinman L. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 2003;38:685-688.
- Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren-Wiemers N. Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 2008;131(Pt1):288-303.
- Zeis T, Schaeren-Wiemers N. Lamé ducks or fierce creatures? The role of oligodendrocytes in multiple sclerosis. *J Mol Neuroscience* 2008;35:91-100.
- Zhang D, Stumpo DJ, Graves JP, DeGraff LM, Grissom SF, Collins JB, Li L, Zeldin DC, Blackshear PJ. Identification of potential target genes for RFX4\_v3, a transcription factor critical for brain development. *J Neurochem* 2006;98(3):860-875.
- Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, Reddy J, Nazareno RF, Sakaguchi S, Kuchroo VK, Weiner HL. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune

- encephalomyelitis by CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol* 2004;16:249-256.
- Zhao R, Wang Y, Shen R, Sun Y. Relationship between CX3CR1 genetic polymorphism and carotid atherosclerosis. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 2010;38(1):19-23.
- Zhuge X, Murayama T, Arai H, Yamauchi R, Tanaka M, Shimaoka T, Yonehara S, Kume N, Yokode M, Kita T. CXCL16 is a novel angiogenic factor for human umbilical vein endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;331:1295-1300.
- Zimmermann AK, Simon P, Seeburger J, Hoffmann J, Ziemer G, Aebert H, Wendel HP. Cytokine gene expression in monocytes of patients undergoing cardiopulmonary bypass surgery evaluated by real-time PCR. *J Cell Mol Med* 2003;7(2):146-156.
- Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-127.
- Zujovic V, Benavides J, Vige X, Carter C, Taupin V. Fractalkine modulates TNF-alpha secretion and neurotoxicity induced by microglial activation. *Glia* 2000;29:305-315.
- Zuvich RL, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. *Semin Immunol* 2009;(21):328-333.
- Živković M, Stanković A, Dincić E, Popović M, Popović S, Raicević R, Alavantić D. The tag SNP for HLA-DRB1\*1501, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: cost-effective high-throughput detection by real-time PCR. *Clin Chim Acta* 2009;406(1-2):27-30.

## STRUČNA BIOGRAFIJA

Ljiljana Stojković je rođena 05.07.1979. godine u Beogradu. Osnovno i srednje obrazovanje stekla je u Smederevskoj Palanci. Diplomirala je 20.12.2007. godine na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu (studijska grupa Molekularna biologija i fiziologija) sa prosečnom ocenom 8,92 i ocenom 10 na diplomskom ispitu. Diplomski rad, pod naslovom „Polimorfizam DNK -174 G/C u humanom genu za IL-6 kao faktor rizika za inflamaciju i nastanak ožiljnih promena na bubrezima u akutnom pijelonefritisu“, uradila je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“, pod rukovodstvom mentora dr Maje Živković.

Školske 2007/2008. godine upisala je doktorske studije na Biološkom fakultetu Univerziteta u Beogradu, studijski program Molekularna biologija.

Od 26.12.2007. godine zaposlena je u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu genetiku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“. U zvanje istraživač saradnik je izabrana 2009. godine.

Do sada je publikovala 4 rada iz uže naučne oblasti u časopisima međunarodnog značaja i 11 kongresnih saopštenja iz uže naučne oblasti na skupovima međunarodnog značaja. Trenutno je angažovana na projektima: Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti (OI 175085) i Integralna studija identifikacije regionalnih genetskih faktora rizika i faktora rizika životne sredine za masovne nezarazne bolesti humane populacije u Srbiji (III 41028), Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije.

Прилог 1.

## Изјава о ауторству

Потписани-а Љиљана Стојковић

број уписа \_\_\_\_\_

### Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

Улога полиморфизама и експресије гена за хемокине СХЗС лиганд 1 и СХС лиганд 16 и њихове рецепторе у настанку и прогресији мултипле склерозе у Србији

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.06.2013.

Љиљана Стојковић

---

Прилог 2.

## Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Љиљана Стојковић

Број уписа \_\_\_\_\_

Студијски програм \_\_\_\_\_

Наслов рада Улога полиморфизама и експресије гена за хемокине СХЗС лиганд 1 и СХС лиганд 16 и њихове рецепторе у настанку и прогресији мултипле склерозе у Србији

Ментор др Маја Живковић, виши научни сарадник Института за нуклеарне науке "Винча"  
др Душанка Савић Павићевић, ванредни професор Биолошког факултета  
Универзитета у Београду

Потписани Љиљана Стојковић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.06.2013.

*Љиљана Стојковић*

\_\_\_\_\_

Прилог 3.

## Изјава о коришћењу

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

Улога полиморфизама и експресије гена за хемокине CX3C лиганд 1 и CX3C лиганд 16 и њихове рецепторе у настанку и прогресији мултипле склерозе у Србији

која је моје ауторско дело.

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

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

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

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

**Потпис докторанда**

У Београду, 25.06.2013.

*Миљана Стојковић*

---



1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.

2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.

3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.

4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.

5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.

6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.