

UNIVERZITET U BEOGRADU
MEDICINSKI FAKULTET

Sašenka B. Vidičević Novaković

**Uloga stresa endoplazmatskog retikuluma u
indukciji eksperimentalnog autoimunskog
encefalomijelitisa kod pacova**

Doktorska disertacija

Beograd, 2023.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF MEDICINE

Sašenka B. Vidičević Novaković

**The role of endoplasmic reticulum stress in the
induction of experimental autoimmune
encephalomyelitis in rats**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2023.

MENTORI I ČLANOVI KOMISIJE:

Mentori:

1. *Dr Željka Stanojević*, vanredni profesor,
Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. *Dr Vladimir Trajković*, redovni profesor,
Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

1. *Dr Aleksandra Isaković*, redovni profesor,
Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
2. *Dr Tamara Martinović*, docent,
Institut za histologiju i embriologiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
3. *Dr sci. Nevena Zogović*, viši naučni saradnik,
Institut za biološka istraživanja „Siniša Stanković”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerzitet u Beogradu,
4. *Dr sci. Jelena Tasić*, naučni saradnik
Institut za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu
5. *Dr Vladislav Volarević*, redovni profesor,
Institut za mikrobiologiju i imunologiju, Fakultet medicinskih nauka, Univerzitet u Kragujevcu

Datum odbrane doktorske disertacije: _____

Zahvalnica

Istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su urađena u laboratorijama Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Instituta za mikrobiologiju i imunologiju i Instituta za histologiju i embriologiju „Aleksandar Đ. Kostić“ u okviru Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Ova doktorska disertacija je započeta u okviru projekta Ministarstva nauke Republike Srbije br. III 41025: „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“, čiji je rukovodilac bio prof. dr Vladimir Trajković, a po završetku projekta istraživanja su nastavljena pod pokroviteljstvom Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja, projekat Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu broj 451-03-47/2023-01/200110.

Svom mentoru, prof. dr Željki Stanojević se zahvaljujem na podršci, razumevanju, strpljenju i ukazanom poverenju tokom izrade ove doktorske disertacije. Zahvaljujem joj se što me je uvela u misteriozni svet EAE i što je kod mene probudila interesovanje za ovu temu. Takođe joj se zahvaljujem se na velikoj pomoći tokom finalne izrade ove teze.

Prof. dr Vladimiru Trajkoviću se zahvaljujem na svim savetima tokom izrade eksperimenata i tokom pisanja ove teze. Bez njegovih inovativnih ideja i pomoći oko tumačenja rezultata, izrada ove disertacije bi bila daleko komplikovanija.

Neizmernu zahvalnost dugujem prof. dr Aleksandri Isaković koja mi je ukazala poverenje i primila me u svoj tim nakon završenih studija. Veliko hvala za svu pomoć, podršku i razumevanje tokom svih ovih godina kao i na pomoći tokom finalne izrade ove disertacije.

Hvala doc. dr Tamari Martinović na velikoj pomoći prilikom izrade i objašnjavanja velikog broja histoloških rezultata u ovoj disertaciji.

Prof. dr Tamari Kravić-Stevović i doc. dr Darku Ćiriću se, takođe, zahvaljujem na pomoći oko izrade histoloških preparata i njihovom tumačenju.

Hvala akademiku, prof. dr Vladimiru Bumbašireviću, dr Vesni Čemerikić Martinović i dr Nedi Drndarević na pomoći oko izrade finalne verzije rada koji je proizašao iz ove doktorske disertacije.

Veliko hvala dr sci. Jeleni Tasić na ogromnoj i nesebičnoj pomoći tokom svakog eksperimenta u okviru ove doktorske disertacije, ali i mnogih drugih eksperimenata. Hvala za svu podršku i razumevanje tokom ovog procesa i hvala na svim sugestijama tokom krajnjeg uobličavanja ove disertacije.

Dr sci. Saši Petričeviću se zahvaljujem na pomoći tokom eksperimentalnog rada sa životinjama.

Dr sci. Verici Paunović se zahvaljujem na pomoći oko izrade i tumačenja rezultata koji su doprineli kvalitetu ove disertacije, a odnose se na protočnu citofluorimetriju.

Prof. dr Vladislavu Volareviću i dr sci. Neveni Zogović se zahvaljujem na pomoći pri oblikovanju doktorske disertacije.

Zahvaljujem se i svojoj mlađim kolegicama, nekada studentima, dr Nini Tomonjić i dr Andoni Milovanović na podršci i pomoći prilikom izrade eksperimenata i tokom pisanja ove disertacije. Jelenina, Ninina i Andonina kolegijalnost, prijateljska podrška i pozitivna energija svakodnevnog rada čine lakšim i lepšim. Hvala dr Janku Zekoviću na velikoj podršci i priskakanju u pomoć kad god je to bilo potrebno.

Prof. dr Ivanki Marković se zahvaljujem na svemu što me je naučila dok sam bila student i što je predložila profesorki Isaković da me primi u svoj tim. Hvala svim članovima laboratorije prof. Marković, prof. dr Sonji Misirlić Denčić, doc. dr Anđelki Isaković i assist. dr Mariji Jeremić na velikoj podršci i razumevanju tokom svih ovih godina.

Zahvaljujem se celokupnom kolektivu Instituta za medicinsku i kliničku biohemiju, Medicinskog fakulteta u Beogradu na prijatnoj i prijateljskoj atmosferi. Hvala svim mojim kolegama koji su mi izlazili u susret kad god je to bilo potrebno. Posebnu zahvalnost dugujem Nadi Bojović, Sanji Čabarkapi i Nikoli Mičiću, čija je pomoć umnogome olakšala laboratorijski rad.

Hvala mojim roditeljima i mojoj sestri na ogromnoj podršci tokom mog celokupnog puta. Hvala vam što ste bili uz mene, kako tokom teških trenutaka, tako i tokom onih lepih.

Najveću zahvalnost dugujem svom suprugu Nikoli i svojoj ćerki Eni na bezuslovnoj ljubavi, razumevanju i podršci tokom celog ovog procesa. Vas dvoje ste moja snaga i dajete smisao svemu.

Mojoj Eni

Uloga stresa endoplazmatskog retikuluma u indukciji eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa kod pacova

Sažetak

Endoplazmatski retikulum (ER) predstavlja unutarćelijsku organelu sa brojnim funkcijama, pri čemu je jedna od najznačajnijih sinteza i obrada proteina. Nakupljanje nefunkcionalnih, pogrešno uvijenih ili neuvijenih proteina unutar lumena ER dovodi do nastanka ER stresa. Ukoliko dođe do nastanka ER stresa, ćelija pokušava da ga prevaziđe na različite načine, među kojima je i pokretanje UPR (*unfolded protein response*). Do pokretanja UPR dolazi nakon odvajanja šaperona ER, GRP78, od luminalnih domena tri transmembranska senzora ER stresa: IRE-1 α , ATF6 i PERK. Aktivacija IRE-1 α , PERK i ATF6 pokreće signalne kaskade koje za cilj imaju adaptaciju ćelije na stres i obnovu funkcije ER. Ukoliko obnova funkcije ER izostane, u cilju održavanja homeostaze, pokreće se programirana ćelijska smrt, apoptoza. Aktivacija IRE-1 α dovodi do obrade iRNK za transkripcioni faktor XBP1 i do aktivacije MAP kinaza i NF κ B. Aktivirani ATF6 povećava ekspresiju gena za XBP1, dok PERK dovodi do fosforilacije, a time i inaktivacije eIF2 α , što dalje dovodi do smanjene sinteze proteina. Fosforilacija eIF2 α dovodi i do selektivne sinteze ATF4 koji, kod ireverzibilno oštećenih ćelija, aktivira CHOP koji indukuje apoptozu. ER stres i UPR imaju ulogu u patogenezi različitih bolesti, među koje spada i multipla skleroza (MS). Kako većina današnjih saznanja o MS potiče iz njenog animalnog modela, eksperimentalnog autoimuskog encefalomijelitisa (EAE), ciljevi ovog istraživanja su bili detekcija prisustva ER stresa u ćelijama imunskog sistema tokom indukcije EAE i ispitivanje efekata inhibicije ER stresa u ćelijama imunskog sistema na razvoj EAE. Imajući na umu razlike između pacova DA i AO soja u podložnosti za razvoj EAE, prisustvo ER stresa je prvo ispitivano u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih DA i AO životinja, pri čemu je uočeno da kod oba soja pacova dolazi do aktivacije ER stresa. Indukcija ER stresa je bila nešto jača kod AO pacova, kod kojih je došlo do ranije aktivacije CHOP i fosforilacije eIF2 α , dok je kod DA, ali ne i AO pacova, došlo do fosforilacije ERK kinaze. Hematoksilin-eozin bojenjem preseka drenirajućih limfnih čvorova uočeno je ranije i intenzivnije povećanje broja limfocita kod imunizovanih DA pacova. Pored toga, kod imunizovanih DA pacova uočeno je prisustvo atipičnih plazmocita, odnosno Mot ćelija sa Raselovim telima, što ukazuje na dilataciju ER u plazmocitima u ovom modelu EAE. Da se ER stres javlja u različitim tipovima ćelija unutar drenirajućih limfnih čvorova potvrđuje nalaz elektronske mikroskopije, gde se proširen lumen ER uočava u limfocitima, plazmocitima i makrofagima imunizovanih DA pacova. Ovaj nalaz je dodatno potvrđen i imunoblot analizom, gde se uočava porast markera ER stresa i u CD3⁺ i CD3⁻ ćelijama. Pozitivna korelacija između markera ER stresa u mononuklearnim infiltratima kičmene moždine i kliničke aktivnosti bolesti (EAE skor 1-3) naglašava značaj aktivacije ER stresa i UPR u patogenezi EAE. Uticaj inhibicije ER stresa na klinički tok EAE ispitan je primenom hemijskog šaperona ursodeoksiholne kiseline (UDCA). Njena primena je dovela do poboljšanja kliničkog toka EAE, ali i do smanjene produkcije proinflamatornih citokina koji imaju značajnu ulogu u patogenezi EAE. UDCA je smanjila ekspresiju iRNK za efektorske citokine Th1 (IFN γ) i Th17 (IL-17) odgovora, kao i ekspresiju gena za transkripcione faktore i/ili citokine neophodne za diferencijaciju Th1 (T-bet, IL-12), odnosno Th17 ćelija (IL-23). Ekspresija gena za proinflamatorne citokine TNF i IL-1 β je takođe bila snižena dejstvom UDCA. Nivoi markera ER stresa se nakon tretmana UDCA, za razliku od imunizovane grupe koja nije primila UDCA, nisu značajno razlikovali u odnosu na neimunizovane životinje, što sugerise da je UDCA sprečila aktivaciju ER stresa kod imunizovanih DA pacova. Rezultati ove doktorske disertacije ukazuju da ER stres u ćelijama imunskog sistema ima značajnu ulogu tokom patogeneze EAE, kao i da inhibicija ER stresa dovodi do poboljšanja kliničkog toka EAE. Povoljan efekat inhibicije ER stresa je najverovatnije posledica smanjene produkcije encefalitogenih proinflamatornih i Th1/Th17 citokina, što bi moglo da ima važne implikacije za terapiju inflamatornih bolesti CNS.

Ključne reči: ER stres, UPR, eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis, GRP78, CHOP, eIF2 α , XBP1, ursodeoksiholna kiselina

Naučna oblast: Medicina

Uža naučna oblast: Molekularna medicina

UDK broj:

The role of endoplasmic reticulum stress in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in rats

Abstract

Endoplasmic reticulum (ER) is an intracellular organelle with multiple functions, with synthesis and processing of proteins being one of the most significant. Accumulation of non-functional, misfolded or unfolded proteins within the ER lumen leads to ER stress. The cell tries to overcome ER stress in various ways, including the initiation of UPR (unfolded protein response). UPR starts after the dissociation of the ER chaperone GRP78 from the luminal domains of three transmembrane ER stress sensors: IRE-1 α , ATF6 and PERK. Activation of IRE-1 α , PERK and ATF6 initiates signaling cascades, which aim to adapt the cell to stress and restore the ER function. If ER function is not restored, in order to maintain homeostasis, programmed cell death (apoptosis) is initiated. Activation of IRE-1 α leads to the processing of mRNA for the transcription factor XBP1, as well as activation of MAP kinases and NF κ B. Activated ATF6 increases the gene expression for XBP1, while PERK leads to phosphorylation and thus the inactivation of eIF2 α , which further leads to decrease in protein synthesis. Phosphorylation eIF2 α also leads to selective synthesis of ATF4, which in irreversibly damaged cells activates CHOP that leads to the initiation of apoptosis. ER stress and UPR play a role in pathogenesis of various diseases, including multiple sclerosis (MS). As the majority of current knowledge about MS stems from its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the goals of this study were detection of ER stress response in the immune system cells during EAE induction, as well as examination of the effect that ER stress inhibition in immune system has on the EAE development. Keeping in mind the differences between the DA and AO strain rats in susceptibility to EAE development, the presence of ER stress was first investigated in the draining lymph nodes of immunized DA and AO animals, where it was observed that ER stress is activated in both rat strains. The ER stress response was somewhat stronger in AO rats, with earlier CHOP activation and eIF2 α phosphorylation in, while ERK phosphorylation occurred in DA, but not AO rats. Hematoxylin-eosin staining of draining lymph nodes sections revealed an earlier and more prominent lymphocyte proliferation in immunized DA rats. Furthermore, the presence of atypical plasma cells, i.e. Mott cells with Russell bodies, was observed in immunized DA rats, indicating ER dilatation in plasma cells in this experimental model of EAE. ER stress in different types of cells within the draining lymph nodes was confirmed by electron microscopy findings showing dilated ER lumen in lymphocytes, plasmocytes and macrophages of immunized DA rats. This finding was additionally confirmed by immunoblot analysis, where an increase in ER stress markers was observed in both CD3⁺ and CD3⁻ cells. The positive correlation between ER stress markers in spinal cord-infiltrated mononuclear cells and the clinical activity of the disease (EAE score 1-3) highlights the significance of ER stress and UPR induction in the pathogenesis of EAE. The effect of ER stress inhibition on the clinical course of EAE was investigated using the chemical chaperone ursodeoxycholic acid (UDCA). In addition to improving the EAE clinical score, UDCA application also led to a decrease in the production of proinflammatory cytokines that play a significant role in the pathogenesis of EAE. UDCA reduced the expression of mRNA for the effector cytokines of Th1 (IFN γ) and Th17 (IL-17) response, as well as gene expression of transcription factors and/or cytokines necessary for the differentiation of Th1 (T-bet, IL-12) and Th17 cells (IL-23). Gene expression of the proinflammatory cytokines TNF and IL-1 β was also decreased. The levels of ER stress markers in UDCA-treated group, in contrast to immunized rats that did not receive UDCA, were not significantly different in comparison to non-immunized animals, suggesting that UDCA prevented the activation of ER stress in EAE. The results of this doctoral dissertation indicate that ER stress in the immune system cells plays a significant role in the pathogenesis of EAE, as well as that the inhibition of ER stress leads to an improvement of the EAE clinical course. The positive effect of ER stress inhibition is most probably mediated by decreased production of encephalitogenic proinflammatory and Th1/Th17 cytokines which might have important implications for the therapy of CNS inflammatory diseases.

Keywords: ER stress, UPR, experimental autoimmune encephalomyelitis, GRP78, CHOP, eIF2 α , XBP1, ursodeoxycholic acid

Research area: Medicine

Research field: Molecular medicine

UDC number:

SADRŽAJ

1	UVOD.....	1
1.1	Stres endoplazmatskog retikuluma	3
1.1.1	Uloga PERK u aktivaciji UPR	5
1.1.2	Uloga IRE-1 α u aktivaciji UPR.....	7
1.1.3	Uloga ATF6 u aktivaciji UPR.....	8
1.2	Uloga ER stresa u patogenezi bolesti	9
1.2.1	Neurodegeneracija, neuroinflamacija i ER stres	10
1.2.2	ER stres i multipla skleroza.....	10
1.3	Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis.....	12
1.3.1	EAE i ER stres	14
1.4	Uloga humoralne imunosti u patogenezi MS i EAE	15
1.4.1	Raselova tela	16
1.5	Modulacija ER stresa i signalnog puta UPR kao potencijalna terapijska meta	17
2	CILJEVI.....	19
3	MATERIJALI I METODE	23
3.1	Eksperimentalne životinje.....	25
3.2	Imunizacija životinja i praćenje kliničkog toka EAE.....	25
3.2.1	Eksperimentalni plan.....	26
3.3	Tretman ursodeoksiholnom kiselinom.....	27
3.4	Izolacija ćelija iz limfnih čvorova i sortiranje ćelija.....	28
3.5	Izolacija mononuklearnih ćelija kičmene moždine.....	28
3.6	Tehnika imunoblota	29
3.7	Izolacija RNK molekula i reverzna transkripcija.....	30
3.8	Kvantitativna PCR analiza – qRT-PCR.....	31
3.9	Priprema uzoraka za svetlosnu mikroskopiju	32
3.9.1	Morfometrijska analiza	33
3.10	Transmisiona elektronska mikroskopija	33
3.11	Statistička analiza	33
4	REZULTATI.....	35
4.1	DA pacovi su životinje podložne razvoju EAE, dok su AO pacovi rezistentni na pojavu bolesti.....	37
4.2	Veličina i aktivacija drenirajućih limfnih čvorova koreliraju sa osetljivošću na indukciju EAE	37

4.3	Prisustvo Mot ćelija sa Raselovim telima u drenirajućim limfnim ćvorovima imunizovanih DA pacova.	39
4.4	Prisustvo Mot ćelija u poliklonski aktiviranim plazmocitima u limfnim ćvorovima imunizovanih DA pacova	40
4.5	Narušena morfologija ER i mitohondrija u različitim tipovima ćelija u limfnim ćvorovima imunizovanih DA pacova	42
4.6	Obrasci aktivacije ER stresa i UPR tokom indukcije EAE se razlikuju kod DA i AO pacova	44
4.7	Indukcija ER stresa se aktivira u CD3 ⁺ i CD3 ⁻ ćelijama limfnog ćvora imunizovanih DA pacova.....	46
4.8	Aktivacija ER stresa u mononuklearnim infiltratima kićmene moždine korelira sa kliniķkom slikom EAE	47
4.9	Inhibicija ER stresa poboljšava kliniķki tok EAE	47
4.10	Anti-inflamatorno dejstvo UDCA u EAE	49
4.11	Efekat UDCA inhibira na ekspresiju markera ER stresa u EAE	49
5	DISKUSIJA	53
6	ZAKLJUČCI.....	63
7	LITERATURA.....	69

1 UVOD

1.1 Stres endoplazmatskog retikuluma

Endoplazmatski retikulum (ER) predstavlja najveću unutarćelijsku organelu čiji je lumen izgrađen od mreže razgranatih tubula i cisterni i odvojen je od citosola jednoslojnom fosfolipidnom membranom. Membrana ER se nastavlja na jedarnu membranu i ima ulogu u regulaciji razmene materija između citosola i lumena ER (Fagone i Jackowski, 2009; Oakes i Papa, 2015). ER ima brojne funkcije, među koje spadaju sinteza i obrada proteina (granulirani ER, GER), sinteza lipida, metabolizam ugljenih hidrata i skladištenje jona kalcijuma (glatki ER) (Schwarz i Blower, 2016).

Kao što je već pomenuto, jedna od najznačajnijih uloga ER je sinteza i obrada proteina. Naime, sinteza svih proteina započinje na slobodnim ribozomima u citoplazmi, ali se sinteza određenih proteina nastavlja na GER (Oakes i Papa, 2015). Proteini čija se sinteza nastavlja na GER su proteini namenjeni ćelijskoj membrani, proteini lizozoma, ER i Goldžijevog aparata (GA), kao i proteini koji će biti sekretovani van ćelije. Svi ovi proteini na svom N-terminalnom kraju sadrže signalnu sekvencu koja ih sa ribozoma usmerava ka GER gde se nastavlja njihova sinteza (Schwarz i Blower, 2016). Kada protein dospe u lumen ER, počinje njegova dalja obrada, koja može biti kotranslaciona ili postranslaciona. Jedna od prvih modifikacija, koja se kotranslaciono dešava na proteinima u lumenu ER, jeste N-glikozilacija koja ima značajnu ulogu u stabilizaciji proteina (maskiranje hidrofobnih sekvenci i proteolitičkih mesta), kao i u njegovom daljem usmeravanju kroz ER i GA (Braakman i Hebert, 2013). Po završetku translacije nastavlja se dalja obrada proteina, to jest njihovo pravilno uvijanje. Za pravilno uvijanje i modifikaciju proteina zaduženi su brojni enzimi i proteini, uključujući i šaperone, to jest proteine toplotnog šoka (*heat shock proteins*) (Braakman i Hebert, 2013). Šaperoni predstavljaju proteine koji pomažu drugim proteinima da zauzmu nativnu konformaciju i sprečavaju agregaciju proteina. U ER se nalaze brojni šaperoni koji, pored uvijanja, pomažu i u sortiranju proteina. Dve glavne klase šaperona u ER su tzv. klasični šaperoni i šaperoni koji se vezuju za ugljene hidrate. Klasični šaperoni se nalaze u gotovo svim delovima ćelije i vezuju se direktno za polipeptidni lanac, dok su šaperoni koji se vezuju za ugljene hidrate lokalizovani u ER i vezuju se za ciljni protein preko hidrofilne ugljenohidratne komponente. Obe ove klase šaperona imaju ulogu u uvijanju proteina i održavanju normalnog protoka proteina kroz ER (Braakman i Hebert, 2013). Pored šaperona, u modifikaciju proteina u ER su uključeni enzimi kao što su protein disulfid izomeraze i prolil peptidil *cis-trans* izomeraze (Braakman i Hebert, 2013).

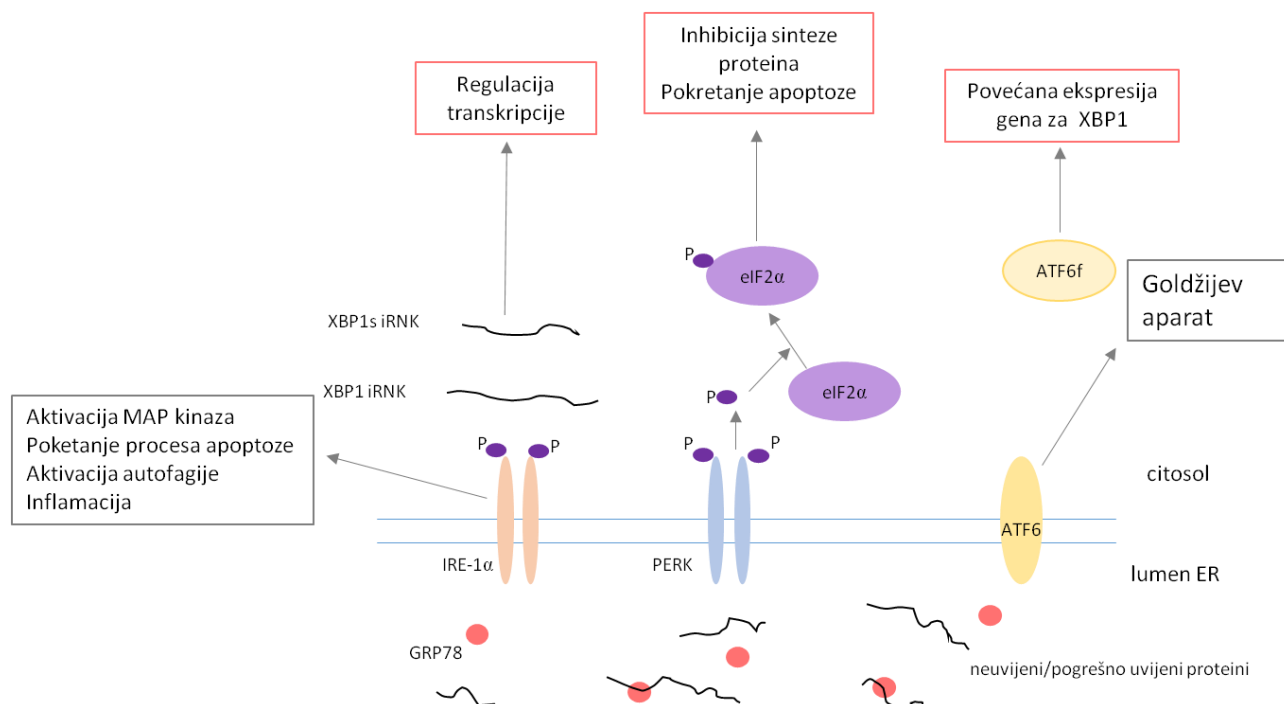
Iako postoje brojni kontrolni mehanizmi koji regulišu pravilnu modifikaciju i uvijanje proteina, neki proteini ne uspeju da dostignu svoju funkcionalnu formu. Ovi proteini uglavnom ostaju u lumenu ER, gde se usmeravaju u ERAD (*ER-associated degradation*). Ovaj put uključuje translokaciju neuvijenih ili pogrešno uvijenih proteina u citosol, njihovu ubikvitinaciju i dalju razgradnju u proteazomima, čime se osigurava da ovi proteini ne budu sekretovani van ćelije (Ruggiano, Foresti, i Carvalho, 2014). Za održavanje funkcije ER izuzetno je značajna homeostaza između dva puta, ERAF (*ER-associated folding*) i ERAD, koja uključuje prepoznavanje i uklanjanje nefunkcionalnih proteina. Ovo je strogo kontrolisan proces koji ne sme da ugrozi normalno funkcionisanje ćelije (Ryno, Wiseman, i Kelly, 2013).

Kada dođe do narušavanja funkcije ER, odnosno kada je narušena ravnoteža između potreba ćelije za proteinima i kapaciteta ER za uvijanjem proteina, nefunkcionalni, pogrešno uvijeni ili neuvijeni proteini počinju da se nakupljaju unutar lumena ER. Do nakupljanja proteina dolazi uprkos brojnim mehanizmima koji su uključeni u njihovo prepoznavanje i uklanjanje. Nakupljanje neuvijenih ili pogrešno uvijenih proteina dovodi do nastanka stresa endoplazmatskog retikuluma (ER stres) (Jingming Li, Wang, Yu, Wang, i Zhang, 2009; Oshitari, Hata, i Yamamoto, 2008). Kada dođe do ER stresa, ćelija pomoću nekoliko različitih mehanizama pokušava da očuva funkciju i održi ravnotežu između sinteze i uklanjanja proteina. Ovi mehanizmi uključuju inhibiciju translacije, razgradnju nakupljenih proteina, kao i povećanu produkciju šaperona i enzima

uključenih u uvijanje proteina. Ukoliko ovi mehanizmi ne uspeju da povrate funkciju ER, a samim tim i funkciju ćelije, dolazi do pokretanja programirane ćelijske smrti tip I, apoptoze (Tabas i Ron, 2011).

Jedan od načina na koji ćelija pokušava da obnovi svoju funkciju je pokretanje UPR (*unfolded protein response*) (Ron i Walter, 2007; Walter i Ron, 2011; Wiseman, Mesgarzadeh, i Hendershot, 2022). UPR ima ulogu u kontroli stabilnosti RNK molekula, reguliše stepen sinteze proteina i dovodi do aktivacije transkripcije gena uključenih u skoro svaki segment sekretornog puta proteina (C. Hetz i Saxena, 2017). Tokom UPR, ER se uvećava i prilagođava potrebama ćelije. Dolazi do povećanja kapaciteta ER za obradu proteina, odnosno do povećanja kapaciteta „mašinerije“ uključene u uvijanje proteina (Schuck, Prinz, Thorn, Voss, i Walter, 2009). UPR se pokreće aktivacijom tri transmembranska proteina endoplazmatskog retikuluma koji predstavljaju senzore ER stresa. To su: IRE-1 α (*inositol-requiring enzyme 1*), ATF6 (*activating transcription factor 6*) i PERK (*protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase*) (Mhállie i sar., 2008). ER stres i UPR u mnogim ćelijama i tkivima imaju fiziološku ulogu. Fiziološka uloga ER stresa je značajna tokom embrionalnog razvoja, rasta i diferencijacije (Almanza i sar., 2019). Jedna od fizioloških uloga UPR, odnosno ER stresa je i u održavanju homeostaze sekretornih ćelija u kojima je ovaj put značajan zbog veće sinteze proteina. Tako, u ćelijama kao što su B limfociti, ćelije endokrinog ili egzokrinog pankreasa ili ćelije pljuvačnih žlezda, ER stres ima fiziološku, a ne patološku ulogu (Cornejo i sar., 2013; Oakes i Papa, 2015).

Kao što je već pomenuto, do pokretanja UPR dolazi aktivacijom tri senzora ER stresa, IRE-1 α , PERK i ATF6. Ovi proteini su neaktivni kada je za njihov luminalni domen vezan GRP78 (*glucose-regulated protein 78*). GRP78 predstavlja šaperon ER koji je odgovoran za pravilno uvijanje proteina (Bertolotti i sar., 2000; J. Li i sar., 2008; Shen i sar., 2002). Međutim, povećana sinteza proteina ili njihovo neadekvatno uvijanje, povećavaju potrebu za šaperonima unutar ER. Pod tim okolnostima, GRP78 se odvaja od luminalnih domena ova tri transmembranska proteina, što dalje dovodi do njihove aktivacije (Bertolotti i sar., 2000; J. Li i sar., 2008; Shen i sar., 2002). Aktivacijom IRE-1 α , PERK i ATF6 pokreće se signalna kaskada UPR, koja za cilj ima obnavljanje funkcije ER. Međutim, ukoliko funkcija ER ne bude obnovljena, aktivacija ovih proteina dovodi do pokretanja procesa apoptoze, koja se pokreće i u slučajevima postojanja hroničnog ER stresa (Wiseman i sar., 2022) (slika 1).



Slika 1. Prikaz aktivacije UPR.

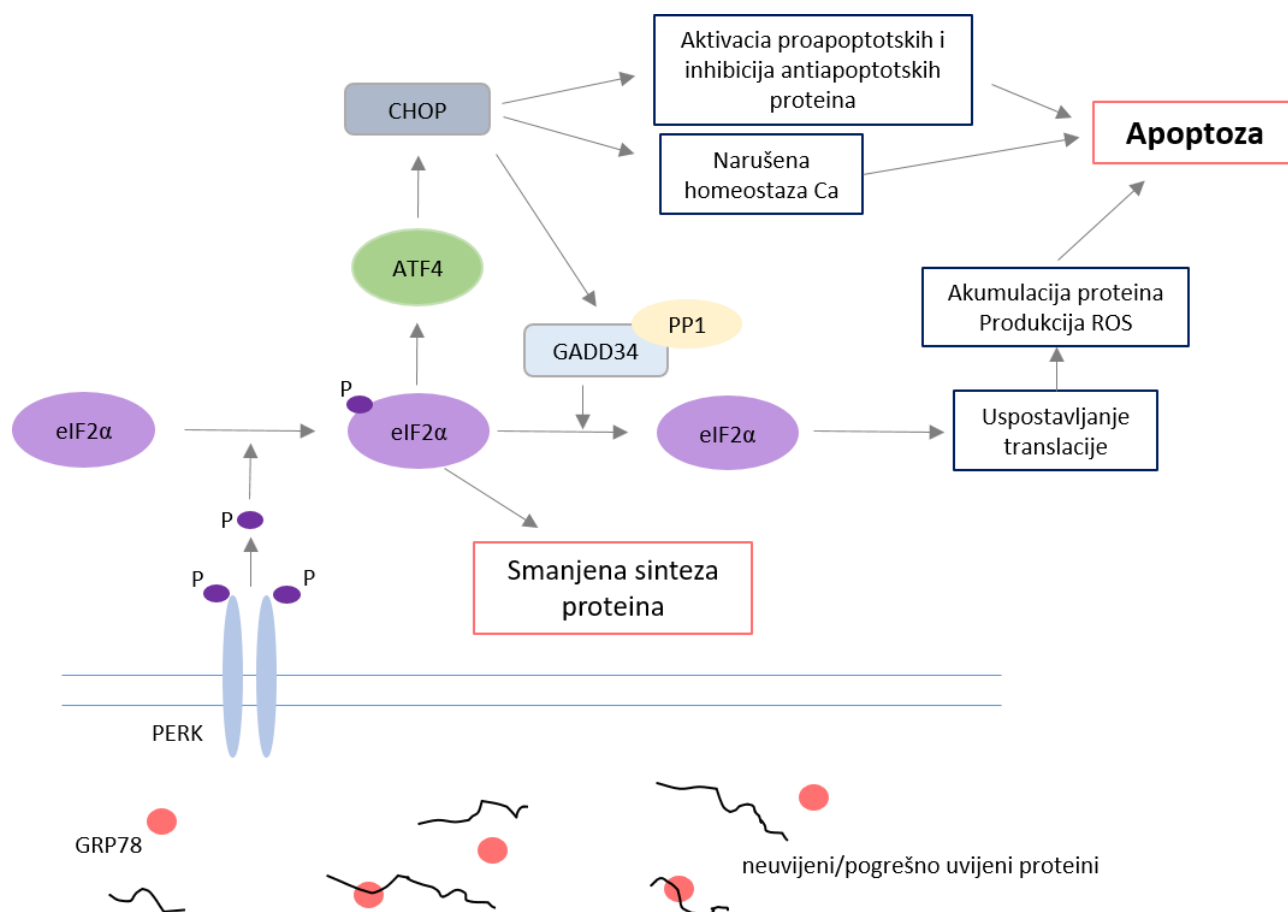
Odvajanje GRP78 od luminalnih domena IRE-1 α , ATF6 i PERK dovodi do njihove aktivacije (dimerizacijom, autofosforilacijom ili translokacijom) i daljeg pokretanja različitih signalnih puteva koji dovode do regulacije transkripcije, smanjene sinteze proteina, aktivacije apoptoze, autofagije ili pokretanja inflamacije. U daljem tekstu su detaljno objašnjeni efekti aktivacije sva tri transmembranska proteina, kao i njihove nishodne kaskade.

Dugotrajni, to jest hronični ER stres i poremećaji u signalnom putu UPR imaju ulogu u patogenezi brojnih bolesti kao što su dijabetes melitus, tumori, neurodegenerativne bolesti i poremećaji imunskog sistema. Stoga, poznavanje molekularnih mehanizama koji se aktiviraju tokom ER stresa može biti od velikog značaja u razvoju ciljanih terapijskih pristupa u lečenju ovih bolesti (Oakes i Papa, 2015).

1.1.1 Uloga PERK u aktivaciji UPR

Aktivacija RNK protein kinaze slične ER kinazi (PERK) podrazumeva dimerizaciju ovog proteina, čime se aktivira citosolni kinazni domen i dolazi do autofosforilacije. Aktivirani PERK fosforiliše i inaktivira eIF2 α (eukariotski faktor inicijacije 2) što dalje dovodi do inhibicije translacije, odnosno smanjene sinteze proteina (Harding, Zhang, i Ron, 1999; Walter i Ron, 2011). Fosforilisani eIF2 α takođe dovodi do selektivne translokacije transkripcionog faktora ATF4 (*activating transcription factor 4*), koji je odgovoran za regulaciju gena uključenih u oksidativni stres, metabolizam aminokiselina, autofagiju i sintezu i obradu proteina (šaperoni ER) (Claudio Hetz, Chevet, i Oakes, 2015). U ćelijama koje su nepovratno oštećene, ATF4 dovodi do pokretanja ćelijske smrti aktivacijom transkripcije gena za CHOP/GADD153 (*C/EBP homologous protein*). Ovaj efekat je posredovan aktivacijom proapoptotskih i inhibicijom antiapoptotskih proteina. Naime, CHOP dovodi do inhibicije ekspresije antiapoptotskog proteina Bcl-2 i do povećanja ekspresije članova BH3-only Bcl-2 familije - Bad, Bim i p53, koji imaju proapoptotsku ulogu. CHOP može dovesti do indukcije apoptoze i regulacijom koncentracije jona kalcijuma (Claudio

Hetz i sar., 2015). Kada postoji kontinuirana aktivacija PERK, CHOP se nakuplja i dovodi do otvaranja kalcijumovih kanala na membrani ER. Povećana koncentracija kalcijuma u ćeliji aktivira kalcijum-kalmodulin zavisnu protein kinazu II, koja ima ulogu u pokretanju ćelijske smrti (G. Li i sar., 2009). Pored aktivacije kalcijum-kalmodulin zavisne protein kinaze II, kalcijum odlazi u mitohondrijalni matriks, gde dovodi do depolarizacije mitohondrijalne membrane i povećane produkcije slobodnih kiseoničnih radikala (*reactive oxygen species*, ROS) (Görlach, Klappa, i Kietzmann, 2006). Pored aktivacije apoptoze, CHOP dovodi do povećane ekspresije gena za GADD34 (*growth arrest and DNA damage-inducible protein 34*) koji, u fiziološkim uslovima, u kompleksu sa serin/treonin protein fosfatazom 1 (PP1) reguliše fosforilaciju eIF2 α . GADD34 defosforiliše i time aktivira eIF2 α , što dovodi do njegove aktivacije i posledičnog povećanja translacije. Usled povećanja translacije dolazi do nakupljanja proteina, što predstavlja signal da mehanizmi adaptacije nisu uspeali da povrate funkciju ER. Kada mehanizmi adaptacije ne uspeju da održe homeostazu ER, pokreće se proces apoptoze (Walter i Ron, 2011) (slika 2). Pored svega navedenog, aktivacija PERK dovodi i do aktivacije NF- κ B (*nuclear factor kappa B*), čiji je dominantni put aktivacije preko IRE-1 α , gde je i detaljno objašnjen. PERK dovodi do aktivacije NF- κ B indirektno, inhibicijom translacije njegovog inhibitora I κ B (*inhibitors of κ B*) (Deng i sar., 2004).



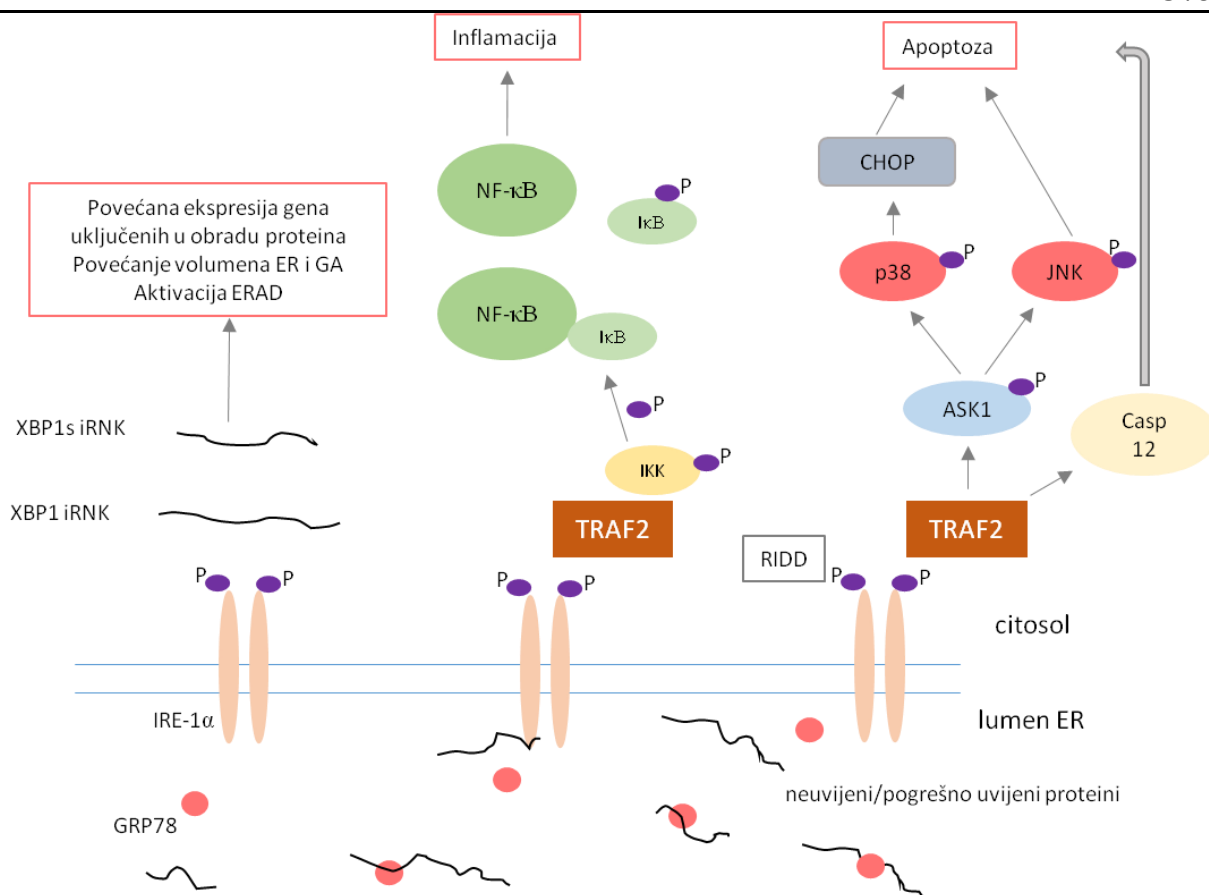
Slika 2. Aktivacija PERK i njegov signalni put.

PERK fosforiliše i time inhibira eIF2 α , što dovodi do smanjenog nakupljanja proteina. Inaktivirani eIF2 α selektivno povećava transkripciju ATF4 koji indukuje CHOP. CHOP dovodi do aktivacije apoptoze regulacijom aktivnosti proapoptotskih i antiapoptotskih proteina. Takođe, CHOP preko GADD34 može dovesti do ponovne aktivacije eIF2 α , što dovodi do pokretanja translacije i daljeg nakupljanja proteina. Kao odgovor na sve veće nakupljanje proteina pokreće se proces apoptoze.

1.1.2 Uloga IRE-1 α u aktivaciji UPR

Jedan od najznačajnijih proteina uključenih u pokretanje UPR jeste IRE-1 α . Ovaj transmembranski protein prenosi signal o akumulaciji proteina unutar lumena ER do jedra, gde reguliše transkripciju gena uključenih u regulaciju homeostaze proteina (Junappa i sar., 2018). Odvajanje GRP78 od luminalnog domena IRE-1 α dovodi do njegove dimerizacije i autofosforilacije, čime se ovaj protein aktivira. Ovako aktiviran IRE-1 α dovodi do isecanja introna (26 nukleotida) iz iRNK koja kodira transkripcioni faktor XBP1. Ovo isecanje introna dovodi do povećane ekspresije aktivne i stabilne forme XBP1 proteina (Walter i Ron, 2011). Smatra se da splajsovana forma XBP1 pospešuje preživljavanje ćelija tako što dovodi do aktivacije ERAD i povećane transkripcije gena za proteine/enzime koji su uključeni u savijanje proteina. Pored aktivacije različitih gena, XBP1 dovodi i do uvećanja ER i GA, što za posledicu ima povećanu sekreciju proteina (Claudio Hetz i sar., 2015). Pored adaptacije ćelije na ER stres, XBP1 u ćelijama imunskog sistema ima ulogu u aktivaciji inflamacije. Tako, u makrofagima splajsovana forma XBP1 pospešuje produkciju proinflamatornih citokina interleukina-6 (IL-6) i faktora nekroze tumora (TNF). Takođe, XBP1 u makrofagima dovodi do aktivacije inflamazoma, koji pospešuje produkciju još jednog proinflamatornog citokina, interleukina 1 β (IL-1 β) (Di Conza i Ho, 2020). Delecija XBP1 u hematopoetskim ćelijama narušava razvoj i preživljavanje dendritskih ćelija, najznačajnijih antigen prezentujućih ćelija, i time remeti aktivaciju T i B limfocita. Sve ovo zajedno ukazuje na nedvosmisleni značaj ER stresa u imunskom odgovoru (Di Conza i Ho, 2020).

Pored isecanja introna iz iRNK za XBP1, aktivirani IRE-1 α deluje i na iRNK i mikroRNK koje su uključene u razgradnju proteina kroz IRE-1 α -zavisni raspad (*regulated IRE-1 α dependent decay*, RIDD). RIDD dovodi do povećane ekspresije proteina koji imaju ulogu u inflamaciji, apoptozi i adaptaciji ćelije na stres (Maurel, Chevet, Tavernier, i Gerlo, 2014). Kao odgovor na ER stres, UPR u ćelijama imunskog sistema preko IRE-1 α dovodi do aktivacije inflamatornih puteva koji uključuju NF- κ B i mitogenom aktivirane protein kinaze (MAPK), pre svega JNK (*c-Jun N-terminal kinase*) i p38. NF- κ B i MAP kinaze, pored svoje uloge u regulaciji ekspresije gena uključenih u inflamaciju, imaju ulogu i u regulaciji programirane ćelijske smrti, apoptoze (Claudio Hetz i sar., 2015; C. Hetz i Saxena, 2017; Tang i sar., 2001). U fiziološkim uslovima, aktivacija NF- κ B je regulisana njegovim kontaktom sa κ B inhibitorom, I κ B. Aktivirani IRE-1 α dovodi do aktivacije serin kinaze I κ B kinaze, (IKK) koja ima dve katalitičke (IKK α , IKK β) i jednu regulatornu subjedinicu (IKK γ). IKK fosforiliše I κ B, a fosforilisani I κ B se odvaja od NF- κ B, što dovodi do njegove aktivacije. Aktivirani NF- κ B odlazi u jedro, gde dovodi do povećane ekspresije gena za citokine i proteine uključene u preživljavanje ćelije (Scherer, Brockman, Chen, Maniatis, i Ballard, 1995; van den Berg, Haenen, van den Berg, i Bast, 2007). Ovaj efekat IRE-1 α zavisi od aktivnosti TRAF2 (*tumor-necrosis factor- α receptor-associated factor 2*) molekula. Pored aktivacije NF- κ B, kompleks IRE-1 α –TRAF2 preko ASK1 (*apoptosis signal-regulating kinase 1*) dovodi i do aktivacije MAP kinaza JNK i p38 (Kim, Xu, i Reed, 2008; Urano i sar., 2000). IRE-1 α –TRAF2–JNK put promoviše ćelijsku smrt stimulacijom Bax-zavisne apoptoze (Lei i Davis, 2003), dok IRE-1 α –TRAF2–p38 put pojačava aktivnost CHOP (Wang i Ron, 1996). Takođe, kompleks IRE-1 α –TRAF2 deluje i na kaspazu 12, što se smatra važnim faktorom u pokretanju apoptoze indukovane ER stresom (Lamkanfi, Kalai, i Vandenabeele, 2004). Naime, kaspaza 12 iseca i time aktivira prokaspazu 9, koja dalje aktivira kaspazu 3. Aktivacija kaspaze 3 predstavlja nepovratni korak prilikom aktivacije procesa apoptoze (Morishima i sar., 2002). Jedno od glavnih obeležja aktivacije procesa apoptoze je isecanje PARP-1 (*Poly (ADP-ribose) polymerase*) molekula, koji ima ulogu u popravljanju grešaka na DNK lancu (Soldani i Scovassi, 2002). Na osnovu svega navedenog može se zaključiti da IRE-1 α ima dvostruku ulogu u odgovoru na ER stres. Prva podrazumeva prilagođavanje ćelije nastalim promenama preko aktivacije XBP1, a druga aktivaciju procesa apoptoze pokretanjem MAP kinaznog puta i aktivacijom NF- κ B (slika 3).



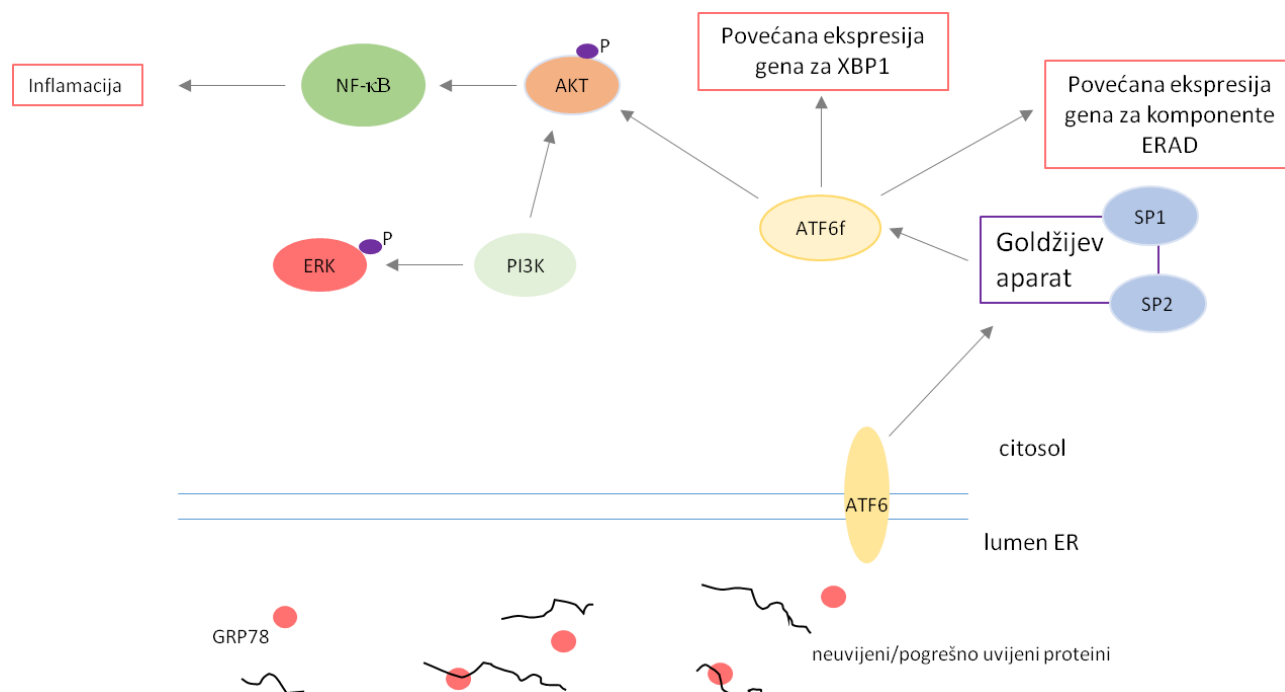
Slika 3. Efekti aktivacije IRE-1α.

Aktivirani IRE-1α dovodi do isecanja introna iz iRNK za XBP1 čime povećava razgradnju nakupljenih proteina i povećava kapacitete ER za obradu proteina. U kompleksu sa TRAF2, IRE-1α dovodi do aktivacije NF-κB, MAPK i kaspaze 12. Aktivacija NF-κB indukuje inflamaciju, dok aktivacija MAPK i kaspaze 12 indukuje apoptozu.

1.1.3 Uloga ATF6 u aktivaciji UPR

Aktivirajući transkripcioni faktor 6 (ATF6) predstavlja još jedan transmembranski protein u membrani ER koji ima ulogu u pokretanju UPR. Ovaj transkripcioni faktor pripada porodici transkripcionih faktora koji poseduju motiv sa strukturom leucinskog rajsferšlusa. Pored uloge u ER stresu, ATF6 ima ulogu u organogenezi i održavanju homeostaze tkiva (Hillary i FitzGerald, 2018). Odvajanje GRP78 od luminalnog domena ATF6 dovodi do translokacije ATF6 iz membrane ER u GA. U GA dolazi do obrade transkripcionog faktora pomoću SP1 i SP2 proteaza (*site 1 and site 2 proteases*). Novonastali segment, ATF6f, funkcioniše kao aktivni transkripcioni faktor i u jedru dovodi do povećane transkripcije gena za XBP1, kao i gena uključenih u ERAD i savijanje proteina (Walter i Ron, 2011). ATF6f, nezavisno od IRE-1α, dovodi do aktivacije NF-κB fosforilacijom protein kinaze B (AKT). NF-κB u ćelijama imunskog sistema dovodi do aktivacije inflamacije (Walter i Ron, 2011). Iako je poznato da tokom ER stresa dolazi do aktivacije AKT kinaze, tačan mehanizam ove aktivacije je i dalje nepoznat (Yamazaki i sar., 2009). Smatra se da fosforilacija AKT predstavlja generalizovani odgovor ćelije na ER stres i da nije ograničena na aktivaciju samo jednog senzora ER stresa (Hu, Han, Couvillon, i Exton, 2004). Jedna od hipoteza pretpostavlja da ER stres dovodi do aktivacije fosfatidil-inozitol 3 kinaze (PI3K), koja zatim fosforiliše i tako aktivira AKT (Hu i sar., 2004). PI3K, pored fosforilacije AKT kinaze, preko MEK kinaze (kinaza MAP kinaze, MAP2K) dovodi do fosforilacije i aktivacije kinaze aktivirane vanćelijskim signalom

– ERK (*extracellular signal-regulated kinases*), koja spada u MAP kinaze (Hu i sar., 2004). Kada govorimo o efektima MAP kinaza na preživljavanje i smrt ćelija, bitno je naglasiti da ERK uglavnom pospešuje preživljavanje ćelija, za razliku od JNK i p38 koje ispoljavaju prethodno opisani proapoptotski efekat (Ryno i sar., 2013) (slika 4).



Slika 4. Efekti aktivacije ATF6.

Nakon obrade u GA nastaje ATF6f, transkripcijski faktor koji povećava transkripciju gena za XBP1, proteina uključenih u ERAD i dovodi do aktivacije NF-κB, čime indukuje inflamaciju.

1.2 Uloga ER stresa u patogenezi bolesti

Kao što je već pomenuto, ER stres i UPR imaju ulogu u patogenezi mnogih patoloških stanja kao što su inflamacija, tumori, neurodegenerativne bolesti i dijabetes melitus (Oakes i Papa, 2015). Sva tri senzora ER stresa (IRE-1 α , ATF6 i PERK) direktno ili indirektno dovode do aktivacije NF-κB, koji ima ulogu u pokretanju inflamacije. NF-κB dovodi do povećane produkcije proinflamatornih citokina, koji dalje mogu da dovedu do povećane produkcije ROS i nastanka oksidativnog stresa (Hillary i FitzGerald, 2018). I dalje nije u potpunosti razjašnjeno da li ER stres dovodi do povećane produkcije ROS ili je oksidativni stres jedan od uzroka nastanka ER stresa. Naime, u ćelijama fibrosarkoma, TNF dovodi do povećane produkcije ROS, što dalje dovodi do nastanka ER stresa (Xue i sar., 2005). Kod mnogih tipova tumora, kao što su glioblastom, multipli mijelom, karcinom dojke i karcinom želuca pokazano je prisustvo hroničnog ER stresa i konstantna aktivacija UPR (Oakes i Papa, 2015). Neke studije su pokazale da je u različitim tumorima povećana ekspresija gena za enzime i proteine koji su uključeni u obradu proteina (npr. GRP78) (Pyrko i sar., 2007). Neurodegenerativne bolesti, kao što su Alchajmerova i Parkinsonova bolest, se takođe dovode u vezu sa ER stresom jer u patogenezi obe bolesti leži prekomerno nakupljanje proteina - β -amiloida u Alchajmerovoj bolesti, odnosno α -sinukleina u Parkinsonovoj bolesti (Oakes i Papa, 2015). Dalje, uloga ER stresa u nastanku dijabetesa ispitivana je u različitim animalnim *in vivo* studijama koje su pokazale da genetske manipulacije, odnosno uklanjanje senzora ER stresa (IRE-1 α , PERK ili ATF6) dovodi do nastanka dijabetesa. Homozigotna delecija PERK kod miševa dovodi do apoptoze β ćelija pankreasa, dok se opisana mutacija PERK kod ljudi dovodi u vezu sa retkim tipom dijabetesa, Volkot-Ralisonovim (*Wolcott-Rallison*) sindromom

(Delépine i sar., 2000; Harding i sar., 2000; Oakes i Papa, 2015). Delecija gena za XBP1 dovodi do neadekvatne obrade proinsulina u lumenu ER, što za posledicu ima smanjenu sekreciju insulina. Pokazano je da ATF6 ima protektivnu ulogu tako što sprečava apoptozu β ćelija pankreasa, što je u skladu sa činjenicom da delecija gena za XBP1 ima negativan efekat na patogenezu dijabetesa (Lee i sar., 2011; Usui i sar., 2012).

1.2.1 Neurodegeneracija, neuroinflamacija i ER stres

Kao što je već pomenuto, ER stres se dovodi u vezu sa mnogim neurodegenerativnim bolestima u čijoj se osnovi nalazi nakupljanje proteina. U Alchajmerovoj bolesti dolazi do nakupljanja β -amiloida unutar lumena ER, što dovodi do narušavanja homeostaze kalcijuma u ER i posledičnog pokretanja procesa apoptoze (Uddin i sar., 2020), dok u Parkinsonovoj bolesti, nakupljanje α -sinukleina u lumenu ER dovodi do nastanka ER stresa najverovatnije usled neadekvatne interakcije α -sinukleina sa šaperonima (Bellucci i sar., 2011). Aktivacija UPR je potvrđena i u *post mortem* uzorcima tkiva mozga i kičmene moždine pacijenata obolelih od Alchajmerove i Parkinsonove bolesti (Hoozemans i sar., 2007; Hoozemans i sar., 2005). Uloga ER stresa je pokazana i u patogenezi amiotrofične lateralne skleroze, Hantingtonove bolesti i prionskih bolesti. Zajedničko za sve ove bolesti je narušavanje homeostaze proteina, homeostaze kalcijuma u ER, vezikularnog transporta, ERAD, funkcije šaperona ER i pokretanje UPR (C. Hetz i Saxena, 2017).

Uloga produženog (hroničnog) ER stresa u patogenezi neurodegeneracije pokazana je u brojnim studijama, a na aktivaciju ER stresa, pored nakupljanja proteina utiče i proinflamatorno okruženje koje se javlja u neurodegenerativnim bolestima (C. Hetz i Saxena, 2017). Sve prethodno navedene bolesti, pored nakupljanja proteina, karakteriše povećana inflamacija koja je povezana sa aktivacijom astrocita i mikroglije, kao i infiltracijom ćelija imunskog sistema u centralnom nervnom sistemu (CNS) (Bertram i Tanzi, 2005; Taylor, Hardy, i Fischbeck Kenneth, 2002). Smatra se da inflamacija dovodi do oštećenja CNS i posledične neurodegeneracije, a sve to se dovodi u vezu sa ER stresom (Clayton i Popko, 2016). Uloga imunskog sistema u patogenezi neuroloških oštećenja u neurodegenerativnim oboljenjima je u velikoj meri bila potcenjena, ali sve veći broj istraživanja ukazuje na značaj inflamacije u razvoju degenerativnih bolesti CNS (Heneka, Kummer, i Latz, 2014). Smatra se da produžena inflamacija preopterećuje reparativne mehanizme CNS, što dovodi do oštećenja tkiva (Glass i sar., 2010). Veliki broj novih istraživanja podržava hipotezu da inflamacija u CNS može doprineti neurodegeneraciji, najverovatnije uspostavljanjem inflamatorne povratne sprege koja dovodi do oštećenja neurona (Heneka i sar., 2014; Perry, Nicoll, i Holmes, 2010). Jedna od bolesti u čiju su patogenezu nedvosmisleno uključene i neuroinflamacija i neurodegeneracija je multipla skleroza (MS) (Trapp i Nave, 2008). S obzirom na ovu činjenicu, MS i njeni animalni modeli su pogodni za ispitivanje povezanosti ER stresa, neurodegeneracije i neuroinflamacije.

1.2.2 ER stres i multipla skleroza

Kao što je već pomenuto, MS predstavlja pogodan model za ispitivanje povezanosti neurodegeneracije, neuroinflamacije i ER stresa, a uloga ER stresa u ćelijama CNS u patogenezi MS je već poznata (W. Lin i Stone, 2015). MS predstavlja T limfocitima posredovanu, autoimunsku demijelinizirajuću bolest CNS koju karakterišu demijelinizirajući plakovi (lezije), inflamacija, gubitak oligodendrocita i degeneracija aksona (Dendrou, Fugger, i Friese, 2015). Inflamatorni infiltrati demijelinizirajućih plakova sadrže T limfocite, B limfocite i plazmocite, kao i aktivirane makrofage (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Etiologija MS još uvek nije definitivno utvrđena, ali se

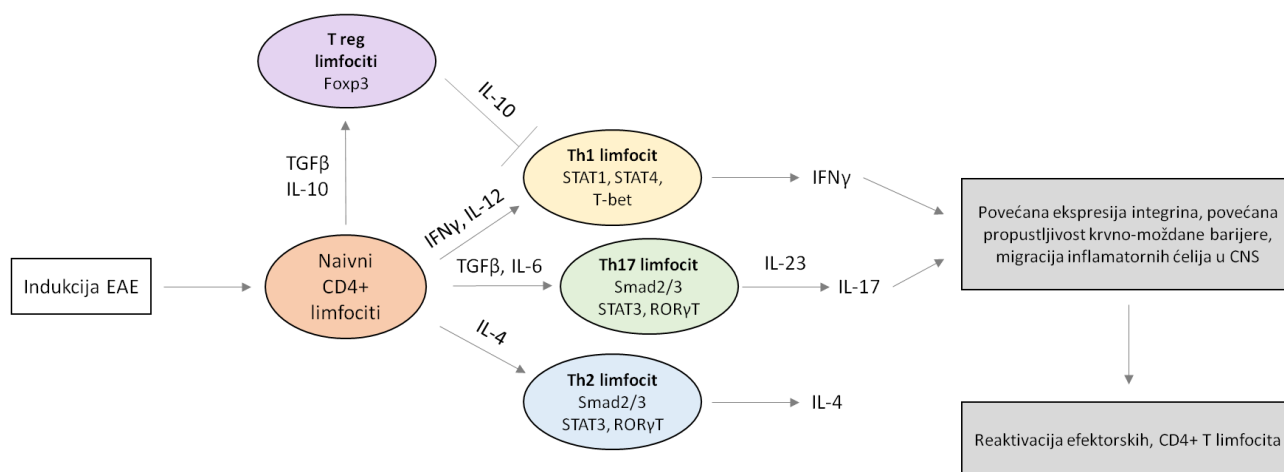
smatra da u njoj učestvuje genetska predispozicija u sadejstvu sa faktorima spoljašnje sredine. Studije na blizancima i bliskim srođnicima nedvosmisleno ukazuju na uticaj genetskih faktora na razvoj ove bolesti (Axisa i Hafler, 2016). Takođe, analizom genoma utvrđeni su MHC i non-MHC lokusi koji se dovode u vezu sa podložnošću ka oboljevanju od MS (Axisa i Hafler, 2016). Iako patogeneza MS nije u potpunosti razjašnjena, smatra se da je neuroinflamacija u MS posredovana autoreaktivnim CD4⁺ pomoćničkim T ćelijama (T *helper*, Th) za čiju aktivaciju su potrebna tri koraka: prepoznavanje antigena/aktivacija T limfocita na periferiji, ulazak T limfocita u CNS i njihova reaktivacija nakon koje se inicira zapaljenska kaskada i pokreće autoimunska odgovor prema antigenima CNS. Glavne subpopulacije ćelija uključene u ovu kaskadu su Th1 i Th17 ćelije, koje sekretuju svoje efektorske citokine IFN- γ i IL-17 (Dargahi i sar., 2017; Ransohoff, Kivisäkk, i Kidd, 2003). Tokom patogeneze MS, u CNS je, pored prisustva autoreaktivnih T limfocita, pokazano i prisustvo autoreaktivnih B limfocita, kao i ćelija urođene imunosti kao što su makrofagi i NK (*natural killer*) ćelije (Høglund i Maghazachi, 2014). Reaktivne ćelije imunskog sistema u CNS otpuštaju brojne inflamatorne medijatore kao što su azot-oksidi (NO), ROS i proinflamatorne citokine koji dovode do oštećenja funkcije neurona i aktiviraju astrocite i mikrogliju. Kontinuirana produkcija medijatora inflamacije dovodi do formiranja neurotoksičnog okruženja koje pospešuje demijelinizaciju, degeneraciju aksona, kao i smrt oligodendrocita i neurona (Sprenkle i sar., 2017).

Poznato je da tokom patogeneze MS dolazi do aktivacije UPR u oligodendrocitima, astrocitima, neuronima, kao i u mikrogliji, makrofagima i T limfocitima, (W. Lin, Harding, Ron, i Popko, 2005; W. Lin i Stone, 2015; Ní Fhlathartaigh i sar., 2013; Way i Popko, 2016). Kvantitativna PCR analiza markera ER stresa u demijelinizirajućim lezijama i naizgled zdravoj beloju masi pacijenata obolelih od MS pokazala je značajno povećanje ekspresije gena za ATF4, GRP78 i CHOP u odnosu na zdrave osobe (Cunnea i sar., 2011). Imunohistohemijske analize rađene na uzorcima biopsije i posmrtno uzetim uzorcima tkiva pacijenata obolelih od MS takođe su pokazale povećanu ekspresiju GRP78 i CHOP markera u različitim tipovima ćelija CNS, kao što su oligodendrociti, astrociti, T limfociti i mikroglija (Mháiille i sar., 2008; Ní Fhlathartaigh i sar., 2013). Povećana ekspresija markera ER stresa i UPR u MS lezijama ukazuje na potencijalnu povezanost narušene homeostaze ER i razvoja aktivnih lezija. Inflamatorno okruženje u CNS može da dovede do pokretanja ER stresa u oligodendrocitima, koji učestvuju u mijelinizaciji. Oligodendrociti su ćelije koje u inflamatornoj sredini najviše podležu oštećenju koje je izazvano ER stresom, što je u skladu sa činjenicom da ove ćelije imaju veliku sekretornu aktivnost (sinteza lipida i proteina mijelina) (C. Hetz i Saxena, 2017). Jedan od glavnih proinflamatornih citokina, IFN γ , indukuje ER stres i smrt oligodendrocita u *in vitro* i *in vivo* uslovima. Kontinuirana neuroinflamacija može indukovati ER stres u oligodendrocitima, što dovodi ne samo do narušavanja njihove sposobnosti mijelinizacije, nego i do pokretanja ćelijske smrti (W. Lin i sar., 2005). Međutim, neka istraživanja su pokazala da aktivacija UPR doprinosi očuvanju funkcije oligodendrocita u prisustvu hroničnog ER stresa (W. Lin i sar., 2007). Uloga ER stresa i UPR u aktivaciji T limfocita pokazana je u brojnim istraživanjima. Naime, istraživanja su utvrdila da hronični ER stres održava T limfocite u poluaktivnom stanju kao i da njegova modulacija ima ulogu u aktivaciji T limfocita (Omar i sar., 2016). Povećana ekspresija GRP78 je takođe uočena tokom aktivacije T limfocita (Thaxton i sar., 2017).

1.3 Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis

Eksperimentalni autoimunski encefalomijelitis (EAE) predstavlja najčešće korišćeni animalni model neuroinflamacije. Neuroinflamacija ima ulogu u patogenezi demijelinizacije i stoga se ovaj model koristi za proučavanje humanih demijelinizirajućih bolesti kao što je MS (Constantinescu, Farooqi, O'Brien, i Gran, 2011). Pored toga, EAE ima značajne kliničke i histopatološke sličnosti sa MS i predstavlja značajan model za proučavanje patogeneze ove bolesti. Na razvoj EAE, kao i na razvoj MS, utiče genetska predispozicija, a u prilog ovome govori činjenica da postoje sojevi životinja koji nisu podložni razvoju bolesti. Tako, *Dark agouti* (DA) pacovi predstavljaju soj pacova koji je podložan razvoju bolesti, dok *Albino oxford* (AO) pacovi nisu podložni razvoju EAE (Vukmanović, Stojković, i Lukić, 1989). EAE je, kao i MS, posredovan T limfocitima, među kojima ključnu ulogu imaju Th1 i Th17 ćelije (Robinson i sar., 2014). Tokom razvoja bolesti dolazi do infiltracije CNS autoreaktivnim T limfocitima, povećane propustljivosti krvno-moždane barijere (KMB), kao i do demijelinizacije i posledičnog poremećaja u sprovođenju impulsa u CNS (Glatigny i Bettelli, 2018). Patogeneza i kliničke manifestacije EAE variraju u zavisnosti od vrste životinja i načina indukcije bolesti (Robinson i sar., 2014). Bolest se može indukovati aktivnom imunizacijom, emulzijom Kompletnog Frojndovog adjuvansa (*Complete Freund's adjuvant*, CFA) sa homogenatom kičmene moždine (HKM) ili proteinskim komponentama mijelina kao što su mijelinski bazni protein (MBP), proteolipidni protein (PLP) ili mijelin oligodendrocitni glikoprotein (MOG). EAE se takođe može indukovati i pasivnim transferom MBP specifičnih CD4⁺ T limfocita (koji su reaktivirani *in vitro*) u singene primaocce (Glatigny i Bettelli, 2018). Pored indukcije EAE aktivnom i pasivnom imunizacijom, postoji i takozvani spontani EAE. Spontani EAE se javlja kod transgenih miševa čiji T ćelijski receptor (TCR) prepoznaje autoantigene mijelina dovodeći do spontane demijelinizacije (Glatigny i Bettelli, 2018). Bolest indukovana aktivnom imunizacijom ima tipičan klinički tok. Nakon prodromalnog perioda (7-10 dana) dolazi do pojave progresivne paralize, koja prvo zahvata rep, a zatim i zadnje udove. Moguća je i pojava paralize prednjih udova. Pojavu bolesti prati i gubitak telesne težine. Nakon dvadeset dana dolazi do spontanog oporavka, ali je u nekim slučajevima moguća i smrt životinje (Robinson i sar., 2014). U zavisnosti od protokola imunizacije, bolest može imati monofazni ili relapsno-remitentni tok (Lassmann i Bradl, 2017).

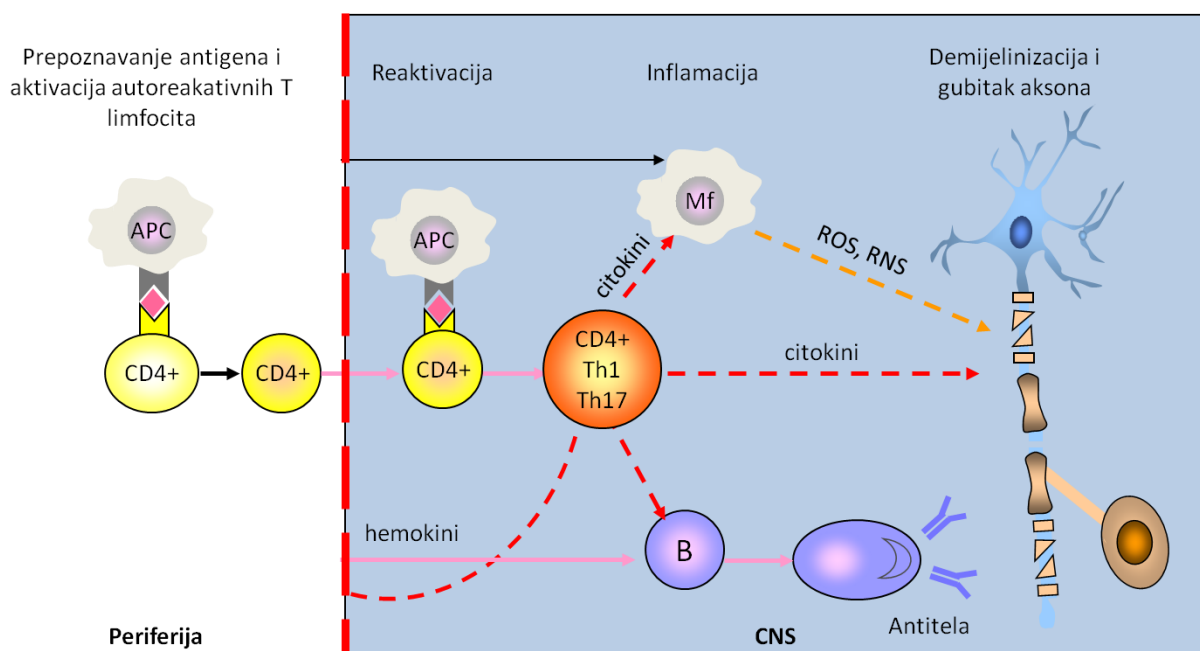
Tok bolesti nakon imunizacije može se podeliti u 3 faze: induktivnu, efektorsku fazu i fazu oporavka. U induktivnoj fazi bolesti dolazi do aktivacije CD4⁺ T limfocita u efektorske ćelije koje proizvode proinflamatorne citokine. U zavisnosti od citokinskog miljea, CD4⁺ ćelije se diferenciraju u Th1 efektorske ćelije koje proizvode IFN- γ ili Th17 efektorske ćelije koje proizvode IL-17 (Constantinescu i sar., 2011). IL-12 i IFN- γ dovode do aktivacije transkripcionih faktora STAT1 i STAT4, koji dalje stimulišu ekspanziju transkripcionog faktora T-bet. T-bet, STAT1 i STAT4 imaju značajnu ulogu u diferencijaciji naivnih CD4⁺ ćelija u efektorske Th1 ćelije (Glatigny i Bettelli, 2018). Diferencijaciju naivnih CD4⁺ ćelija u Th17 efektorske ćelije stimulišu transformišući faktor rasta β (*transforming growth factor β* - TGF- β) i IL-6 preko Smad2/3 i STAT3 koji stimulišu transkripcioni faktor ROR γ t (*retinoic acid orphan related receptor γ t*). Th17 efektorske ćelije na svojoj površini ekspimiraju receptor za IL-23 (IL-23R) koji je odgovoran za njihovo preživljavanje i klonsku ekspanziju, i zahtevaju IL-23 da bi postale patogene i da bi se u potpunosti aktivirale. Ovo je značajno jer je TGF- β , osim za diferencijaciju Th17 ćelija, neophodan i za diferencijaciju regulatornih T ćelija (Treg) koje ekspimiraju Foxp3 transkripcioni faktor. Pored TGF- β , diferencijacija Treg zahteva i prisustvo IL-10 (Glatigny i Bettelli, 2018). Efektorske T ćelije, pre svega Th1 ćelije, dovode do ushodne regulacije adhezionih molekula ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule 1*) i VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule*), što dovodi do povećane permeabilnosti krvnih sudova i omogućava efektorskim T ćelijama prolazak kroz KMB (Glatigny i Bettelli, 2018).



Slika 5: Diferencijacija naivnih CD4⁺ ćelija u efektorske (Th1, Th17 i Th2) ćelije ili u regulatorne T ćelije (Treg) nakon indukcije EAE.

Naivne CD4⁺ T ćelije se pod dejstvom IFN- γ i IL-12 diferenciraju u Th1 efektorske ćelije, dok se pod dejstvom IL-4 diferenciraju u Th2 ćelije. TGF- β zajedno sa IL-6 stimuliše diferencijaciju CD4⁺ ćelija u Th17 efektorske ćelije, dok u sadejstvu sa IL-10 stimuliše nastanak Treg ćelija. Glavni citokini efektorskih ćelija koji su uključeni u patogenezu EAE su IFN- γ (Th1) i IL-17 (Th17).

Pored efektorskih T limfocita, kroz oštećenu KMB u CNS migriraju i druge ćelije imunskog sistema kao što su B limfociti i monociti/makrofagi. U CNS, nakon kontakta sa sopstvenim antigenom, najverovatnije poreklom iz mijelina, dolazi do reaktivacije CD4⁺ T limfocita, što dalje pokreće inflamaciju unutar CNS i uvodi bolest u efektorsku fazu. Prezentovanje antigena vrše antigen prezentujuće ćelije (APC) CNS, najčešće dendritske ćelije, ili u sklopu APC ćelija koje su migrirale kroz KMB (Constantinescu i sar., 2011). Komponente humoralne imunosti i solubilni medijatori inflamacije mogu doprineti patogenezi bolesti aktivacijom sistema komplementa, direktnom citotoksičnošću ili produkcijom NO i ROS (Hemmer i sar., 2006). Aktivirani B limfociti, to jest plazmociti proizvode antitela koja dovode do aktivacije sistema komplementa ili citotoksičnosti posredovane antitelima (Martin i Monson, 2007). Efektorske Th2 ćelije produkcijom IL-4 mogu pospešiti nastanak antitela. Citotoksični CD8⁺ T limfociti mogu pospešiti oštećenje daljom produkcijom citokina, kao i oslobađanjem granzima i perforina, koji direktno dovode do oštećenja aksona (Constantinescu i sar., 2011; Glatigny i Bettelli, 2018; Lassmann i Bradl, 2017). Bez obzira na važnu ulogu humoralne imunosti i CD8⁺ citotoksičnih limfocita, citokini efektorskih Th1 (IFN- γ) i Th17 (IL-17) ćelija ipak imaju najznačajniju ulogu u patogenezi EAE, zajedno sa makrofagima/mikroglijom koji proizvode proinflamatorne citokine TNF i interleukin 1 β (IL-1 β) (C.-C. Lin i Edelson, 2017; Plastini, Desu, i Brambilla, 2020; Valentin-Torres i sar., 2016). Do rezolucije inflamacije dolazi usled produkcije anti-inflamatornih citokina, kao što je IL-10, ili aktivacije drugih imunoregulatornih mehanizama, na primer aktivacije regulatornih T limfocita. Regulatorne T ćelije suprimiraju aktivnost efektorskih T ćelija i održavaju imunološku ravnotežu inhibicijom proliferacije i supresijom aktivnosti Th1 ćelija (Constantinescu i sar., 2011).



Slika 6: Imunopatogeneza EAE.

Prepoznavanje antigena i aktivacija autoreaktivnih limfocita se dešava na periferiji, nakon čega ove ćelije dospevaju u CNS. U CNS dolazi do ponovnog prepoznavanja antigena, odnosno reaktivacije limfocita i pokretanja inflamacije koja za posledicu ima demijelinizaciju i oštećenje aksona.

1.3.1 EAE i ER stres

Stone i Lin su pokazali da ER stres i UPR imaju ulogu u razvoju i progresiji inflamatornih bolesti CNS, uključujući MS i njen animalni model EAE (W. Lin i Stone, 2015). Povišene vrednosti markera ER stresa i UPR uočene su u različitim tipovima ćelija tokom patogeneze EAE. Naime, povećana fosforilacija PERK i eIF2 α , kao i povećana ekspresija GRP78 i CHOP uočene su u oligodendrocitima, T limfocitima, astrocitima i mikroglijom/makrofagima (Deslauriers i sar., 2011; W. Lin i sar., 2007; Ní Fhlathartaigh i sar., 2013). Takođe, povećana ekspresija GRP78 uočena je i u hipokampusu životinja kojima je indukovano EAE (Kamarehei i sar., 2019).

Jedan od markera UPR koji je najviše ispitan tokom patogeneze EAE je PERK. U oligodendrocitima izolovanim iz lezija pacijenata obolelih od MS, kao i iz lezija životinja obolelih od EAE, uočena je aktivacija PERK i NF- κ B (Mc Guire i sar., 2013). Pored oligodendrocita, aktivacija PERK je uočena i u drugim tipovima ćelija (T limfociti, mikroglija, makrofagi i astrociti) (Cunnea i sar., 2011; Mháille i sar., 2008), a poznato je da PERK reguliše funkciju T limfocita, makrofaga i astrocita (Meares i sar., 2014; Woo i sar., 2009). Brojne studije na miševima kod kojih postoji defekt u aktivaciji PERK ili delecija PERK/GRP78 u oligodendrocitima pokazuju njegov značaj i neuroprotektivno dejstvo u EAE (Yassir Hussien, Cavener, i Popko, 2014; Y. Hussien i sar., 2015; Wensheng i sar., 2013). U neuronima životinja kojima je indukovano EAE, povećanu aktivaciju PERK prati povećana fosforilacija eIF2 α i aktivacija CHOP u poređenju sa zdravim životinjama, što ukazuje na uticaj UPR na preživljavanje neurona tokom EAE (Ní Fhlathartaigh i sar., 2013). Farmakološko povećanje fosforilacije eIF2 α dovodi do poboljšanja kliničkih znakova EAE tako što sprečava diferencijaciju efektorskih Th17 ćelija za koje se zna da imaju značajnu ulogu u patogenezi EAE (L. Chen i sar., 2021). Pojedine studije su pokazale da umerena aktivacija PERK u oligodendrocitima pre pojave prvih znakova EAE značajno ublažava njegovo kliničko ispoljavanje, kao i da dovodi do smanjenja demijelinizacije, gubitka oligodendrocita i degeneracije

aksona (Wensheng i sar., 2013; Yue i sar., 2019), Međutim, nije razjašnjeno na koji način aktivacija PERK dovodi do ublažavanja kliničkog ispoljavanja EAE i smanjenja demijelinizacije. Novija studija je pokazala da aktivacija ATF4, glavnog transkripcionog faktora koji se aktivira dejstvom PERK, nema uticaj na kliničko ispoljavanje EAE, demijelinizaciju i gubitak oligodendrocita i aksona tokom patogeneze EAE (Yue i sar., 2019). Takođe, umerena aktivacija PERK nema efekata na inflamaciju u oligodendrocitima ni u kuprizonom izazvanim demijelinizirajućim lezijama, ni u lezijama koje se javljaju tokom patogeneze EAE (Y. Lin i sar., 2014).

IFN- γ , jedan od glavnih proinflamatornih citokina koji se sekretuje tokom patogeneze EAE, u CNS dovodi do ER stresa i pokretanja UPR, što dovodi do aktivacije JAK-STAT1 puta, aktivacije apoptoze oligodendrocita i posledičnog gubitka mijelina (W. Lin i sar., 2005; W. Lin i Lin, 2010). IFN- γ indukuje apoptozu oligodendrocita i inhibira remijelinizaciju i u kuprizonskom modelu demijelinizacije koji, pored EAE, predstavlja jedan od najčešće korišćenih modela za ispitivanje demijelinizacije (W. Lin i sar., 2006). CHOP, pored aktivacije apoptoze, dovodi i do povećanja produkcije IL-6 najverovatnije inhibicijom LIP (*liver inhibitory protein*) koji inhibira transkripciju gena za IL-6 (Hattori i sar., 2003). Uloga IL-6 u patogenezi EAE kod miševa je odavno poznata (Okuda i sar., 1999). Naime, IL-6 ima ulogu u diferencijaciji Th17 ćelija koje se smatraju glavnim efektorskim ćelijama u patogenezi EAE i povećava permeabilnost KMB (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). Koncentracija IL-6 raste sa razvojem EAE, što ukazuje na značaj IL-6 u razvoju neuroinflamacije (Kamarehei i sar., 2019). Ushodna regulacija IL-6 pod dejstvom CHOP nesumnjivo ukazuje na vezu ER stresa i inflamacije (Kamarehei i sar., 2019).

U hipokampusu miševa kojima je indukovao EAE dolazi do apoptoze ćelija CNS, a na vezu ER stresa i apoptoze u hipokampusu ukazuje povećana koncentracija CHOP i kaspaze 12. Do aktivacije kaspaze 12 dolazi aktivacijom IRE-1 α , dok CHOP raste nakon aktivacije dva senzora ER stresa, PERK i IRE-1 α (Kamarehei i sar., 2019). Povećanje nivoa kaspaze 12 koje je u korelaciji sa povećanom aktivnošću kaspaze 3 ukazuje na ulogu kaspaze 12 tokom patogeneze EAE (Morishima i sar., 2002). S druge strane, u hipokampusu EAE miševa je uočena snižena ekspresija antiapoptotskog proteina Bcl-2, koja se dovodi u vezu sa aktivacijom CHOP. Pored pokretanja apoptoze, IRE-1 α dovodi i do obrade iRNK za XBP1, a farmakološka inhibicija ER stresa, kao i selektivna delecija XBP1 u limfocitima odlažu početak bolesti EAE (Brucklacher-Waldert i sar., 2017).

Iako postoji veliki broj istraživanja koja ukazuje na ulogu ER stresa u razvoju EAE, njegova uloga u ćelijama imunskog sistema tokom patogeneze EAE do sada nije detaljno ispitivana.

1.4 Uloga humoralne imunosti u patogenezi MS i EAE

Multipla skleroza i EAE su bolesti čija je patogeneza prevashodno posredovana T limfocitima, ali kod 90% pacijenata obolelih od MS u cerebrospinalnoj tečnosti postoje autoantitela na antigene mijelina. Postojanje oligoklonskih antitela u likvoru ima dijagnostički značaj, pogotovo kod pacijenata kojima su uredni nalazi magnetne rezonance (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Antitela prisutna u likvoru su usmerena na brojne antigene mijelina, kao što su MOG ili MBP. Tačna uloga autoantitela u patogenezi MS još uvek nije u potpunosti razjašnjena, ali je poznato da je titar antitela veći tokom aktivne faze bolesti u odnosu na fazu remisije (Susanne i sar., 2004). U demijelinizirajućim plakovima su, pored drugih ćelija imunskog sistema, zastupljeni i efektorski B limfociti - plazmociti koji sekretuju lake lance imunoglobulina i IgG antitela. Pokazano je da su plazmociti izuzetno zastupljeni u hroničnim lezijama koje okružuju naizgled normalnu belu masu (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Tačan mehanizam koji dovodi do mobilizacije i održavanja B limfocita tokom patogeneze MS nije poznat, ali se zna da mikrosredina CNS podstiče stalnu

diferencijaciju B limfocita u intratekalne efektorske plazma ćelije koje proizvode antitela (Ziemssen i Ziemssen, 2005).

Uloga B limfocita u indukciji animalnog modela MS nije dovoljno istražena. Naime, ćelije humoralne imunosti samostalno ne mogu da indukuju EAE, ali su studije na miševima sa nedostatkom B limfocita pokazale da su oni neophodni za razvoj bolesti kada je bolest indukovana MOG proteinom, dok nisu neophodni kada se bolest indukuje izolovanim MOG peptidima (Lyons i sar., 1999). Činjenica da su B limfociti neophodni tokom indukcije EAE MOG proteinom, odnosno da nisu neophodni kada se bolest indukuje MOG peptidom, ukazuje na značaj antitela kada je bolest indukovana složenim molekulima. Suprotno od očekivanog, titar antitela, kod životinja obolelih od EAE nije u korelaciji sa kliničkom slikom bolesti (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Antitela protiv MOG proteina su neophodna i za indukciju EAE kod primata (Genain i Hauser, 1996) i potenciraju MBP-om indukovani EAE kod pacova *Lewis* soja (Linnington i sar., 1988). Transgeni miševi koji prekomerno proizvode autoantitela protiv MOG ne razvijaju EAE kada je bolest indukovana MOG peptidom, ali kada je bolest indukovana drugim antigenima, kao što je na primer MBP, dolazi do ubrzanog razvoja bolesti i ispoljavanja teže kliničke slike bolesti (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Pored antitela na MOG, ispitan je i efekat prisustva antitela protiv drugih antigena (MBP, PLP) tokom patogeneze EAE. Takođe je ispitivano i prisustvo antitela protiv lipidnih antigena mijelina (Ziemssen i Ziemssen, 2005).

Kada je u pitanju uloga humoralne imunosti u patogenezi MS i EAE, pretpostavlja se da veliki značaj ima uloga B limfocita kao APC. B limfociti na taj način dovode do aktivacije T limfocita, koji su glavne efektorske ćelije u patogenezi ove bolesti. Specifičnost autoantitela za epitope CNS je identična specifičnosti T limfocita. Prepoznavanje istih antigena od strane T i B limfocita može da ima značajnu ulogu u patogenezi bolesti (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Za aktivaciju T limfocita je, pored prezentacije antigena, neophodan i kostimulatorni signal koji T limfociti dobijaju od B limfocita (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Naime, broj CD80⁺ B limfocita u krvi pacijenata obolelih od MS je značajno povišen tokom egzacerbacije bolesti u poređenju sa remisijom (Genç, Dona, i Reder, 1997). Antitela takođe opsonizuju mijelin, što dovodi do fagocitoze od strane aktiviranih makrofaga (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Pored toga, antitela mogu da pospeše migraciju makrofaga i aktivaciju rezidentne mikroglije u MS lezijama (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Autoantitela vezana za mijelinske antigene pospešuju i migraciju antigen-specifičnih T limfocita dovodeći do nastanka T limfocitnog infiltrata (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Pored svega navedenog, ispitan je i imunoregulatorna uloga B limfocita. B limfociti kao APC mogu da preusmere diferencijaciju T limfocita od Th1 ka Th2 ćelijama koji promovišu proliferaciju B limfocita i sintezu antitela. Pokazano je da oporavak miševa kojima je indukovana EAE zavisi od prisustva autoreaktivnih B limfocita. Naime, u odsustvu B limfocita koji proizvode antiinflamatorni citokin IL-10, bez obzira na prisustvo T limfocita koji proizvode IL-10, nije došlo do oporavka životinja kojima je indukovana EAE (Fillatreau i sar., 2002; Ziemssen i Ziemssen, 2005). Pored svega navedenog, pokazano je i da autoantitela mogu imati ulogu u remijelinizaciji (Ziemssen i Ziemssen, 2005).

1.4.1 Raselova tela

Raselova tela su prvobitno opisana kao bazofilne citoplazmatske inkluzije u plazmocitima, a danas se zna da predstavljaju proširene cisterne ER koje u svom lumenu sadrže imunoglobuline (Kopito i Sitia, 2000). Na nastanak Raselovih tela mogu uticati različiti faktori, a neki od mogućih uzroka su nemogućnost razgradnje ili eksportovanja imunoglobulina, strukturne promene teških lanaca imunoglobulina, narušavanje strukture lakih lanaca imunoglobulina (Corcos i sar., 2010; Decourt i sar., 2004; Kopito i Sitia, 2000; Mattioli i sar., 2006) i deficit IgM Fc (FcμR) receptora (Mahmoudi Aliabadi i sar., 2023). Jedna od hipoteza nastanka Raselovih tela pretpostavlja da ona

nastaju usled pokušaja da ER spreči sekreciju aberantnih imunoglobulina, odnosno da nastanak Raselovih tela predstavlja jedan od mehanizama kontrole na nivou ER (Hasegawa i sar., 2014). Na elektronskom mikroskopu ove strukture se opisuju kao guste, uglavnom homogene, granule koje se nalaze unutar cisterni GER, sa jasnom granicom između tela inkluzije/granule i zida cisterne (Maldonado i sar., 1966). Sinteza mutiranih imunoglobulina, koji se ne sekretuju niti razgrađuju, dovoljna je da dovede do nastanka Raselovih tela u različitim tipovima ćelija (Kopito i Sitia, 2000). Raselova tela su prvobitno opisana u plazmocitima, gde se najčešće i uočavaju, ali se proširene cisterne ER koje sadrže aberantne proteine uočavaju i u drugim tipovima sekretornih ćelija (Kopito i Sitia, 2000). Raselova tela su prisutna u plazmocitima kod pacijenata obolelih od multiplog mijeloma, monoklonskih gamopatija, kao i kod akutnog virusnog meningitisa i meningoencefalitisa (Ribourtout i Zandecki, 2015). Plazmociti koji sadrže brojna Raselova tela u svojoj citoplazmi sa ekscentrično postavljenim jedrom se nazivaju Mot ćelije (*Mott cells*). Iako se pretpostavlja da Raselova tela nastaju na terenu ER stresa u plazmocitima, jasna veza između nastanka Raselovih tela i pokretanja UPR do sada nije utvrđena.

1.5 Modulacija ER stresa i signalnog puta UPR kao potencijalna terapijska meta

Uzimajući u obzir ulogu ER stresa i UPR u patogenezi različitih bolesti, farmakološka modulacija ovih signalnih puteva bi potencijalno mogla imati povoljan terapijski efekat. Paralelna aktivacija senzornih molekula IRE-1 α , PERK i ATF6, kao i preplitanje njihovih signalnih puteva, zahteva veći broj ciljanih signalnih molekula prilikom pokušaja modulacije signalnog puta UPR. Kao što je već objašnjeno, UPR na početku ima protektivni efekat i njegov osnovni cilj je adaptacija ćelije na ER stres. Međutim, ukoliko je adaptacija neuspešna ili ukoliko se kontinuirano stimulišu pojedini senzori ER stresa (PERK i IRE1 α), dolazi do pokretanja procesa apoptoze. Jedan od potencijalnih terapijskih pristupa bi mogao biti produžavanje adaptivne faze UPR, što bi ćeliji povećalo šanse za oporavak (Oakes i Papa, 2015). Manipulacija signalnim putevima koji se pokreću aktivacijom IRE-1 α i ATF6 bi za posledicu mogla imati povećanu transkripciju gena za XBP1 i njegovu aktivaciju. Imajući u vidu da XBP1 ima protektivan efekat, ovim bi se pospešilo preživljavanje ćelija (Claudio Hetz i sar., 2015; Oakes i Papa, 2015). S druge strane, CHOP dovodi do pokretanja procesa apoptoze, tako da bi i njegova inhibicija ili inhibicija njegovog nishodnog molekula GADD34 mogla imati potencijalno protektivni efekat (Oakes i Papa, 2015). S obzirom da PERK ima dvostruku ulogu, inhibicija translacije fosforilacijom eIF2 α i aktivacija apoptoze aktivacijom CHOP, ostaje nejasno da li bi dugoročna stimulacija ovog molekula imala protektivan efekat ili bi pospešila ćelijsku smrt. Preliminarni rezultati nekih istraživanja ukazuju da bi inhibicija signalnog puta PERK u neurodegeneraciji mogla imati protektivan efekat (C. Hetz i Saxena, 2017; Oakes i Papa, 2015).

U poslednjih nekoliko godina, korišćeni su različiti farmakološki agensi sa ciljem modulacije ER stresa. Rapamicin, inhibitor mTOR (*mechanistic target of rapamycin*), dovodi do aktivacije procesa autofagije i time inhibira ER stres (Jung & Choi, 2016). Smatra se da se autofagijom razgrađuju proteini koji ne mogu biti usmereni u ERAD, tako da bi njena aktivacija mogla da inhibira ER stres (Jung i Choi, 2016). Shodno tome, metformin, aktivator AMP-zavisne kinaze (AMPK) koja indukuje autofagiju, dovodi do inhibicije ER stresa (Jung i Choi, 2016). GLP-1 (*Glucagon-like peptide-1*) i njegovi aktivatori ublažavaju ER stres aktivacijom ATF4 molekula, dok agonisti PPAR (*Peroxisome Proliferator-Activated Receptor*) dovode do inhibicije inflamacije i apoptoze smanjenom aktivacijom IRE-1 α -XBP1-JNK puta (Jung i Choi, 2016). Inhibitori receptora za angiotenzin 2 dovode do inhibicije apoptoze inhibicijom CHOP (Jung i Choi, 2016). Pored navedenih farmakoloških agenasa, široko je rasprostranjena upotreba hemijskih šaperona, kao što je tauroursodeoksiholna kiselina (*tauroursodeoxycholic acid*, TUDCA) u cilju inhibicije ER stresa (Oakes i Papa, 2015).

Ursodeoksiholna kiselina (*ursodeoxycholic acid*, UDCA) i njena konjugovana kiselina TUDCA predstavljaju sekundarne žučne soli koje su prvobitno korišćene u terapiji holestatskih bolesti jetre (Vang i sar., 2014). UDCA/TUDCA ispoljavaju povoljne efekte na inflamatorne metaboličke bolesti, kao što su ateroskleroza, dijabetes melitus i bubrežna insuficijencija (Vang i sar., 2012), ali i na neurodegenerativne bolesti kao što su Alchajmerova, Parkinsonova i Hantingtonova bolest (Vang i sar., 2014). Studije su pokazale da UDCA svoj povoljan efekat ostvaruje inhibicijom mitohondrijalnog puta apoptoze, inhibicijom aktivacije kaspaza i smanjenjem nivoa ER stresa (Amaral i sar., 2009). Smatra se da UDCA dovodi do inhibicije ER stresa aktivacijom ATF6 i stimulacijom transporta proteina (Omura i sar., 2013), kao i inhibicijom fosforilacije eIF2 α (Omura i sar., 2013). Uloga UDCA u inhibiciji apoptoze i stabilizaciji mitohondrija je pokazana na nekoliko modela neurodegenerativnih bolesti, a pokazano je i da UDCA ima sposobnost prolaska kroz KMB (Vang i sar., 2014). Kao što je već objašnjeno, do aktivacije kaspaze 12 i pokretanja apoptoze tokom UPR dolazi preko kompleksa IRE-1 α -TRAF2 (Lamkanfi i sar., 2004). Pokazano je da je jedan od mehanizama kojim TUDCA dovodi do inhibicije apoptoze upravo inhibicija kaspaze 12, što posledično dovodi do inhibicije aktivacije kaspaze 3 kao glavne efektorske kaspaze, (Vang i sar., 2014). Takođe, TUDCA dovodi do fosforilacije i translokacije proapoptotskog proteina Bad. Translokacija Bad iz matriksa mitohondrija u citosol i njegova fosforilacija za posledicu imaju inhibiciju apoptoze (Vang i sar., 2014). Studije na miševima sa dijabetesom melitusom tip 1, koji imaju deficit ATF6 i XBP1, pokazale su da TUDCA povećava ekspresiju ATF6 i XBP1 i smanjuje inflamatorni infiltrat u β ćelijama pankreasa (Engin i sar., 2013). Protektivan efekat TUDCA je pokazan i na modelima inflamatornih bolesti gastrointestinalnog trakta (Vang i sar., 2014). Smatra se da UDCA dovodi do inhibicije aktivacije NF- κ B, što dovodi do inhibicije inflamacije. Tačan mehanizam kojim UDCA dovodi do inhibicije NF- κ B još uvek nije razjašnjen (Huang, 2021). Pored inhibicije NF- κ B, UDCA svoj antiinflamatorni efekat ostvaruje i inhibicijom produkcije proinflamatornih medijatora kao što je NO (Huang, 2021). Sve navedeno ukazuje da bi modulacija ER stresa primenom UDCA mogla imati protektivne efekte u neurodegeneraciji i inflamaciji.

1. Ispitati prisustvo ER stresa u ćelijama imunskog sistema tokom indukcije EAE
2. Ispitati efekte inhibicije ER stresa u ćelijama imunskog sistema na razvoj EAE

3 MATERIJALI I METODE

3.1 Eksperimentalne životinje

Za potrebe ovog istraživanja korišćene su ženke pacova genetski visokosrodnih sojeva *Dark Agouti* (DA) i *Albino oxford* (AO) starosti 8 nedelja. Prosečna telesna težina DA pacova na početku eksperimenata je bila $109,8 \pm 15,97$ grama, dok je prosečna težina AO pacova bila $115,4 \pm 7,74$ grama. Sve životinje su nabavljene iz uzgajališta Vivarijuma Galenika AD (Medicinski fakultet, Univerzitet u Beogradu) i gajene su pod standardnim uslovima ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, vlažnost vazduha $50 \pm 10\%$, ciklus dan-noć 12/12 h) sa neograničenim pristupom hrani i vodi. Svi planirani eksperimenti i procedure su odobreni od strane etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu (broj 1096/2) i Uprave za veterinu Ministarstva poljoprivrede, šumarstva i vodoprivrede (broj 323-07-11621/2018-05). Prilikom rada sa životinjama poštovane su odredbe Evropskog parlamenta i saveta (2010/63/EU) za rukovanje eksperimentalnim životinjama, kao i ARRIVE smernice (Kilkenny, Browne, Cuthill, Emerson, i Altman, 2010). Svi eksperimenti su planirani tako da se maksimalno umanju patnja životinja i smanji broj životinja u eksperimentima.

3.2 Imunizacija životinja i praćenje kliničkog toka EAE

Imunizacija, to jest indukcija EAE, obuhvatila je dva soja životinja: pacove DA soja koji su podložni razvoju EAE i pacove AO soja koji su rezistentni ka razvoju bolesti (Vukmanović i sar., 1989). Za indukciju EAE korišćen je singeni homogenat kičmene moždine (HKM) sa kompletnim Frojndovim adjuvansom (*Complete Freund's Adjuvant*, CFA) koji sadrži 1 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (Difco Laboratories, Detroit, MI) i služi za pojačavanje imunskog odgovora aktivacijom urođene imunosti. Za pripremu HKM, kičmena moždina DA, odnosno AO pacova, homogenizovana je u fiziološkom rastvoru fosfatnog pufera (*phosphate buffer saline* – PBS) u odnosu 1:1 (50% težina u odnosu na zapreminu). Emulzija za imunizaciju je pripremljena mešanjem HKM i CFA u ekvivalentnom odnosu. Imunizacija životinja izvršena je intradermalnim injektovanjem 100 μL emulzije u obe zadnje šape. Kontrolnim životinjama je u zadnje šape injektovan PBS u istoj zapremini.

U cilju praćenja kliničkih znakova EAE životinje su posmatrane i skorovane svakodnevno, od dana imunizacije (nulti dan) do 28. dana posle imunizacije (dpi). Skorovanje životinja je vršeno prema sledećoj skali:

- 0 - odsustvo kliničkih znakova bolesti;
- 1 - atonija repa;
- 2 - pareza zadnjih ekstremiteta;
- 3 - paraliza zadnjih ekstremiteta;
- 4 - smrt životinje.

Po potrebi su korišćeni i intermedijerni skorovi (Badovinac i sar., 1998). Skor 1,5 je korišćen kada je postojala potpuna paraliza repa, dok je skor 3,5 korišćen u slučajevima postojanja inkontinencije uz paralizu zadnjih ekstremiteta. Pored praćenja kliničkog toka bolesti, praćeni su i početak bolesti (dan pojave prvih znakova EAE), kumulativni EAE skor (suma svih dnevnih skorova) i maksimalni EAE skor (najveći klinički skor zapažen tokom bolesti).

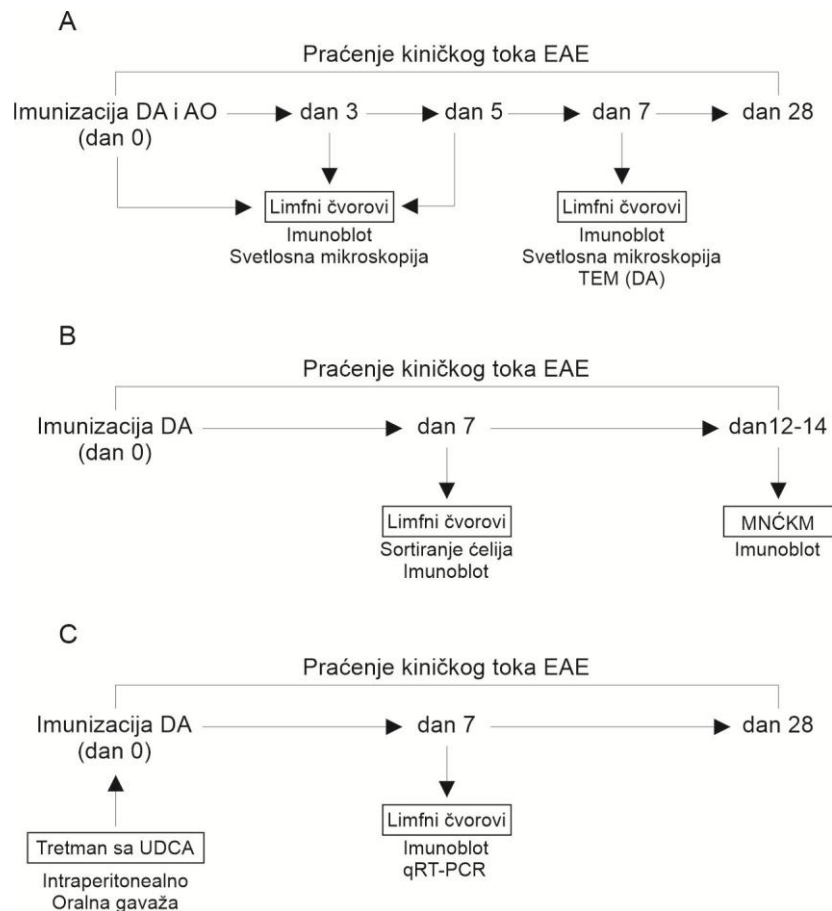
3.2.1 Eksperimentalni plan

Nakon imunizacije i odgovarajućeg tretmana životinje su žrtvovane cervikalnom dislokacijom u različitim vremenskim intervalima u zavisnosti od potreba eksperimenata. U daljem tekstu i na šemi 1 prikazan je detaljan eksperimentalni plan sa vremenskim intervalima imunizacije i žrtvovanja DA i AO pacova.

Nakon imunizacije, AO i DA pacovi su podeljeni u odgovarajuće grupe prema planu eksperimenta. U cilju potvrde sojnih razlika u podložnosti ka razvoju EAE, DA i AO pacovi su imunizovani i klinički tok bolesti je praćen tokom 28 dana. Druga grupa imunizovanih DA i AO pacova je odvojena u cilju praćenja sojnih razlika u aktivaciji ER stresa i odgovoru na njega. Ove životinje su žrtvovane 3, 5. i 7. dana posle imunizacije (dpi) zajedno sa kontrolnim, neimunizovanim životinjama ($n = 6$ po grupi), pri čemu su od svih životinja sakupljeni drenirajući limfni čvorovi (šema 1A).

Kako su DA pacovi podložni razvoju bolesti, a AO rezistentni, svi dalji eksperimenti su rađeni na DA pacovima. U cilju praćenja aktivacije ER stresa u ćelijama imunskog sistema, jedna grupa imunizovanih DA pacova ($n = 5$) je žrtvovana 7. dpi. Iz izolovanih drenirajućih limfnih čvorova ovih životinja izolovane su ćelije u cilju daljeg sortiranja $CD3^{+}$ i $CD3^{-}$ ćelija. Ovaj eksperiment je obuhvatio i kontrolne (neimunizovane) životinje ($n = 10$). Druga grupa imunizovanih DA pacova je žrtvovana u trenutku postizanja odgovarajućeg kliničkog skora bolesti (EAE klinički skor 1, 2 ili 3, 12-14 dpi). Nakon žrtvovanja, ovoj grupi životinja je izolovana kičmena moždina iz koje su dalje izolovane mononuklearne ćelije kičmene moždine (MNČKM) (šema 1B).

Uticaj modulacije ER stresa na ispoljavanje EAE je ispitan primenom inhibitora ER stresa, ursodeoksiholne kiseline (UDCA). Imunizovani DA pacovi su podeljeni u dve grupe. U jednoj grupi je praćen klinički tok EAE sa dva različita tretmana UDCA – intraperitonealna primena ili primena oralnom gavažom ($n = 6$ po grupi). Kontrolnim životinjama dat je PBS na isti način (intraperitonealno ili oralnom gavažom, $n = 6$ po grupi). Klinički tok EAE je praćen tokom 28 dana. U drugoj grupi imunizovanih DA pacova praćena je ekspresija gena za proinflamatorne i imunoregulatorne citokine, kao i ekspresija markera ER stresa. Ove životinje su žrtvovane 7. dpi ($n = 6$) zajedno sa neimunizovanim, kontrolnim životinjama ($n = 6$) i od svih životinja su sakupljeni drenirajući limfni čvorovi (šema 1C).



Šema 1: Eksperimentalni plan.

Praćenje razlika u kliničkom toku EAE i ekspresiji markera ER stresa kod pacova DA i AO soja (A). Praćenje ekspresije markera ER stresa u ćelijama imunskog sistema tokom patogeneze EAE kod pacova DA soja (B). Efekat primene inhibitora ER stresa, UDCA, na klinički tok EAE, ekspresiju gena za proinflamatorne i imunoregulatorne citokine i ekspresiju markera ER stresa (C).

3.3 Tretman ursodeoksiholnom kiselinom

Nakon imunizacije, DA životinje su tretirane UDCA (Dr. Falk Pharma GmbH, Freiburg, Germany) na dva načina, intraperitonealno ($n = 6$, 120 mg/kg) i oralnom gavažom ($n = 6$, 500 mg/kg). Ursodeoksiholna kiselina je rastvorena u 0,5% rastvoru karboksimetil celuloze (Merck KGaA) u PBS. Kontrolne životinje su na isti način tretirane 1 mL PBS koji je sadržao 0,5% karboksimetil celulozu ($n = 6$ po grupi). Tretman je trajao od dana imunizacije do 7. dpi ili do kraja eksperimenta (28. dpi). Životinje tretirane do 7. dpi su dobijale tretman intraperitonealno i 7. dpi su žrtvovane za potrebe izolacije drenirajućih limfnih čvorova. Kod životinja koje su tretirane UDCA do kraja eksperimenta praćen je klinički tok bolesti. Da bi se potvrdilo da UDCA ne ispoljava akutne toksične efekte, kao što su promene u ponašanju, anoreksija, slabost i otežano disanje, zdrave (neimunizovane) životinje su tretirane UDCA intraperitonealno i oralnom gavažom u dozama koje su bile 3 puta veće od doza korišćenih tokom eksperimenata u trajanju od 14 dana. Takođe je praćeno i da li kod životinja dolazi do motornih poremećaja sličnih poremećajima koji se javljaju u EAE – promena tonusa repa i zadnjih ekstremiteta.

3.4 Izolacija ćelija iz limfnih čvorova i sortiranje ćelija

U cilju izolacije ćelija limfnih čvorova, drenirajući limfni čvorovi zdravih, neimunizovanih DA pacova ($n = 10$) i imunizovanih DA pacova ($n = 5$) su prikupljeni sedam dana nakon imunizacije. Zbog malog broja ćelija u drenirajućim limfnim čvorovima zdravih, neimunizovanih DA pacova, limfni čvorovi od po 2 životinje su pulovani i korišćeni za dobijanje ćelijske suspenzije. Nakon izolacije, tkivo limfnog čvora je stavljeno u RPMI-1640 medijum (Merck KGaA) sa 2% seruma pacova (Merck KGaA). Medijum istog sastava je dalje korišćen i za rad sa izolovanim ćelijama. Tkivo limfnog čvora je protiskivano kroz sterilnu najlonsku mrežicu, kroz koju je potom protiskivana i dobijena ćelijska suspenzija. Izolovane ćelije su centrifugirane (5 min na 1500 g), nakon čega su resuspendovane u medijumu. Broj ćelija je određen supravitalnim bojenjem ćelija sa tripan plavim, koji boji mrtve ćelije sa oštećenom ćelijskom membranom, dok žive ćelije sa očuvanim integritetom membrane ostaju nebojene. Nakon bojenja, ćelije su brojane pod svetlosnim mikroskopom upotrebom komore po Burker Turku (Bürker-Türk).

Za potrebe sortiranja $CD3^+$ T ćelija, izolovane ćelije (4×10^7 /mL) su inkubirane (30 min na 4°C) sa $0,5 \mu\text{g/mL}$ monoklonskog anti- $CD3$ antitela obeleženog fluorescein izotiocijanatom (FITC, #561801; BD Biosciences) u 1 mL Henkovog slanog rastvora ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ *Hanks' Buffered Saline Solution*) sa 2% seruma pacova. Nakon isteka inkubacije, ćelije su oprane i resuspendovane u puferu za sortiranje (Henkov slani rastvor). Za sortiranje ćelija korišćen je protočni citofluorimetar FACS Aria III (BD Biosciences, San Jose, CA) i odgovarajući softverski program FACSDiva. Analiza FSC/SSC parametara je korišćena za eliminaciju ćelijskog debris, dok su dubleti eliminisani analizom FSC-A/FSC-W parametara. Različite populacije limfocita ($CD3^+$ i $CD3^-$) su razdvojene na osnovu ekspresije $CD3$ površinskog marker T ćelija. Sortirane ćelije su dalje analizirane imunoblot metodom (opisano u daljem tekstu).

3.5 Izolacija mononuklearnih ćelija kičmene moždine

Mononuklearne ćelije kičmene moždine (MNČKM) su izolovane iz kičmene moždine imunizovanih DA pacova u različitim fazama bolesti (EAE klinički skor 1-3, 12-14 dpi). Nakon žrtvovanja, životinje su prvo perfundovane fiziološkim rastvorom (0,9% NaCl), primenom peristaltičke pumpe, kako bi se uklonile krvne ćelije iz kičmene moždine. Nakon izolacije, perfundovana kičmena moždina je homogenizovana protiskivanjem tkiva kičmene moždine kroz sterilnu najlonsku mrežicu. Dobijene ćelije su kratko centrifugirane (2 min, 700 g) i resuspendovane u 40% Perkolu (*Percoll*, Merck KGaA) da bi potom ponovo bile centrifugirane na diskontinuiranom, izotoničnom gradijentu Perkola. Gradijent je formiran pomoću izotoničnog 70% i 40% Perkola. Izotoničan rastvor Perkola je dobijen mešanjem 9 mL Perkola sa 1 mL 10 puta koncentrovanog PBS. Ćelije resuspendovane u 3 mL 40% Perkola su nanete na 6 mL 70% Perkola. Nakon centrifugiranja (60 min, 800 g), na granici dva sloja Perkola uočen je beli prsten MNČKM. Prsten ćelija je pažljivo sakupljen i ćelije su dva puta oprane u RPMI-1640 medijumu sa 2% seruma pacova (centrifugirano 2 puta, 5 min, 900g). Analizom dobijenih ćelija na protočnom citofluorimetru je pokazano da 80% infiltrata kičmene moždine čine mononuklearne ćelije (MNČ). Za potrebe ove analize ćelije su obojene anti- CD -FITC antitelom (BD Biosciences). Ovi podaci nisu prikazani jer su služili za potvrdu fenotipa izolovanih ćelija. Izolovane MNČKM su korišćene za analizu imunoblot metodom. S obzirom na mali broj izolovanih MNČKM po uzorku, nakon pripreme uzoraka za imunoblot analizu, jednake količine proteina iz 2-3 uzorka životinja sa istim kliničkim skorom su pulovane i dalje korišćene za imunoblot analizu.

3.6 Tehnika imunoblota

Imunoblot tehnika (*Western blot*) je metoda koja služi za detekciju proteina u uzorku, a zasniva se na reakciji antigen-antitelo. Upotrebom odgovarajućih denzitometrijskih tehnika imunoblot se može koristiti i za kvantifikaciju proteina u uzorku.

Za potrebe izolacije proteina iz tkiva drenirajućih limfnih čvorova korišćen je Ripa pufer za liziranje tkiva (50 mmol Tris-HCL pH 7,4, 150 mmol NaCl, 1% NP40, 0,25% Na-deoksiholat), dok je za izolaciju proteina iz ćelija izolovanih iz limfnih čvorova i MNČKM korišćen pufer za liziranje ćelija (30 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl, 1% NP-40). U oba pufera dodati su 1 mmol PMSF (fenilmetilsulfonil fluorid), 1 mmol Na-vanadate, 10 mmol NaF i koktel inhibitora proteaza/fosfataza (20 µl/mL) (Merck KGaA). Tkivo i ćelije su tokom 30 minuta inkubirani na ledu u odgovarajućem puferu, a potom centrifugirani (4°C, 15 min, 14000g), nakon čega je sakupljen supernatant. U svakom uzorku je određena koncentracija proteina metodom po Bradfordu (Bradford, 1976). Ukratko, *Coomassie Brilliant Blue G-250* boja u kiseloj sredini (u prisustvu proteina) menja boju iz crvene u plavu, pri čemu je intenzitet razvijene plave boje direktno proporcionalan koncentraciji proteina u uzorku. Razblaženje uzoraka u rastvoru boje je iznosilo 1:1000. Koncentracija proteina u uzorcima je određena na osnovu standardne krive koja je konstruisana korišćenjem standardnog rastvora za proteine - BSA (*bovine serum albumin*) u koncentracijama od 5-25 µg/mL. Apsorbance standardnih rastvora BSA određenih koncentracija, kao i uzoraka koji sadrže nepoznatu koncentraciju proteina, merene su na čitaču za mikrotitarske ploče na talasnoj dužini od 570 nm. Nakon određivanja koncentracije proteina, uzorci su pripremljeni za imunoblot analizu kuvanjem (5 min, 100°C) sa redukujućim puferom za pripremu uzoraka (2 % SDS - *sodium dodecyl sulfate*, 10% glicerol, 2 mmol 2-merkaptoetanol, 0,002% bromfenol plavo, 62,5 mmol Tris-HCl, pH 6,8). Tokom kuvanja dolazi do denaturacije proteina koje oblaže negativno naelektrisani SDS, dok 2-merkaptoetanol sprečava formiranje disulfidnih mostova u denaturisanom proteinu. Jednake koncentracije denaturisanih proteina su potom razdvojene elektroforezom na osnovu molekulske mase. Elektroforeza proteina je vršena na 10% ili 12% poliakrilamidnom gelu (SDS-PAGE). Poliakrilamidni gel se sastoji iz gela za sabijanje proteina (4% akrilamid/0,14% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,125 mol Tris HCl, pH 6,8) i gela za razdvajanje proteina (10% akrilamid/0,34% bisakrilamid ili 12% akrilamid/0,41% bisakrilamid, 0,1% SDS, 0,375 mol Tris HCl, pH 8,8). Tokom elektroforeze je korišćen pufer za elektroforezu (192 mmol glicina, 0,1% SDS i 25 mmol Tris HCl, pH 8,3) i elektroforeza je vršena pri konstantnom naponu (100 V tokom prolaska proteina kroz gel za sabijanje i 180V nakon ulazaka uzoraka u gel za razdvajanje). Pored uzoraka, na svaki gel je nanet marker referentnih proteina poznatih molekulskih masa u rasponu 10-250 kD (Precision Plus Protein™ Dual Color Standards, Bio-Rad, Hercules, CA). Razdvojeni proteini su nakon završene elektroforeze preneti polusuvim transferom na nitrocelulozne membrane (Bio-Rad). Za transfer proteina korišćeni su: aparatura za polusuvi transfer - TE 70 Semi-dry transfer unit (Life Sciences), visokoapsorbujući filter papir i pufer za transfer (92 mmol glicin, 20% metanol i 25 mmol Tris HCl, pH 8,3). Tokom transfera membrana je bila okrenuta ka pozitivnoj, a gel ka negativnoj elektrodi, pri čemu su se proteini kretali sa gela na membranu. Za potrebe transfera, struja je bila konstantne jačine, 0,45 mA po membrani. Membrane su nakon transfera, koji je trajao 90 minuta, blokirane u 5% rastvoru odmašćenog mleka u TBS puferu (20 mmol Tris, 137 mmol NaCl, pH 7,6) sa 0,05 % Tween 20 deterdženta (TBS-T). Blokiranje ima za cilj da spreči nespecifično vezivanje antitela za membranu. Posle blokiranja, membrane su tokom noći (+4 °C) inkubirane sa odgovarajućim primarnim zečjim antitelima za sledeće antigene pacova: GRP78 (1:500), CHOP (1:500), XBP1 (1:750), fosfo-eIF2α (1:750), fosfo-p38 (1:750), fosfo-ERK (1:750), PARP (1:750) i β aktin (1:1000). Spisak antitela sa kataloškim brojevima se nalazi u tabeli 1. Antitela su rastvarana u 5% rastvoru odmašćenog mleka ili 5% rastvoru BSA (5% u rastvoru TBS-T). Nakon ispiranja primarnog antitela (3 puta 5 min u TBS-T), membrane su inkubirane u rastvoru sekundarnog antitela protiv zečjeg IgG (1:2000) konjugovanog sa peroksidazom poreklom iz rena (*Horse radish peroxidase*, HRP). Inkubacija sa

sekundarnim antitelom je trajala 90 minuta na sobnoj temperaturi. Nakon inkubacije sa sekundarnim antitelom, membrana je ponovo ispirana 3 puta po 10 min u TBS-T. U cilju vizuelizacije proteina od interesa, membrane su prelivane radnim rastvorom luminola koji je aktiviran 30% vodonik peroksidom. U reakciji koju katališe HRP, vodonik peroksid se razlaže do kiseonika i vode, nakon čega oslobođeni kiseonik reaguje sa luminolom, pri čemu nastaje 3-aminoftalat koji emituje svetlost. Za očitavanje intenziteta fluorescence korišćen je *ChemiDoc imaging* sistem (Bio-Rad), dok je kvantifikacija rezultata izvršena pomoću *ImageLab* programa. Koncentracija proteina je izražena u odnosu na signal β aktina, a dobijeni rezultati su predstavljeni u odnosu na netretiranu kontrolu, kojoj je arbitrarno dodeljena vrednost 1.

Tabela 1: Spisak korišćenih antitela za imunoblot analizu i njihovi kataloški brojevi

Antitelo	Kataloški broj	Proizvođač
GRP78	sc-13968	Santa Cruz Biotechnology
CHOP	sc-793	Santa Cruz Biotechnology
XBP1	#82914	Cell Signaling Technology
p-eIF2 α	#3398	Cell Signaling Technology
p-p38	#9211	Cell Signaling Technology
p-ERK	#9101	Cell Signaling Technology
PARP	#9542	Cell Signaling Technology
β aktin	#4976	Cell Signaling Technology
Sekundarno At	#7074	Cell Signaling Technology

3.7 Izolacija RNK molekula i reverzna transkripcija

Za potrebe analize ekspresije gena od interesa, RNK je izolovana iz drenirajućih limfnih čvorova netretiranih imunizovanih DA pacova i imunizovanih DA pacova koji su tretirani UDCA (i.p.) tokom 7 dana. RNK molekul je izolovan upotrebom reagensa za izolaciju ukupne RNK – TRIZOL (*Total RNA Isolation Kit*) (Thermo Fisher Scientific). Tkivo limfnog čvora (50 mg) je homogenizovano u 500 μ L trizola. Nakon homogenizacije u svaki uzorak je dodato po 100 μ L hloroforma i uzorci su inkubirani 10 min na +4°C. Po završetku centrifugiranja (12000 g, 15 minuta, +4°C) došlo je do izdvajanja vodene faze u kojoj se nalazi RNK. Po odvajanju vodene faze od ostatka sadržaja, u izolovanu vodenu fazu je u istoj zapremini dodat izopropanol, koji taloži RNK. Uzorci su inkubirani sa izopropanolom 30 min na sobnoj temperaturi, nakon čega su centrifugirani (12000 g, 15 minuta, +4°C) i RNK je isprana sa 75% etanolom (1 mL). Nakon ispiranja RNK uzorci su ponovo centrifugirani (7500 g, 5 minuta, +4°C), čime je RNK istaložena. Talog RNK je osušen, a potom resuspendovan u 10 μ L demineralizovane vode. Koncentracija RNK je određena spektrofotometrijom (GeneQuant Pro, Amersham). Pored određivanja koncentracije RNK merena je i njena čistoća. Koncentracija je merena na 260 nm, dok je čistoća određivana na 280 nm. Odnos apsorbanci 260/280 između 1,7 i 2 ukazuje na visok stepen čistoće RNK molekula u

uzorku, tako da su za potrebe reverzne transkripcije dalje korišćeni samo uzorci u navedenom rasponu čistoće.

Nakon izolacije, RNK je reverznom transkripcijom prevedena u komplementarnu DNK (cDNK). Za potrebe reverzne transkripcije 1 µg rastvorene RNK je dopunjen demineralizovanom vodom do zapremine od 13 µL, nakon čega je u svaki uzorak dodat 1,5 µL master miksa. Master miks je po uzorku sadržao 1 µL heksamerskih prajmera nasumičnih sekvenci i 0,5 µL 100 mmol smeše dezoksiribonukleotid-trifostata (dNTP). Pripremljeni uzorci su stavljeni u *Mastercycler Gradient* aparat (Eppendorf) koji je prethodno bio zagrejan na temperaturu od 70°C. Po isteku 10 minuta uzorci su izvađeni iz aparata, ohlađeni i u svaki uzorak je dodat novi master miks (po 4,5 µL) koji je po uzorku sadržao 0,5 µL inhibitora RNAze (40 U/µL) i 4 µL koncentrovanog (5 x) pufera za reverznu transkripciju. Nakon dodavanja 1 µL (200 U/µL) reverzne transkriptaze Moloni virusa mišije leukemije (RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase), uzorci su vraćeni u ohlađeni termalni blok *Mastercycler Gradient* aparata. Svi reagensi korišćeni za pripremu master miksova, kao i reverzna transkriptaza nabavljeni su od Thermo Fisher Scientific. Tokom procesa reverzne transkripcije menjivali su se sledeći ciklusi temperature:

1. 25°C 15 minuta
2. 42°C 60 minuta
3. 70°C 10 minuta
4. 95°C 3 minuta

nakon čega je blok ohlađen na temperaturu od 4°C kako bi se sprečila razgradnja nastalog cDNK molekula. Svaki uzorak je imao svoju negativnu kontrolu koja je sadržala sve reagense osim RNK, čime je proveravana potencijalna kontaminacija uzoraka. Uzorci cDNK su dalje korišćeni za kvantitativnu PCR analizu (qRT-PCR).

3.8 Kvantitativna PCR analiza – qRT-PCR

Kvantitativna reakcija lančanog umnožavanja posle reverzne transkripcije (*quantitative Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, qRT-PCR) je metoda koja se koristi za praćenje genske ekspresije, pri čemu se kao matrica za PCR koristi cDNK dobijena reverznom transkripcijom prethodno izolovane RNK. Pre započinjanja PCR reakcije, cDNK je razblažena 10 puta (20 µL cDNK uzorka dobijenog u reverznoj transkripciji u 180 µl demineralizovane vode). Za PCR reakciju korišćeni su 10 puta razblaženi cDNK molekul (4 µL razblaženog uzorka), koncentrovani komercijalni master miks (5 µL 2x TaqMan Gene Expression Master Mix) i odgovarajući fluorescentno obeleženi prajmeri. Svi reagensi neophodni za PCR reakciju su nabavljeni od Thermo Fisher Scientific. Uzorci, master miks i odgovarajuće probe nalivani su u ploče za kvantitativni PCR *MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate* (Life Technologies), koje su zatim prelepljene adhezivnim filmom (*MicroAmp Optical Adhesive Film*) kako bi se sprečilo uparavanje uzoraka (Life Technologies). Svaki uzorak je analiziran u duplikatu u *Realplex2 Mastercycler* aparatu (Eppendorf) smenjivanjem sledećih ciklusa:

- 1 ciklus na temperaturi od 50°C, 2 minuta
- 1 ciklus na temperaturi od 95°C, 10 minuta
- 40 ciklusa sa smenom temperature: 95°C 15 sekundi, 60 °C 1 minut.

Primenom qRT-PCR metode je praćena ekspresija gena za proinflamatorne citokine IFN γ , IL-17A, TNF, IL-1 β , IL-12, IL-23, TGF- β 1 i transkripcione faktore Th1 ćelija (T-bet) i Treg ćelija (Foxp3). Kao kontrolni (*housekeeping*) gen korišćen je 18S RNK. Komercijalni esaji za svaki pojedinačni gen sadržali su specifične prajmere i TaqMan probe (Thermo Fisher Scientific), čiji su kataloški brojevi prikazani u tabeli 2. Kako bi rezultati PCR analize bili kvantifikovani, srednja vrednost Ct (*threshold cycle*) kontrolnog gena (18S RNK), oduzeta je od srednje vrednosti gena od

interesa i dobijena je promena srednje vrednosti, (ΔC_t). Relativna ekspresija gena je potom određena kao vrednost $2^{-\Delta C_t}$. Rezultati su predstavljeni u odnosu na vrednosti koje su dobijene u kontrolnoj netretiranoj grupi, kojima je arbitrarno dodeljena vrednost 1.

Tabela 2: Spisak korišćenih TaqMan proba i prajmera i njihovi kataloški brojevi

Gen	Kataloški broj	Gen	Kataloški broj
IFN γ	Rn00594078_m1	IL-23	Rn00590334_g1
IL-17A	Rn01757168_m1	TGF- β 1	Rn00572010_m1
TNF	Rn999990 17_m1	T-bet	Rn01461633_m1
IL-1 β	Rn00580432_m1	Foxp3	Rn01525092_m1
IL-12	Rn00584538_m1	18S rRNA	Hs99999901_s1

3.9 Priprema uzoraka za svetlosnu mikroskopiju

Izolovani drenirajući limfni čvorovi DA i AO pacova koji su korišćeni za histohemijske i imunohistohemijske analize fiksirani su u 4% puferisanom paraformaldehidu u trajanju od 24 h. Nakon fiksacije uzorci su kalupljeni u parafinu. Kalupljenje je podrazumevalo sledeće korake: dehidrataciju u rastućim koncentracijama alkohola (etanol, 70%, 96%, 100%, Zorka Pharma-Hemija), prosvetljavanje u ksilolu (Zorka Pharma-Hemija) i kalupljenje u parafinu (Histowax, Histolab Products AB). Uzorci su potom isečeni na mikrotomu (Leica SM2000R Sliding Microtome, Leica Microsystems), a debljina dobijenih isečaka iznosila je 5 μ m. Dobijeni isecci su deparafinisani u ksilolu i rehidrirani opadajućim koncentracijama alkoholnog rastvora (etanol, 100%, 96%, 70%), posle čega su bojeni hematoksilin-eozinom (HE bojenje) ili imunohistohemijski.

Prilikom HE bojenja isecci su prvo obojeni rastvorom hematoksilina, a zatim su isprani tekućom vodom i obojeni rastvorom eozina. Obojeni uzorci su ponovo dehidrirani u rastućim koncentracijama etanola (96%, 100%), prosvetljeni u ksilolu i pokriveni DPX medijumom. Za pravljenje digitalnih snimaka preseka tkiva korišćen je Leica DM40000B LED (Leica Microsystems) fotomikroskop sa digitalnom kamerom (Leica DFC295) i LAS 4.4softverom.

Imunohistohemijsko bojenje uzoraka je vršeno pomoću *Leica BOND MAX immune stainer* aparata korišćenjem kitova *Leica BOND MAX Refine Kit* i *Leica Bond Polymer Refine Detection Kit (DS9800)*. Za detekciju plazmocita korišćeno je mišije monoklonsko anti-CD138 At u razblaženju 1:100 (M7228, DAKO, clone MI15). Klonalna ekspresija lanaca imunoglobulina detektovana je pomoću mišijeg monoklonskog antitela za lambda lake lance imunoglobulina (1:800; MS-180-P1, Thermo Scientific, clone HP6054) i mišijeg monoklonskog antitela za kapa lake lance imunoglobulina (1:2000; NCL-KAP, Leica/Novocastra, clone KP-53).

3.9.1 Morfometrijska analiza

Veličina izvađenih drenirajućih limfnih čvorova eksperimentalnih životinja određivana je na stereomikroskopu (OZL445, Kern Optics) sa mikrometarskim lenjirom. Za izračunavanje procenta površine limfnih čvorova pozitivne na anti-CD138 antitelo korišćene su fotomikrografije malog uveličanja (50x) preseka drenirajućih limfnih čvorova obojenih sa anti-CD138 antitelom. U programu ImageJ 1.49 (National Institutes of Health, Bethesda, USA) pozitivno obojena površina isečka obeležena je kao region od interesa primenom alata za poligonalnu selekciju. Površina pozitivnog obojenog isečka je izračunata kao procenat pozitivno obojene površine u poređenju sa ukupnom površinom preseka drenirajućih limfnih čvorova korišćenjem merenja dobijenih pomoću ImageJ programa. Procenat kapa- i lambda-pozitivnih Mot ćelija je određivan na 10 slika velikog uveličanja (400x) kapa ili lambda obojenih preseka limfnih čvorova i izražen je kao procenat od ukupnog broja svih uočenih Mot ćelija. Mot ćelije su uočene kao velike ćelije sa ekscentrično postavljenim jedrom i brojnim sferičnim inkluzijama različite veličine.

3.10 Transmisiona elektronska mikroskopija

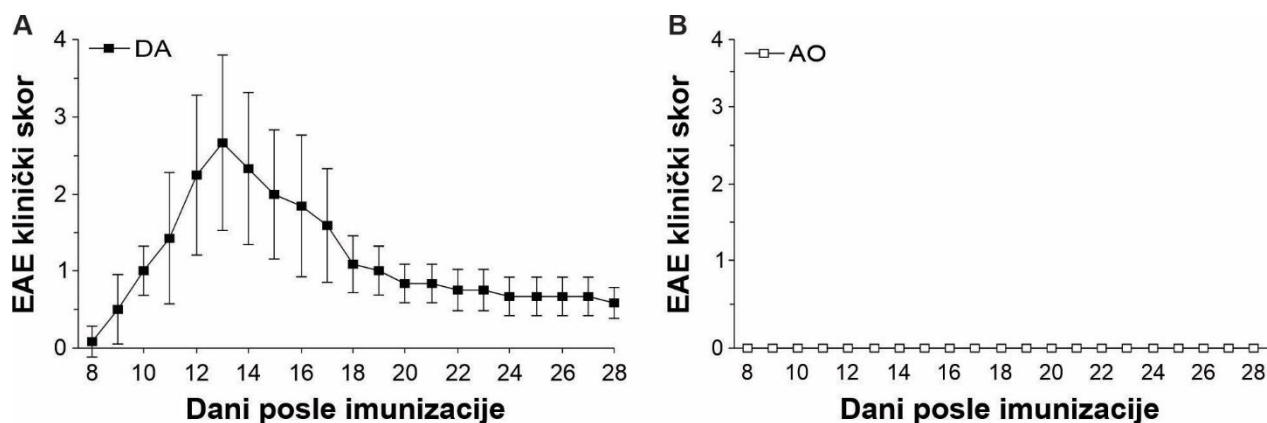
Za potrebe elektronske mikroskopije tkivo limfnog čvora DA pacova je fiksirano u 2,5% glutaraldehidu na temperaturi od +4°C. Nakon fiksacije uzorci su kalupljeni u epoksidnim smolama. Prvog dana kalupljenja uzorci su tri puta isprani kakodilatnim puferom (pH 7,3) nakon čega su dodatno fiksirani u 1% rastvoru osmijum-tetroksida u kakodilatnom puferu tokom 60 min na temperaturi +4°C i ponovo 3 puta isprani u kakodilatnom puferu (pH 7,3). Nakon ispiranja preko uzoraka je sipan prezasićen rastvor uranil-acetata u destilovanoj vodi. Uzorci su ostavljeni tokom noći na +4°C. Drugog dana je usledilo ispiranje uzoraka destilovanom vodom i dehidratacija rastućim koncentracijama etanola od 50%, 70%, 96% i 100%. Po završenoj dehidrataciji, limfni čvorovi su isprani u propilen-oksidu dva puta, a na kraju je preko uzoraka sipana mešavina propilen-oksida i epoksidnih smola (Epoxy Embedding Medium kit, 45345, Sigma-Aldrich) u odnosu 3:1. Uzorci su ostavljeni preko noći na sobnoj temperaturi, a trećeg dana je iz uzoraka uklonjena prethodno sipana mešavina smola i nalivena je nova mešavina dobijena mešanjem istih zapremina smola i propilen oksida. Posle tročasovne inkubacije ova mešavina je uklonjena, a uzorci su prebačeni u modle za kalupljenje. U modlu za kalupljenje je preko uzoraka nalivena kombinacija čistih epoksidnih smola koja je ostavljena da stoji 48 h na temperaturi od 60°C. Nakon završenog kalupljenja uzorci su isečeni na ultramikrotomu (Leica UltraCut UCT, Leica Microsystems) staklenim nožem, kako bi se dobili polutanki isečci (debljine oko 500 nm) koji su potom bojani rastvorom toluidin plavog. Isečci obojeni toluidin plavim su posmatrani pod svetlosnim mikroskopom da bi se izabrao deo uzorka za dalje sečenje. Odabrani deo uzorka je potom sečen dijamantskim nožem (16DIA.DU4530, DiATOME) da bi se dobili isečci debljine oko 70 nm. Ultratanki isečci su montirani na bakarne mrežice (G4901, SigmaAldrich) koje su nakon sušenja kontrastirane 4% rastvorom uranil-acetata u metanolu i rastvorom olovo-citrata. Nakon završene pripreme, uzorci su posmatrani na transmisionom elektronskom mikroskopu (Morgagni 268D, FEI).

3.11 Statistička analiza

Statistička obrada rezultata je urađena primenom *GraphPad Prism* ili *SPSS* programa. Svi rezultati su predstavljeni kao srednja vrednost (SV) $\pm$ standardna devijacija (SD). Značajnost razlike između dva ili više nezavisnih uzoraka je određivana Studentovim t testom i jednosmernom analizom varijanse (ANOVA), koja je bila praćena *Tukey*-jevim testom za višestruko poređenje. Vrednost $p < 0,05$ je smatrana statistički značajnom.

4.1 DA pacovi su životinje podložne razvoju EAE, dok su AO pacovi rezistentni na pojavu bolesti

Kao što je već pomenuto, poznato je da DA pacovi predstavljaju soj životinja podložan razvoju EAE, dok su AO pacovi rezistentni i kod njih ne dolazi do razvoja kliničkih znakova bolesti (Vukmanović i sar., 1989). Da bismo ovo potvrdili, DA i AO pacovi su imunizovani prema prethodno opisanom protokolu i, u skladu sa očekivanjima, kod DA pacova je došlo do progresivne neurološke disfunkcije (slika 7A), dok kod AO pacova nije došlo do pojave kliničkih znakova EAE (slika 7B). Bolest je kod DA pacova svoj maksimum dostigla 13. dpi, posle čega je usledio spontani oporavak životinja (slika 7A).

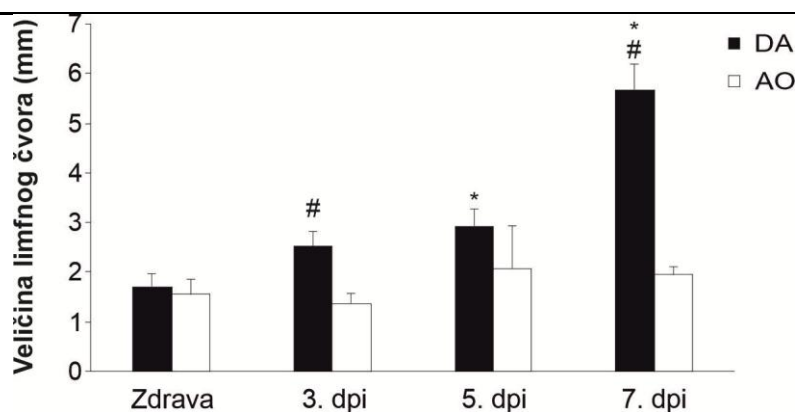


Slika 7: Kliničko ispoljavanje EAE kod različitih sojeva pacova.

DA (A) i AO (B) pacovi su imunizovani singenim HKM sa CFA. Klinički skor EAE (n = 6 po soju pacova) je praćen svakog dana od dana imunizacije do 28. dpi (A,B).

4.2 Veličina i aktivacija drenirajućih limfnih čvorova koreliraju sa osetljivošću na indukciju EAE

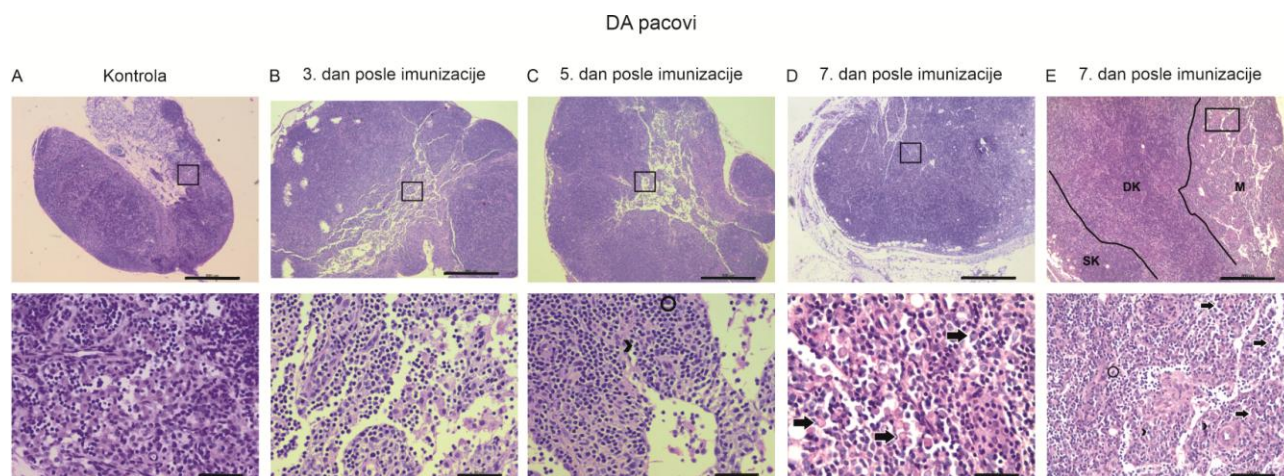
Drenirajući limfni čvorovi prikupljeni iz zdravih, neimunizovanih DA pacova ($1,71 \pm 0,27$ mm) su bili manji od drenirajućih limfnih čvorova prikupljenih od imunizovanih DA pacova čija je veličina iznosila $2,52 \pm 0,29$ mm (3. dpi), $2,92 \pm 0,34$ mm (5. dpi) i $5,68 \pm 0,53$ mm (7. dpi). Pri tome su drenirajući limfni čvorovi prikupljeni od imunizovanih DA pacova 5. i 7. dpi bili statistički značajno veći od drenirajućih limfnih čvorova prikupljenih od neimunizovanih DA životinja ($p < 0,05$). Razlika u veličini drenirajućih limfnih čvorova prikupljenih od imunizovanih DA pacova 3. dpi i drenirajućih limfnih čvorova zdravih pacova nije bila statistički značajna. Kod AO pacova nije uočena statistička značajnost u veličini drenirajućih limfnih čvorova prikupljenih od kontrolnih, neimunizovanih životinja ($1,55 \pm 0,3$ mm) i drenirajućih limfnih čvorova prikupljenih od imunizovanih pacova čija je veličina iznosila $1,37 \pm 0,19$ mm (3. dpi), $2,07 \pm 0,85$ mm (5. dpi) i $1,95 \pm 0,16$ mm (7. dpi). Upoređivanjem veličine drenirajućih limfnih čvorova izolovanih od imunizovanih DA i imunizovanih AO pacova po danima posle imunizacije, uočava se da je veličina limfnih čvorova imunizovanih DA značajno veća 3. dpi i 7. dpi. u odnosu na imunizovane AO pacove ($p < 0,05$) (slika 8).



Slika 8: Veličina limfnih čvorova zdravih i imunizovanih DA i AO pacova.

Veličina drenirajućih limfnih čvorova zdravih i imunizovanih DA i AO pacova je praćena 3, 5. i 7. dpi. Statistička značajnost razlike unutar istog soja pacova je označena sa * (* $p < 0,05$), a između različitih sojeva (AO/DA) sa # (# $p < 0,05$).

Hematoksilin-eozin (HE) bojenjem preseka drenirajućih limfnih čvorova zdravih DA pacova pokazana je očuvana arhitektura limfnog čvora (slika 9A), dok je HE bojenjem preseka drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova pokazano postojanje znakova aktivacije limfnog čvora. Trećeg dana nakon imunizacije uočena je aktivacija limfnog čvora u vidu aktivacije parakorteksa, dok se 5. dpi uočavaju brojni imunoblasti i blaga medularna plazmocitoza (slika 9B-C). Sedmog dana posle imunizacije limfni čvorovi imunizovanih DA pacova su bili ispunjeni mononuklearnim ćelijama koje su obliterisale medularne sinuse, površinski korteks je pokazivao znake atrofije sa oskudnim limfnim folikulima, dok je parakorteks bio hipertrofičan i ispunjen brojnim plazmocitima. Medularne trake i subkapsularni sinusi su takođe bili ispunjeni plazmocitima, a bila je prisutna i histiocitoza medule (slika 9D-E). U meduli je 7. dpi uočeno i prisustvo velikih, vakuolizovanih ćelija koje po morfološkim karakteristikama odgovaraju Mot ćelijama (slika 9D-E). Mot ćelije predstavljaju velike plazmocyte sa ekscentrično postavljenim jedrom usled prisustva velikih, sferičnih intracitoplazmatskih inkluzija različite veličine koje po morfološkim karakteristikama odgovaraju Raselovim telima. Prisustvo vakuolizovanih Mot ćelija nije uočeno kod zdravih DA pacova, kao ni kod imunizovanih DA pacova 3. i 5. dpi (slika 9A-C).

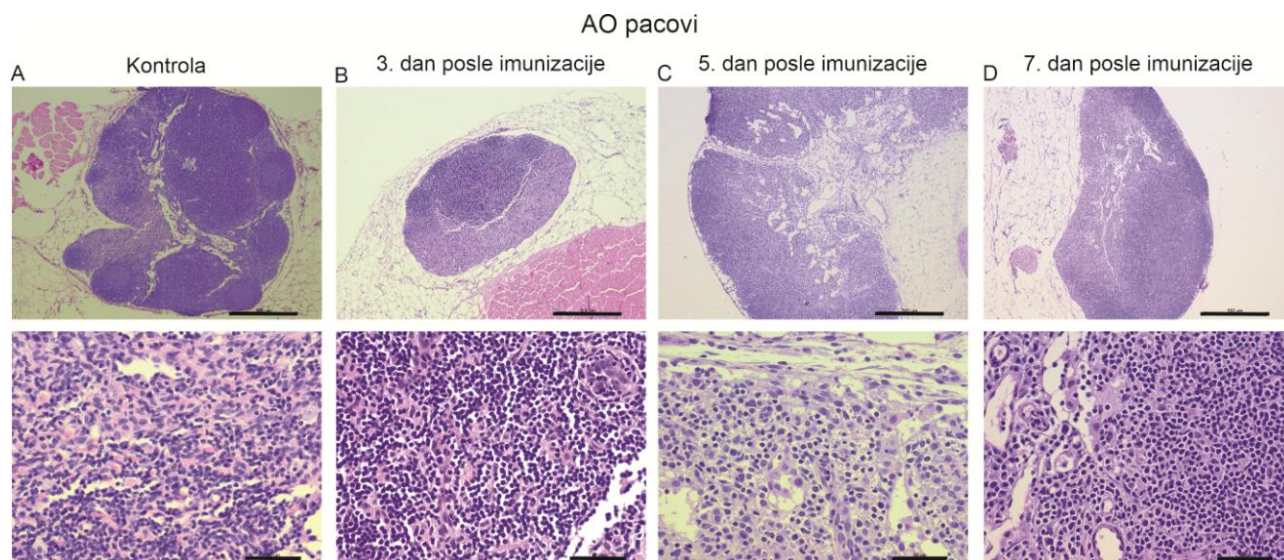


Slika 9: HE bojenje preseka drenirajućih limfnih čvorova DA pacova.

Preseci limfnih čvorova zdravih i imunizovanih DA (A-E) pacova 3, 5. i 7 dpi, veličina 500 μm (gornji red) i 50 μm (donji red, uvećana medula). Kod DA pacova se uočavaju znaci aktivacije limfnog čvora u svim vremenskim intervalima, pri čemu se 5. dpi uočavaju plazmociti (vrh strelice)

i imunoblasti (krug), dok se 7. dpi uočava i prisustvo Mot ćelija (strelice). Na slici E, su na manjem uveličanju (gore) obeležene zone limfnog čvora: površinski korteks (superficial cortex – SK), parakorteks (deep cortex - DK) i medula (M), dok su na većem uveličanju (dole, 100 μ m) Mot ćelije sa Raselovim telima obeležene strelicama, medularni sinusi ispunjeni plazmocitima vrhovima strelice, a imunoblasti krugom.

U limfnim čvorovima izolovanim od zdravih AO pacova nema znakova narušene arhitekture limfnog čvora (slika 10A). Trećeg i petog dana posle imunizacije kod AO pacova nisu uočeni znaci aktivacije limfnog čvora (slika 10B, C), dok je 7. dpi uočena aktivacija parakorteksa limfnog čvora sa pojavom plazmocita u meduli, a medularni sinusi su bili prazni. Mot ćelije i Raselova tela nisu uočeni (slika 10D).

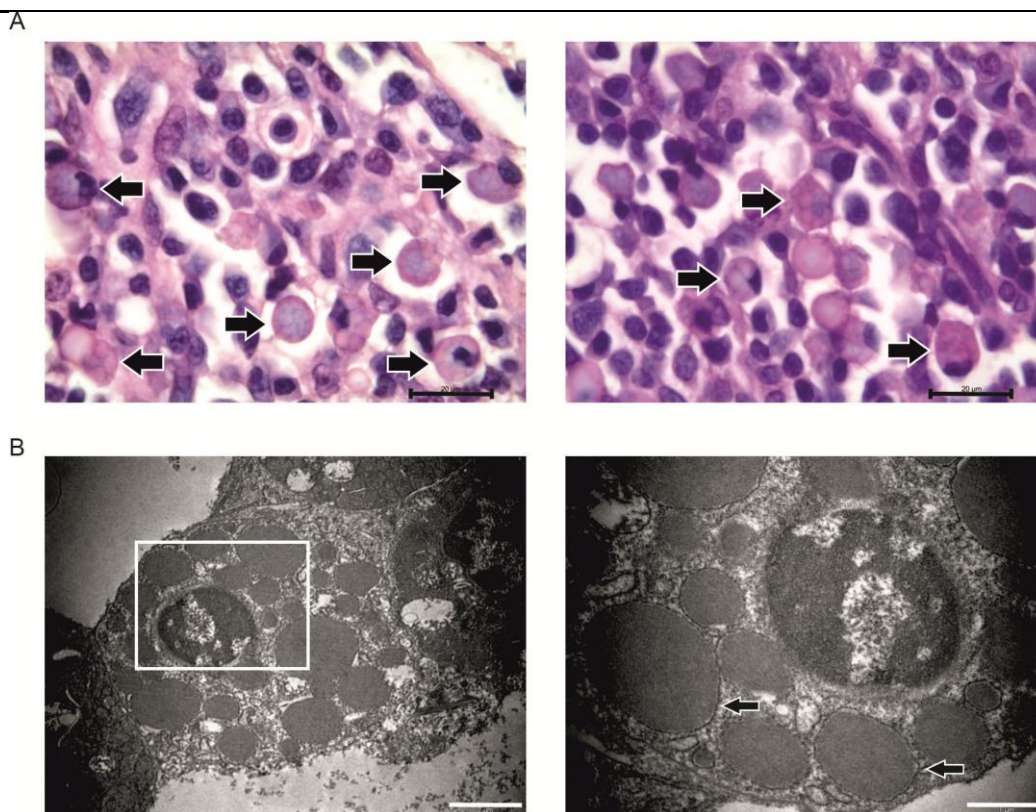


Slika 10: HE bojenje preseka drenirajućih limfnih čvorova AO pacova

Preseci limfnih čvorova zdravih i imunizovanih AO (A-D) pacova 3, 5. i 7 dpi, veličina 500 μ m (gornji red) i 50 μ m (donji red, uvećana medula). Kod AO pacova se znakovi aktivacije limfnog čvora uočavaju 7. dpi, a prisustvo Mot ćelija nije detektovano.

4.3 Prisustvo Mot ćelija sa Raselovim telima u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova

Analizom HE obojenih preseka drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova 7. dpi, na velikom uveličanju (100x), potvrđeno je prisustvo Mot ćelija koje karakteriše ekscentrično postavljeno jedro i veliki broj sferičnih citoplazmatskih inkluzija različite veličine koje morfološki odgovaraju Raselovim telima (slika 11A). Kako bismo detaljnije ispitali morfologiju Mot ćelije, ultra tanki preseci limfnih čvorova imunizovanih DA pacova (7. dpi) analizirani su na elektronskom mikroskopu. Između malih limfocita je uočena Mot ćelija sa voluminoznom citoplazmom u kojoj su bile prisutne velike, osmofilne, globularne, elektronski guste citoplazmatske inkluzije sferičnog oblika. Ovakve promene predstavljaju Raselova tela. Raselova tela se u citoplazmi nalaze u cisternama granulisiranog endoplazmatskog retikuluma sa jasno uočljivim prostorom između tela inkluzije i zida cisterne i okružena su perinuklearnim ili drugim cisternama (slika 11B).

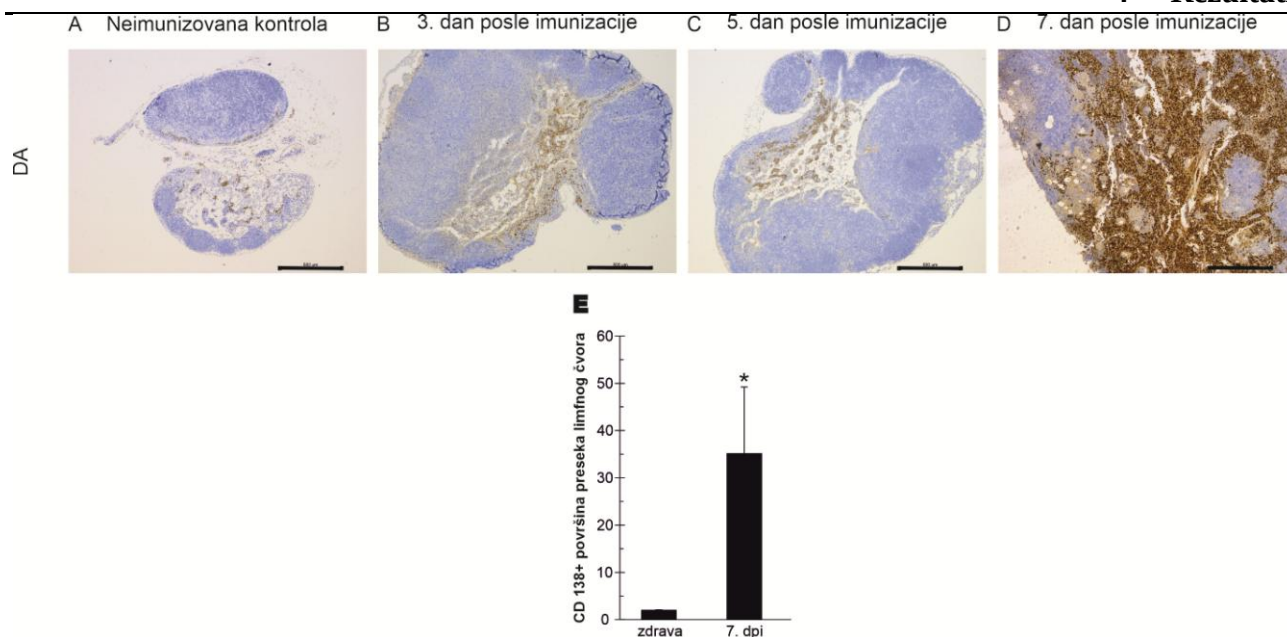


Slika 11: Prisustvo Mot ćelija u limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova.

(A) HE bojenje preseka limfnih čvorova imunizovanih DA pacova 7. dpi (20 μm). Strelice pokazuju Mot ćelije sa Raselovim telima u meduli limfnog čvora. (B) TEM fotomikrografije medule limfnih čvorova izolovanih iz DA pacova 7. dpi (2 μm , levo i 1 μm , desno). Uočena je Mot ćelija sa voluminoznom citoplazmom koja sadrži elektronski guste globularne nakupine proteina koje predstavljaju Raselova tela. Na većem uveličanju se uočava da su Raselova tela okružena membranom ER ili perinuklearnih cisterni sa jasnim prostorom između inkluzije i zida cisterne (strelice).

4.4 Prisustvo Mot ćelija u poliklonski aktiviranim plazmocitima u limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova

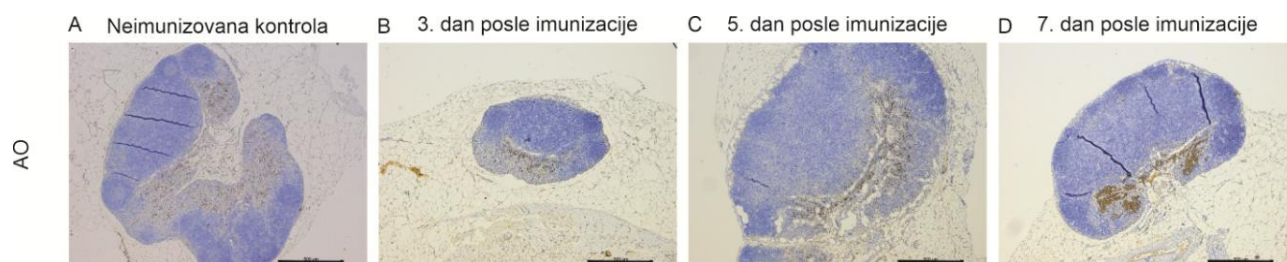
Detekcija i distribucija plazmocita u drenirajućim limfnim čvorovima svih grupa životinja je analizirana primenom monoklonskog mišijeg anti-CD138 antitela. Trećeg i petog dpi CD138⁺ plazmociti su uočeni u meduli drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova sa pojedinačnim plazmocitima u subkapsularnom regionu (slika 12B, C), dok se 7. dpi plazmociti, pored medule, uočavaju i u parakorteksu koji je hipertrofičan i ispunjen CD138⁺ ćelijama (slika 12D). U limfnim čvorovima neimunizovanih DA pacova uočen je umeren broj CD138⁺ plazma ćelija u meduli i manji broj u subkapsularnom regionu (slika 12A). Procenat CD138⁺ površine preseka drenirajućeg limfnog čvora imunizovanih DA pacova 7. dpi određen je u odnosu na ukupnu pozitivnu površinu preseka limfnog čvora neimunizovanih DA pacova. Kod imunizovanih DA životinja procenat CD138⁺ površine ($35,08 \pm 14,15\%$) je statistički značajno veći u odnosu na neimunizovane životinje ($1,96 \pm 0,14\%$, $p < 0,01$) (slika 12E). Na većem uveličanju (40x) se kod imunizovanih DA pacova (7. dpi) u plazmocitima uočava i prisustvo Mot ćelija (slika 14).



Slika 12: CD138 bojenje limfnih čvorova zdravih i imunizovanih DA pacova

Na presecima drenirajućih limfnih čvorova (500 μm) zdravih DA pacova (A) uočava se mali broj CD138⁺ ćelija u meduli i subkapsularnim sinusima što odgovara normalnom nalazu, dok su na presecima limfnih čvorova imunizovanih DA pacova 3. i 5. dpi CD138⁺ plazmociti prisutni u meduli limfnih čvorova (B, C). Sedmog dana se CD138⁺ ćelije, pored medule, nalaze i u parakorteksu (D). Procenat CD138 pozitivne površine imunizovanih DA pacova 7. dpi je statistički značajno veći u odnosu na procenat CD138 pozitivne površine kod kontrolnih neimunizovanih životinja (E) (* $p < 0,05$).

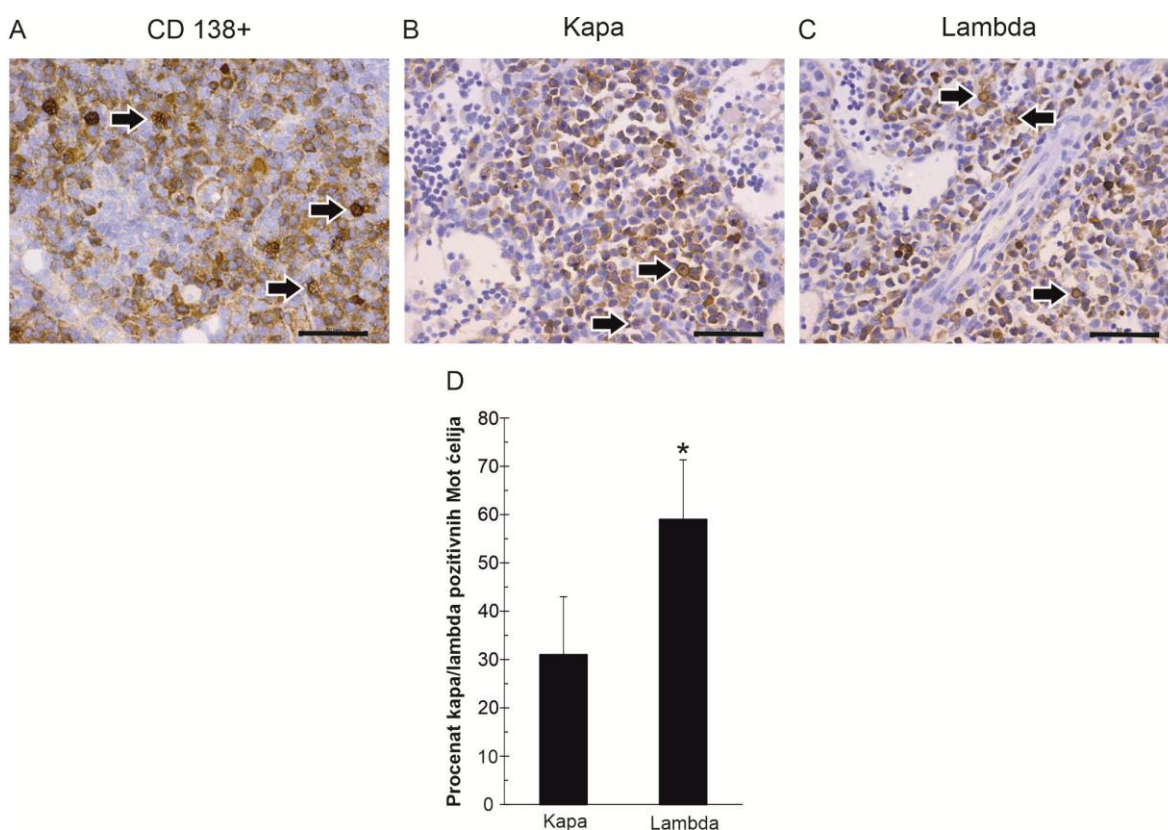
Na presecima drenirajućih limfnih čvorova zdravih i imunizovanih AO pacova 3. i 5. dpi uočavaju pojedinačni CD138⁺ plazmociti u meduli i subkapsularnim sinusima, što odgovara normalnom nalazu (slika 13A-C). Sedmog dana uočene su male grupe plazmocita u meduli limfnog čvora (slika 13D).



Slika 13: CD138 bojenje limfnih čvorova zdravih i imunizovanih AO pacova

Na presecima drenirajućih limfnih čvorova (500 μm) zdravih (A) i imunizovanih AO pacova 3. i 5. dpi (B-C) uočava se mali broj CD138⁺ ćelija, što odgovara normalnom nalazu. Nešto veći broj CD138⁺ ćelija je prisutan kod imunizovanih AO pacova 7. dpi (D).

Primenom monoklonskih antitela za kapa i lambda lance imunoglobulina uočena je poliklonska aktivacija plazmocita. U meduli drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova 7. dpi uočeno je prisustvo obe klase lakih lanaca imunoglobulina, što ukazuje na poliklonsku aktivaciju plazmocita (slika 14B-C). Kod imunizovanih DA pacova, 7. dpi je potvrđeno prisustvo Mot ćelija i imunohistohemijskim bojenjem. Mot ćelije su uočene nakon bojenja preseka limfnih čvorova sa sva tri antitela, anti-CD138, anti-kapa i anti-lambda (slika 14A-C, strelice), što ukazuje na prisustvo poliklonski aktiviranih Mot ćelija. Dalje smo želeli da procenimo broj kapa- i lambda-pozitivnih Mot ćelija, pa je izvršena morfometrijska analiza preseka limfnih čvorova koji su obojeni anti-kapa i anti-lambda antitelom. Morfometrijskom analizom je pokazano da je na presecima drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova $31,09 \pm 11,89\%$ Mot ćelija bilo kapa⁺, a $58,97 \pm 12,33\%$ lambda⁺. Razlika u procentu kapa i lambda pozitivnih Mot ćelija je bila statistički značajna ($p < 0,05$) (slika 14D).



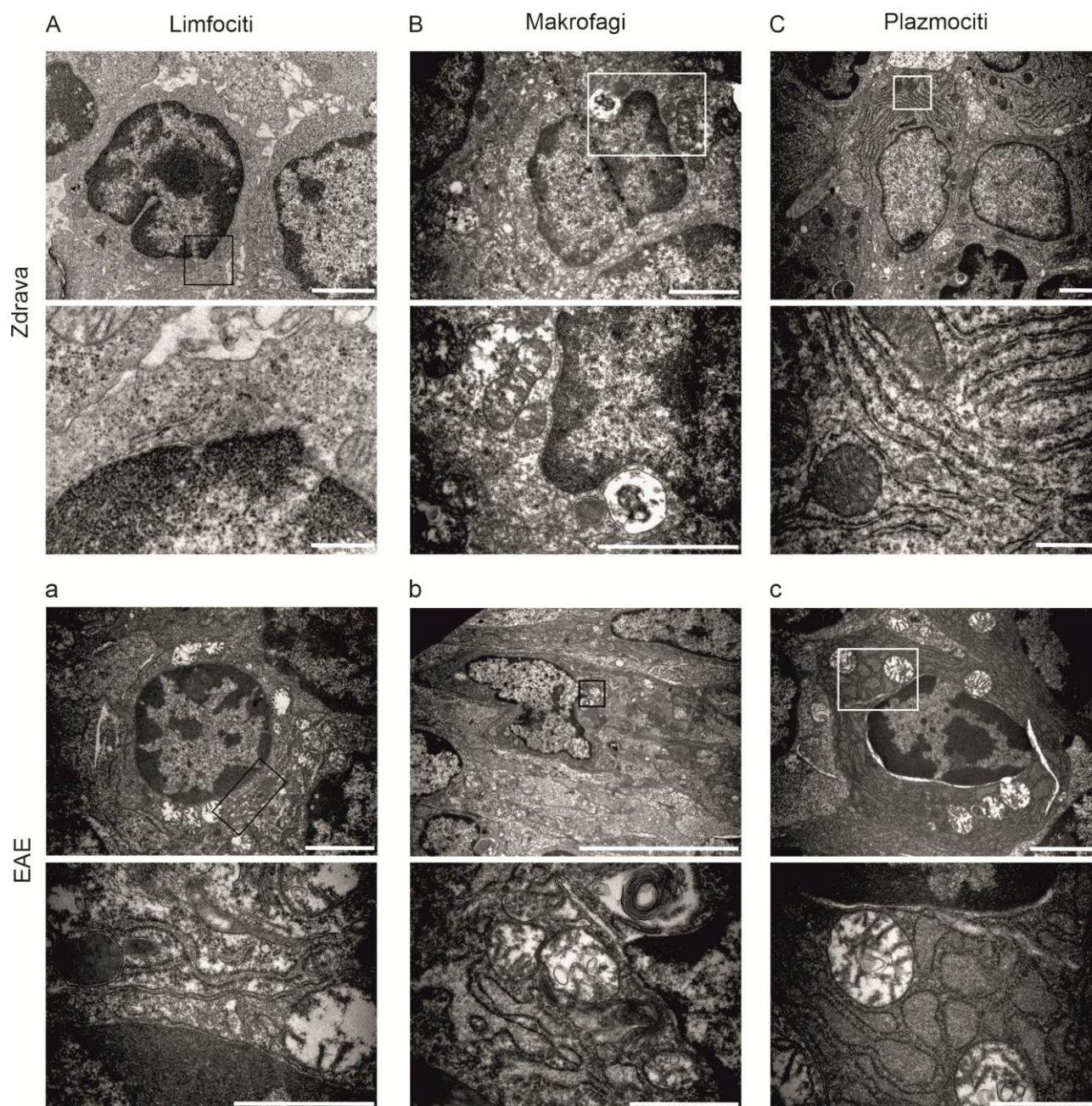
Slika 14: CD138 kapa/lambda bojenje preseka limfnih čvorova imunizovanih DA pacova.

Na presecima limfnih čvorova (50 μm) imunizovanih DA životinja (7. dpi) uočava se poliklonska aktivacija plazmocita koja je prisutna i u Mot ćelijama (strelice) (A-C). Iako je aktivacija poliklonska, procenat lambda-pozitivnih Mot ćelija je značajno veći u odnosu na procenat kapa-pozitivnih Mot ćelija (D) (* $p < 0,05$)

4.5 Narušena morfologija ER i mitohondrija u različitim tipovima ćelija u limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova

Nalaz Mot ćelija u limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova ukazuju na prisustvo ER stresa u plazma ćelijama tokom indukcije EAE. U daljem nastavku istraživanja, korišćena je transmisivna elektronska mikroskopija da bi se analizirale morfološke ultrastrukturne pomene u različitim tipovima ćelija drenirajućeg limfnog čvora DA pacova. TEM analiza medule limfnih čvorova zdravih DA pacova je pokazala očuvanu morfologiju svih celularnih odeljaka, uključujući ER i

mitohondrije u limfocitima, makrofagima i plazmocitima (slika 15A-C). S druge strane, u limfocitima, makrofagima i u plazmocitima drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova (7. dpi) uočavaju se dilatirani ER i mitohondrije sa narušenom morfologijom u vidu otoka matriksa i dezorganizacije krist (slika 15a-c). Ovakav morfološki nalaz potvrđuje aktivaciju ER stresa i njegovu povezanost sa funkcijom mitohondrija u različitim tipovima ćelija imunskog sistema u limfnom čvoru tokom indukcije EAE.



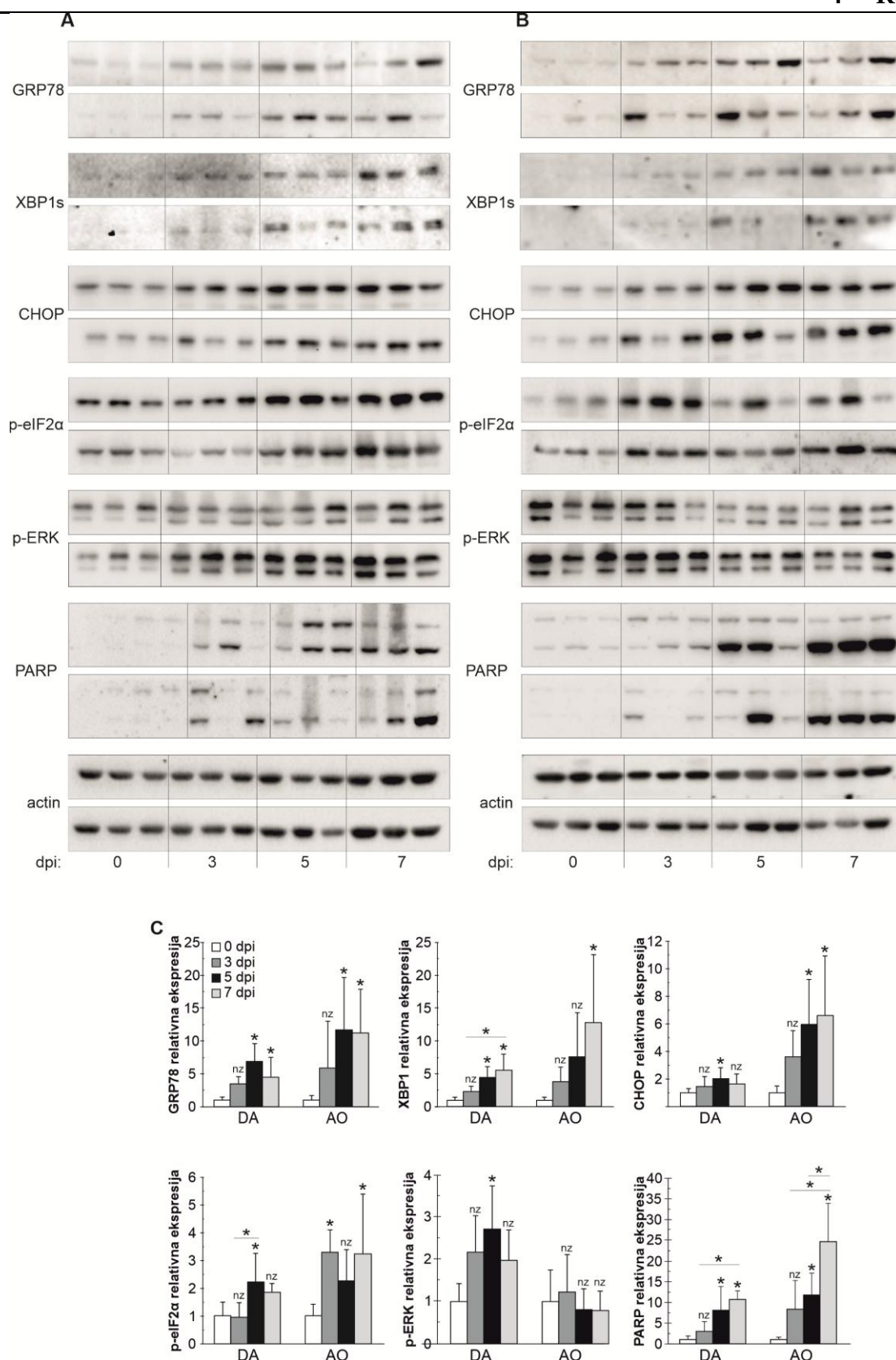
Slika 15: TEM analiza drenirajućih limfnih čvorova zdravih i imunizovanih DA pacova.

Ćelije drenirajućih limfnih čvorova 7. dpi (2 μ m, i 10 μ m (b) gornje fotomikrografije, 2 μ m (B), 1 μ m (a, b, c), 500nm (A, C) donje fotomikrografije) zdravih DA pacova imaju očuvanu morfologiju (A-C), dok se u ćelijama drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova uočavaju dilatacija ER i oštećenje mitohondrija (a-c). Strelice pokazuju dilatirani ER, a vrhovi strelica oštećene mitohondrije sa otečenim matriksom i dezorganizovanim kristama u limfocitima (a), makrofagima (b) i plazmocitima (c) EAE životinja.

4.6 Obrasci aktivacije ER stresa i UPR tokom indukcije EAE se razlikuju kod DA i AO pacova

Pošto su rezultati morfoloških analiza ukazali na prisustvo ER stresa tokom indukcije EAE, u narednim eksperimentima ispitivana je ekspresija markera ER stresa/UPR u drenirajućim limfnim čvorovima DA i AO pacova. Imunoblot analizom je pokazano da kod oba soja pacova nakon imunizacije dolazi do porasta ekspresije markera ER stresa/UPR, pri čemu GRP78 svoj maksimum dostiže petog dana nakon imunizacije ($p < 0,05$). XBP1 se ranije aktivira kod DA pacova (5. dpi, $p < 0,05$), u odnosu na AO pacove (7. dpi, $p < 0,05$). Pored porasta ekspresije XBP1 kod imunizovanih životinja u odnosu na neimunizovane, kod imunizovanih DA pacova se uočava i značajno povećanje ekspresije XBP1 u 7. dpi u odnosu na 3. dpi ($p < 0,05$) (slika 16A-C). Statistički značajan porast ekspresije CHOP se kod imunizovanih DA pacova, u odnosu na neimunizovane životinje, uočava 5. dpi ($p < 0,05$), dok je ovaj porast kod imunizovanih AO pacova izraženiji i statistički značajan u 5. i 7. dpi (slika 16A-C). Fosforilacija eIF2 α (p-eIF2 α) je nakon imunizacije značajno povišena 5. dpi kod imunizovanih DA pacova, dok je porast fosforilacije eIF2 α kod imunizovanih AO pacova značajan 3. i 7. dpi u odnosu na neimunizovane životinje ($p < 0,05$) (slika 16A-C). Pored toga, fosforilacija eIF2 α je značajno veća 5. dpi u odnosu na 3. dpi kod imunizovanih DA pacova ($p < 0,05$), dok ovakva promena kod AO pacova izostaje (slika 16A-C). Fosforilacija MAP kinaze ERK (p-ERK), koja je uključena u preživljavanje ćelija, statistički je značajno povišena 5. dpi kod imunizovanih DA pacova, dok se kod imunizovanih AO pacova ne uočava porast fosforilacije ove kinaze (slika 16A-C) u odnosu na neimunizovane životinje. Isecanje PARP molekula je kod oba soja imunizovanih pacova (DA i AO) statistički značajno povećano 5. i 7. dpi u odnosu na neimunizovane životinje, ali je efekat više izražen kod imunizovanih AO pacova nego kod imunizovanih DA pacova (slika 16A-C). Dodatno, kod imunizovanih AO pacova isecanje PARP je značajno veće 7. dpi u odnosu na 3. i 5. dpi, dok je kod imunizovanih DA pacova isecanje PAR značajno veće 7. dpi u odnosu na 3. dpi (slika 16A-C).

S obzirom da je porast CHOP izraženiji i trajniji, kao i da se p-eIF2 α javlja ranije kod AO pacova, a da se fosforilacija ERK javlja samo kod DA pacova, možemo zaključiti da ova dva soja pacova imaju različite obrasce aktivacije ER stresa.



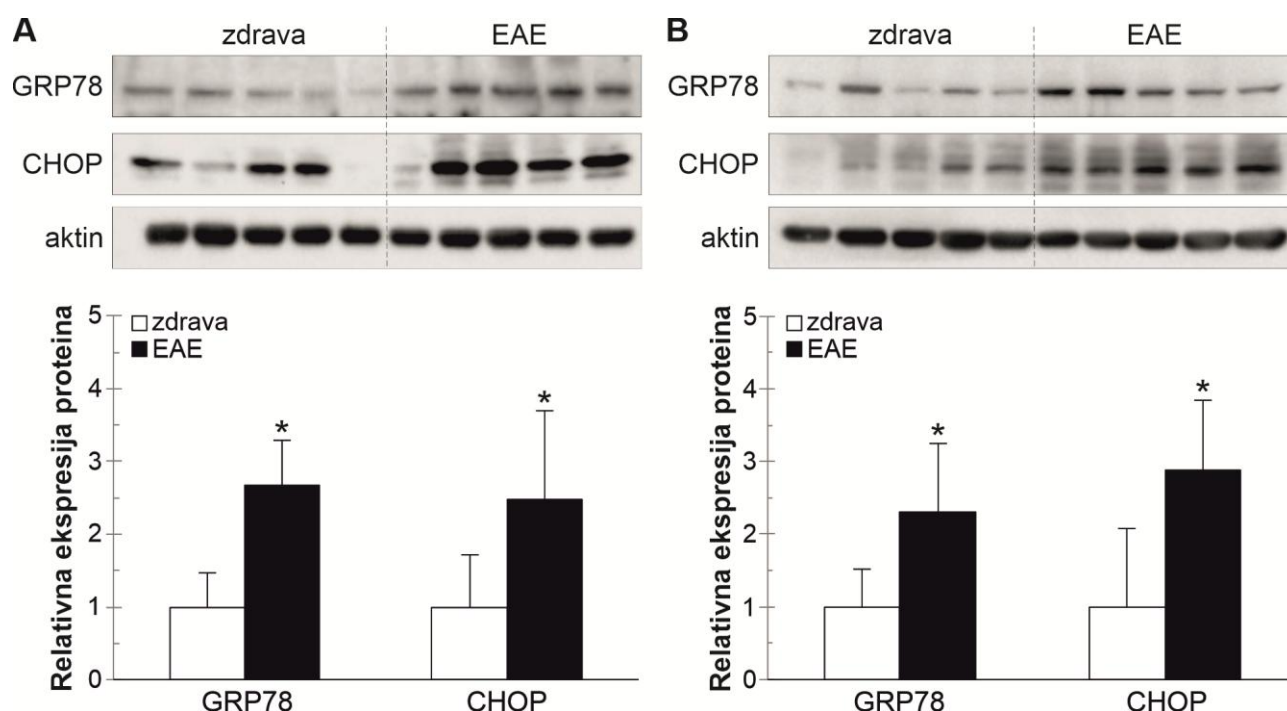
Slika 16: Vremenska kinetika aktivacije odgovora na ER stres kod različitih sojeva pacova.

Ekspresija markera ER stresa /UPR - GRP78, XBP1, CHOP i p-eIF2 α , kao i ekspresija ERK kinaze i markera apoptoze PARP u drenirajućim limfnim čvorovima zdravih i imunizovanih DA (A) i AO (B) pacova 3, 5. i 7. dana posle imunizacije je praćena imunoblot metodom (n = 6 za svaki soj pacova za svaki vremenski interval). Porast svih markera ER stresa se uočava kod oba soja pacova,

ali se ovaj porast dešava u različitim vremenskim intervalima i različitim intenzitetom. Denzitometrijski rezultati relativne ekspresije proteina u odnosu na aktin prikazani su ispod reprezentativnih blotova (C) (* $p < 0,05$, nz – nije značajno u odnosu na 0 dpi).

4.7 Indukcija ER stresa se aktivira u $CD3^+$ i $CD3^-$ ćelijama limfnog čvora imunizovanih DA pacova

S obzirom da autoreaktivni T limfociti imaju najznačajniju ulogu u patogenezi EAE, dalje smo ispitali da li u T limfocitima drenirajućeg limfnog čvora dolazi do povećanja ekspresije markera ER stresa. Kako bismo ispitali aktivaciju ER stresa u T limfocitima, ćelije limfnih čvorova zdravih i imunizovanih DA pacova su sortirane na osnovu ekspresije CD3 molekula, površinskog markera T limfocita. Imunoblot analiza je pokazala da nivoi markera ER stresa, GRP78 i CHOP rastu i u $CD3^+$ i u $CD3^-$ ćelijama imunizovanih DA pacova u poređenju sa zdravim životinjama ($p < 0,05$) (slika 17A-B). Nivoi drugih markera ER stresa (XBP1, eIF2 α) nisu analizirani zbog malog broja sortiranih ćelija. Ovi rezultati ukazuju na aktivaciju ER stresa i u $CD3^+$ ćelijama (T limfocitima) i u $CD3^-$ ćelijama limfnih čvorova imunizovanih DA pacova.

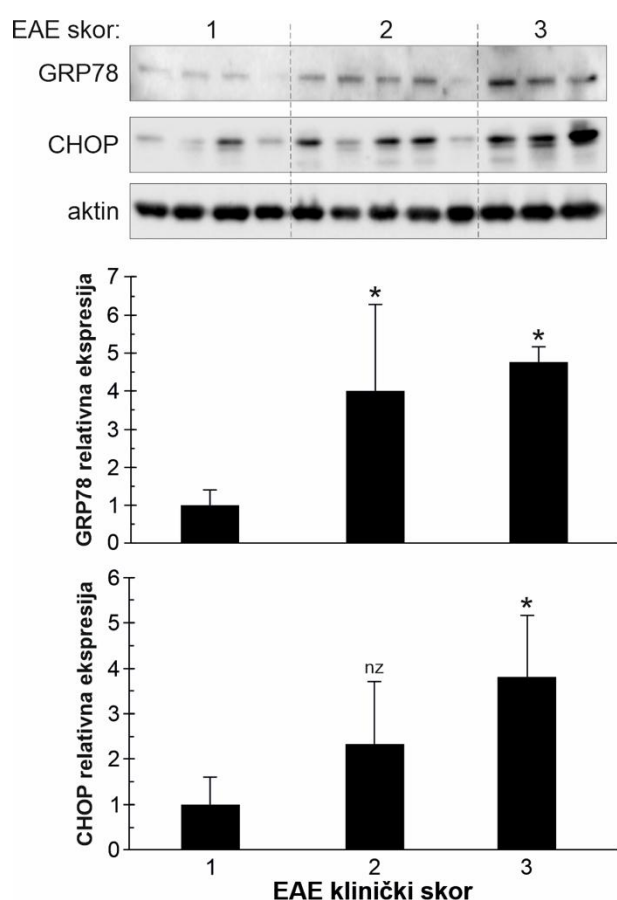


Slika 17: Imunoblot analiza markera ER stresa u $CD3^+$ i $CD3^-$ ćelijama limfnog čvora imunizovanih DA pacova.

Do aktivacije ER stresa dolazi i u $CD3^+$ (A) i u $CD3^-$ (B) ćelijama drenirajućih limfnih čvorova izolovanih iz imunizovanih DA pacova. Ćelijska suspenzija je bila pripremljena iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova 7. dpi ($n = 5$) i drenirajućih limfnih čvorova zdravih DA pacova ($n = 10$ - zbog malog broja ćelija pulovani su uzorci 2 životinje). Izolovane ćelije su obojene anti-CD3/FITC antitelom i sortirane pomoću protočnog citofluorimetra. Ekspresija ER stresa markera GRP78 i CHOP u $CD3^+$ (A) i $CD3^-$ (B) ćelijama je analizirana imunoblotom. Denzitometrijski podaci relativne ekspresije proteina (u odnosu na aktin) su prikazani ispod odogovarajućih blotova (* $p < 0,05$).

4.8 Aktivacija ER stresa u mononuklearnim infiltratima kičmene moždine korelira sa kliničkom slikom EAE

Kako bismo procenili vezu između aktivacije ER stresa i kliničke aktivnosti EAE, nivoi markera ER stresa su određivani u mononuklearnim infiltratima izolovanim iz kičmene moždine pacova sa različitom težinom kliničke slike na vrhuncu bolesti (EAE klinički skor 1-3, 12-14 dpi). Nivoi markera ER stresa, GRP78 i CHOP su bili statistički značajno veći u MNČKM izolovanim iz kičmene moždine pacova sa EAE skorom 2 i 3 u odnosu na MNČKM izolovane iz kičmene moždine pacova sa EAE skorom 1 ($p < 0,05$) (slika 18). Nivoi drugih markera ER stresa (XBP1, eIF2 α) nisu analizirani zbog malog broja izolovanih MNČKM. Ovi rezultati, koji pokazuju značajan porast markera ER stresa u MNČKM životinja sa većim EAE skorom, ukazuju na pozitivnu povezanost aktivacije ER stresa u mononuklearnim infiltratima CNS (uglavnom T limfociti, oko 80%) i stepena težine bolesti.



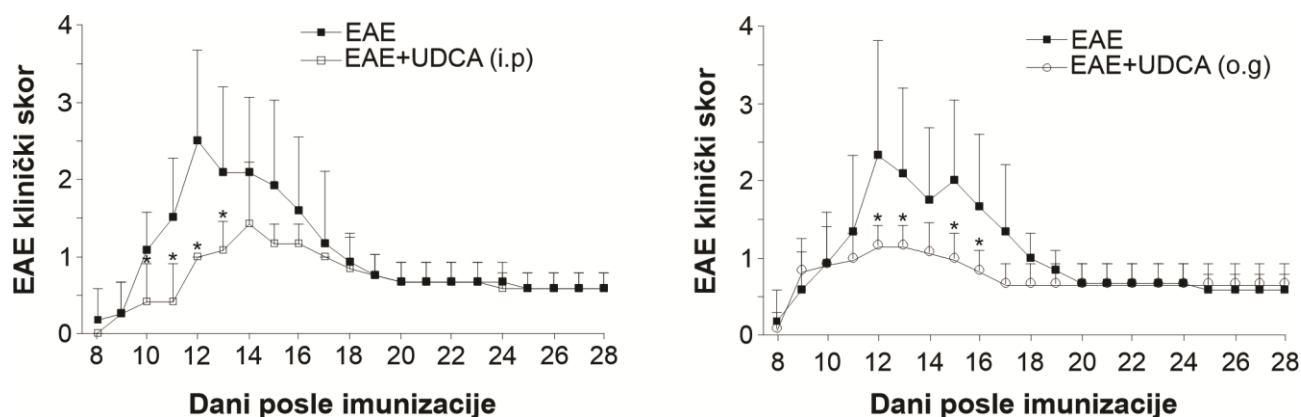
Slika 18: Korelacija između kliničkog skora bolesti i nivoa markera ER stresa u mononuklearnim infiltratima kičmene moždine imunizovanih DA pacova.

MNČKM su izolovane iz kičmene moždine imunizovanih DA pacova 12-14 dpi i pripremljene su za imunoblot analizu. Zbog malog broja ćelija i niske koncentracije proteina, proteini iz 2-3 uzorka životinja sa istim kliničkim skorom su pulovani i analizirani imunoblotom. Denzitometrijski podaci relativne ekspresije proteina (u odnosu na aktin) su prikazani ispod imunoblota (* $p < 0,05$, nz - nije značajno).

4.9 Inhibicija ER stresa poboljšava klinički tok EAE

U cilju ispitivanja uticaja ER stresa na klinički tok EAE, imunizovani DA pacovi su tretirani inhibitorom ER stresa UDCA. Uzimajući u obzir ranije opisane antiinflamatorne mehanizme UDCA, kao i mogućnost UDCA da prolazi kroz KMB, želeli smo da ispitamo da li inhibicija ER stresa primenom UDCA može da umanjí neuroinflamaciju i da smanji stepen neurološkog oštećenja kod imunizovanih DA pacova. Dobijeni rezultati su pokazali da intraperitonealna primena UDCA nije odložila početak bolesti (dan početka bolesti se nije razlikovao između tretiranih i netretiranih životinja), ali je dovela do značajnog smanjenja srednjeg dnevnog skora u nekoliko vremenskih

tački (10, 11, 12. i 13 dpi) ($p<0.05$) (slika 19). Pored toga, intraperitonealna primena UDCA je dovela i do smanjenja kumulativnog i maksimalnog EAE skora ($p<0.05$) (tabela 3). Primena UDCA oralnom gavažom takođe nije imala efekat na dan početka bolesti, dok je na kumulativni i maksimalni EAE skor imala sličan, ali nešto slabiji efekat u odnosu na intraperitonealnu primenu ($p<0.05$) (slika 19, tabela 3). Značajno smanjenje srednjeg dnevnog skora je uočeno 12, 13, 15. i 16 dpi.



Slika 19: Efekat UDCA na klinički tok EAE.

Nakon imunizacije HKM u CFA, kontrolne DA životinje su dobile PBS intraperitonealno (i.p) ili oralnom gavažom (o.g) ($n = 6$ po grupi), dok su tretirane grupe životinja dobijale UDCA intraperitonealno (120 mg/kg, $n = 6$) ili oralnom gavažom (500 mg/kg, $n = 6$). Klinički skor EAE je praćen od dana imunizacije do 28. dpi. Primena UDCA na oba načina dovela je do značajnog smanjenja srednjeg dnevnog EAE skora u nekoliko vremenskih intervala: 11, 12. i 13. dpi nakon primene UDCA intraperitonealno, odnosno 12, 13, 15. i 16. dpi nakon primene UDCA oralnom gavažom (* $p<0.05$).

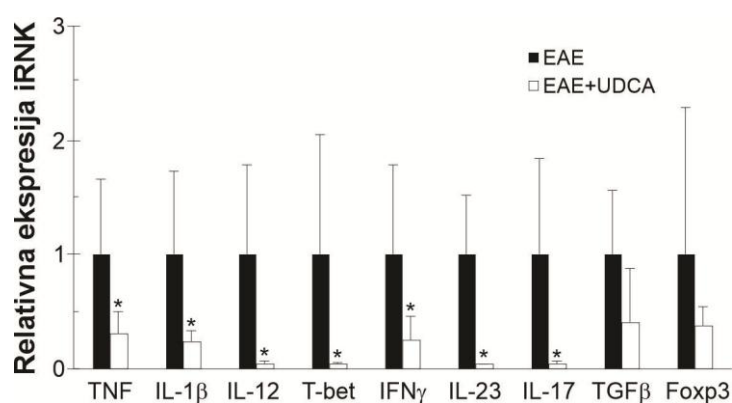
Tabela 3: DA pacovi imunizovani HKM u CFA ($n = 6$ po grupi) su dobijali svakodnevno PBS (kontrolna grupa) ili UDCA intraperitonealno (120 mg/kg), odnosno oralnom gavažom (500 mg/kg) tokom 28 dana. Klinička slika je evaluirana svakodnevno, a rezultati su predstavljeni kao $SV \pm SD$ (* $p<0.05$ označava statistički značajnu razliku u odnosu na kontrolnu EAE grupu). UDCA je dovela do značajnog smanjenja maksimalnog EAE skora, kao i do smanjenja kumulativnog EAE skora.

	Maksimalni klinički skor	Kumulativni klinički skor	Dan početka bolesti
EAE (PBS intraperitonealno)	3,00±0,77	21,67±5,94	9,50±0,84
EAE+UDCA (intraperitonealno)	1,42±0,8*	15,08±3,14*	10,67±1,51
EAE (PBS oralnom gavažom)	2,92±0,66	21,25±5,79	9,17±0,75
EAE+UDCA (oralnom gavažom)	1,33±0,26*	16,08±4,09	9,17±0,98

4.10 Anti-inflamatorno dejstvo UDCA u EAE

Potencijalni antiinflamatorni efekat UDCA je ispitivan qRT-PCR metodom, koja je pokazala da intraperitonealna primena UDCA kod imunizovanih DA pacova dovodi do značajnog smanjenja ekspresije gena za $\text{IFN}\gamma$, glavni efektorski citokin Th1 ćelijskog odgovora, kao i do smanjenja ekspresije gena za IL-12 i transkripcioni faktor T-bet, koji imaju ulogu u diferencijaciji Th1 ćelija ($p < 0,05$). Pored inhibicije Th1 ćelijskog odgovora, UDCA je dovela i do statistički značajnog smanjenja ekspresije gena za IL-17, koji predstavlja glavni efektorski citokin Th17 ćelijskog odgovora, kao i do smanjenja ekspresije gena za IL-23, ključnog faktora diferencijacije i preživljavanja Th17 ćelija ($p < 0,05$). Uočeno je i statistički značajno smanjenje ekspresije gena za proinflamatorne citokine TNF i IL-1 β ($p < 0,05$). UDCA je dovela i do smanjenja nivoa iRNK za transkripcioni faktor regulatornih T ćelija Foxp3 i njihov imunoregulatorni citokin TGF- β 1, ali ovo smanjenje nije bilo statistički značajno (slika 20).

Prikazani rezultati pokazuju da inhibicija ER stresa dovodi do smanjenja neuroinflamacije povezane sa Th1/Th17 ćelijskom diferencijacijom i posledičnog poboljšanja kliničkog toka EAE.



Slika 20: Efekti UDCA na relativnu ekspresiju gena za proinflamatorne i imunoregulatorne citokine.

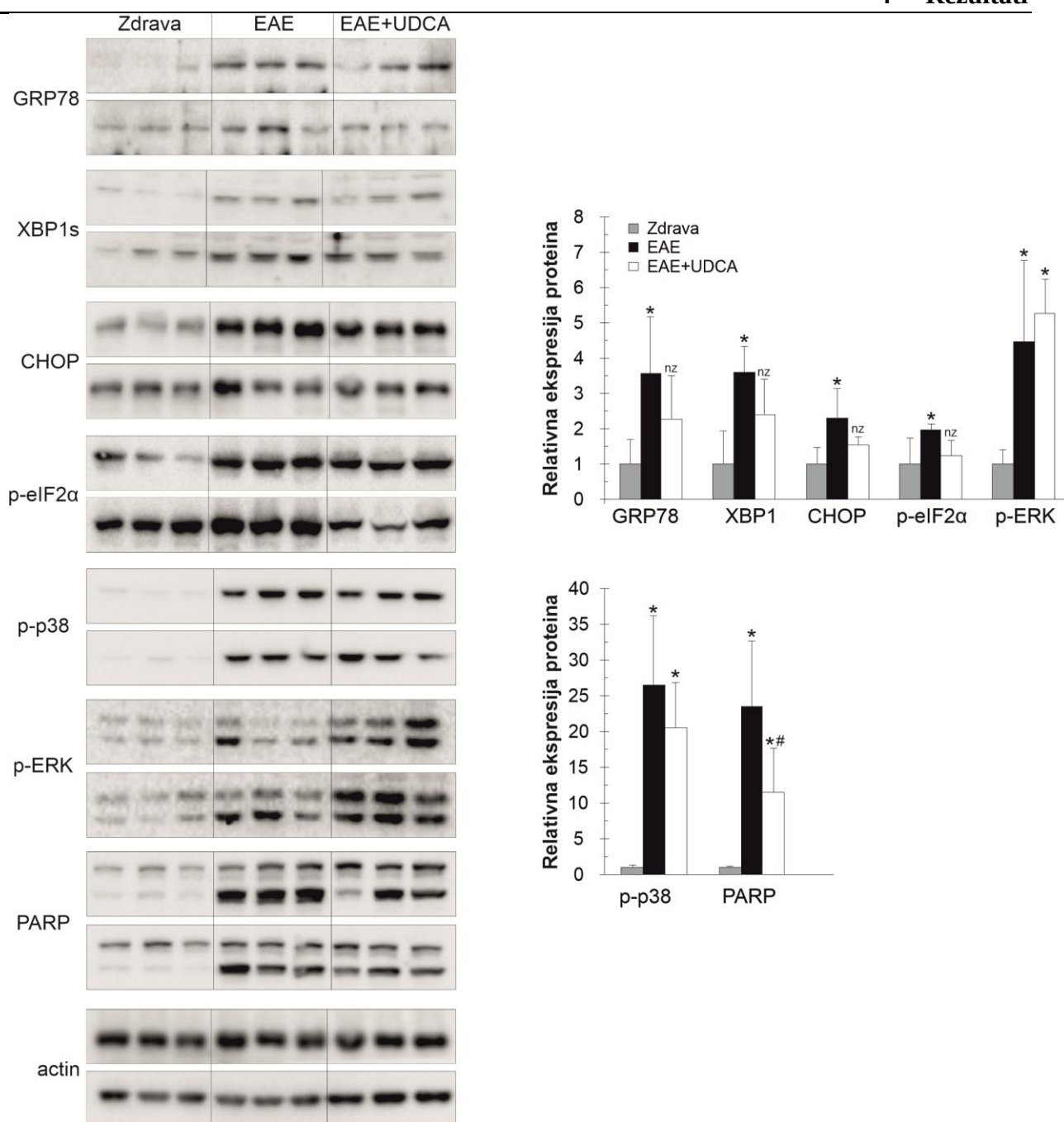
Nakon imunizacije (HKM+CFA), a za potrebe PCR analize, životinje su od dana imunizacije tretirane UDCA intraperitonealno (120 mg/kg) tokom 7 dana, nakon čega su izolovani drenirajući limfni čvorovi. Iz tkiva limfnog čvora najpre je izolovan RNK molekul koji je dalje procesom reverzne transkripcije preveden u DNK molekul. qRT-PCR analizom praćena je ekspresija iRNK za TNF, IL-1 β , IL-12, T-bet, $\text{IFN}\gamma$, IL-23, IL-17, TGF- β 1 i Foxp3. Statistički značajno smanjenje ekspresije gena za određene citokine je označeno sa * ($p < 0,05$).

4.11 Efekat UDCA inhibira na ekspresiju markera ER stresa u EAE

Imunoblot analiza ekspresije markera ER stresa u imunizovanim životinjama koje su primile UDCA pokazala je da se nivoi GRP78, splajsovane forme XBP1, CHOP i fosforilisanog eIF2 α (p-eIF2 α) značajno povećavaju u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova u odnosu na zdrave životinje ($p < 0,05$) (slika 21). Iako primena UDCA nije dovela do statistički značajnog smanjenja ekspresije ovih markera, nivoi GRP78, XBP1, CHOP i p-eIF2 α nisu bili statistički značajno veći kod imunizovanih DA pacova tretiranih UDCA u odnosu na zdrave neimunizovane životinje (slika 21). Ovakav rezultat indirektno ukazuje da je UDCA sprečila aktivaciju ER stresa

kod imunizovanih DA pacova. Pored ekspresije markera ER stresa, praćeni su i fosforilacija p38 MAP kinaze i ERK, kao i isecanje PARP molekula (slika 21). Kod imunizovanih DA pacova došlo je do povećane fosforilacije ERK ($p < 0,05$), koja nije dodatno promenjena primenom UDCA. Pored toga, UDCA dovodi do značajnog smanjenja isecanja PARP u odnosu na imunizovane kontrolne životinje ($p < 0,05$), ali ne i do smanjenja fosforilacije p38 MAP kinaze, koja je značajno povećana u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova bez obzira na tretman UDCA ($p < 0,05$).

Prikazani rezultati ukazuju da je povoljan efekat UDCA na tok EAE povezan sa inhibicijom ER stresa.



Slika 21: Efekat *in vivo* primene UDCA na ekspresiju markera ER stresa u limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova.

Nakon imunizacije HKM u CFA, DA pacovi su dobili intraperitonealno PBS ili UDCA (120 mg/kg). Životnije su žrtvovane posle 7 dana, nakon čega su izolovani drenirajući limfni čvorovi. Pored kontrolne grupe (imunizovani DA pacovi tretirani PBS) i imunizovane grupe životinja koja je dobijala tretman UDCA, žrtvovana je i grupa zdravih životinja ($n = 6$ po grupi). U drenirajućim limfnim čvorovima praćena je ekspresija markera ER stresa GRP78, CHOP, XBP1, p-eIF2α, fosforilacija MAP kinaza ERK i p38 kao i isecanje PARP. Denzitometrijski rezultati relativne ekspresije proteina u odnosu na aktin prikazani su pored reprezentativnih blotova (* $p < 0,05$ u odnosu na zdrave kontrole, # $p < 0,05$ u odnosu na EAE, nz – nije značajno).

U ovom istraživanju je pokazano da tokom patogeneze EAE kod DA pacova postoji povezanost između odgovora na ER stres u ćelijama imunskog sistema i stepena neuroinflamacije. Naime, ER stres je tokom induktivne faze bolesti bio prisutan i u CD3⁺ T ćelijama i u CD3⁻ ćelijama (makrofagi, B ćelije) drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih životinja. Nivoi markera ER stresa u mononuklearnim infiltratima CNS su bili u korelaciji sa težinom bolesti, a farmakološka inhibicija ER stresa je smanjenem ekspresije proinflamatornih, kao i Th1 i Th17, citokina dovela do poboljšanja kliničkog toka bolesti. Ovi rezultati ukazuju na značajnu ulogu aktivacije ER stresa u patogenezi EAE i pružaju novi uvid u dinamiku odgovora na ER stres u ovom modelu neuroinflamacije kod pacova.

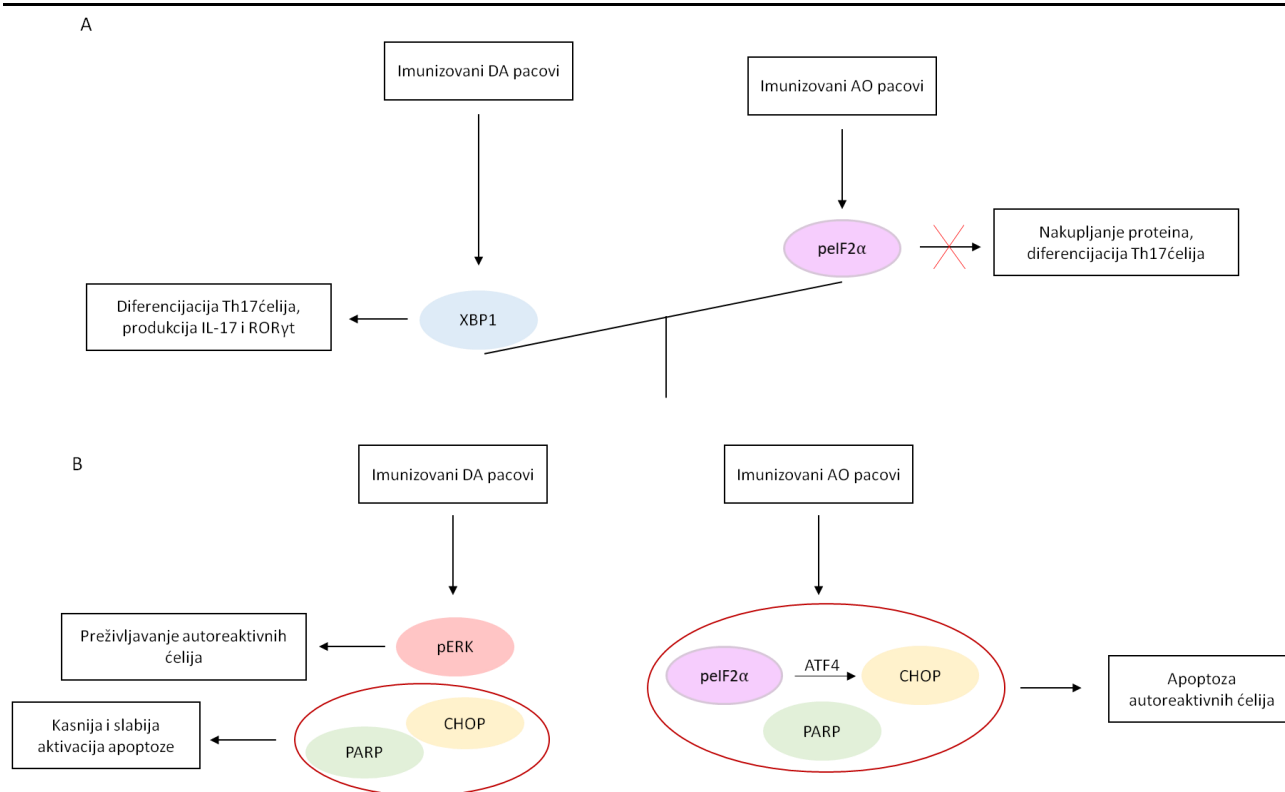
Poznata činjenica da su pacovi DA soja osetljivi, a pacovi AO soja otporni na indukciju EAE (Vukmanović i sar., 1989) potvrđena je i u ovoj tezi nalazom da nakon imunizacije CNS antigenima u prisustvu adjuvansa samo DA, ali ne i AO pacovi, razvijaju kliničke simptome bolesti. U skladu sa tim, histološkom analizom kod DA pacova uočena je rana aktivacija drenirajućih limfnih čvorova i prisustvo velikog broja mononuklearnih ćelija koje u potpunosti ispunjavaju limfni čvor, dok kod AO pacova do aktivacije drenirajućih limfnih čvorova dolazi tek nakon 7 dana. Kod imunizovanih DA pacova došlo je i do aktivacije humoralnog imunskog odgovora, što je potvrđeno imunohistohemijskim (CD138) bojenjem. Naime, u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova uočen je povećan broj CD138⁺ plazmocita, odnosno ćelija, u svim vremenskim tačkama, što potvrđuje da u drenirajućim limfnim čvorovima, pored aktivacije T limfocita dolazi i do aktivacije B limfocita. Ovakav nalaz ukazuje na značaj B limfocita i u patogenezi EAE, u modelu koji primarno zavisi od aktivacije CNS-specifičnih autoreaktivnih T ćelija (Kuerten i Lehmann, 2011; McFarland i Martin, 2007; Rangachari i Kuchroo, 2013). Plazmocitni infiltrat je uočen i kod AO pacova (7. dpi) i korelirao je sa nalazom HE bojenja, gde je aktivacija drenirajućih limfnih čvorova AO pacova takođe prisutna. Iako kod AO pacova ne dolazi do razvoja bolesti, ovakav nalaz dodatno potvrđuje da tokom indukcije EAE dolazi do aktivacije B limfocita. Uloga B limfocita i autoantitela u patogenezi EAE nije u potpunosti razjašnjena, ali je poznato da ona imaju značajnu ulogu u modelima koji se zasnivaju na imunizaciji mijelin oligodendrocitnim glikoproteinom (MOG) (Stefflerl, Brehm, i Linington, 2000). Tako je pokazano da kod miševa koji prekomerno proizvode anti-MOG antitela dolazi do bržeg razvoja EAE i težeg ispoljavanja kliničke slike bolesti nego kod *wild type* miševa (Cross i Stark, 2005). Kao što je već pomenuto u uvodu, u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od MS postoje autoantitela na antigene mijelina i ona imaju dijagnostički značaj (Ziemssen i Ziemssen, 2005). Pored toga, Lasman je opisao 4 obrasca demijelinizacije u MS, od kojih drugi obrazac podrazumeva demijelinizaciju posredovanu antitelima (Lassmann, 2001). Na značaj daljeg istraživanja uloge B limfocita i Mot ćelija tokom patogeneze EAE ukazuje činjenica da prisustvo imunoglobulina u CNS kod pacijenata obolelih od MS, bar u nekim slučajevima, zavisi od migracije B limfocita u CNS (Villar i sar., 2012). Da je migracija B limfocita u CNS značajna za patogenezu MS sugerišu i rezultati istraživanja koje je obuhvatilo pacijente obolele od MS na terapiji monoklonskim antitelom natalizumabom, antitelom specifičnim za α -4 integrin, koje blokira migraciju efektorskih ćelija imunskog sistema u CNS. Njegova primena je dovela do smanjenja koncentracije imunoglobulina i broja B limfocita u cerebrospinalnoj tečnosti pacijenata obolelih od MS (Villar i sar., 2012), što je posledično dovelo i do poboljšanja kliničkog ispoljavanja MS, potvrđujući ulogu i značaj B limfocita u patogenezi MS. S druge strane, brojna istraživanja nisu uspeła da postave vezu između humoralne imunosti i patogeneze EAE (Cross i Stark, 2005), tako da ovo pitanje zahteva dodatna istraživanja.

Zanimljivo je da su u meduli limfnih čvorova DA pacova 7. dana nakon imunizacije svetlosnom i elektronskom mikroskopijom uočene Mot ćelije, koje predstavljaju atipične plazmocyte i prepoznate su kao velike, vakuolizovane ćelije sa ekscentrično postavljenim jedrom i velikim brojem sferičnih citoplazmatskih inkluzija koje odgovaraju Raselovim telima. Mot ćelije nisu uočene ni kod DA pacova u drugim analiziranim vremenskim intervalima, niti kod AO pacova. Ovakav rezultat govori u prilog vremenski zavisnoj i sojno specifičnoj pojavi Mot ćelija u EAE i

predstavlja prvi nalaz Mot ćelija u EAE modelu indukovanom imunizacijom CNS antigenima u prisustvu adjuvansa (Martinovic i sar., 2023). Prethodno su Raselova tela slučajno uočena u atrofičnim limfnim čvorovima i timusu ASW miševa koji razvijaju primarno progresivni EAE (Tsunoda i sar., 2005), kao i u cerebrospinalnoj tečnosti tokom akutnog virusnog meningitisa i meningoencefalitisa (Pelc, De Maertelaere, i Denolin-Reubens, 2008). Imunohistohemijskim bojenjem antitelima za kapa i lambda lake lance imunoglobulina potvrđeno je da Mot ćelije potiču od poliklonski aktiviranih B ćelija, za razliku od monoklonskih Mot ćelija kod nekih pacijenata obolelih od inflamatornog gastroenteritisa sa Raselovim telima (Zhang, Jin, i Cui, 2014). Kako se Raselova tela smatraju citoplazmatskim inkluzijama koje se formiraju od aberantnih ili prekobrojnih imunoglobulina, ili kao posledica narušene distribucije imunoglobulina (Ribourtout i Zandecki, 2015), njihovo prisustvo u drenirajućim limfnim čvorovima DA pacova ukazuje na prisustvo ER stresa u plazmocitima tokom indukcije EAE. Ovo je potvrđeno i elektronskom mikroskopijom koja je pokazala dilataciju ER ne samo u plazmocitima, već i u T ćelijama i makrofagima imunizovanih DA pacova.

U skladu sa rezultatima gore opisanih morfoloških ispitivanja, imunoblot analiza je pokazala povećanje ekspresije markera ER stresa GRP78, XBP1, CHOP i fosforilisanog eIF2 α kod imunizovanih DA pacova, ali i rezistentnog AO soja. Zanimljivo je da je u limfnom tkivu pacova AO soja i pored odsustva Mot ćelija primećena aktivacija ER stresa, što dodatno potvrđuje da se ER stres tokom indukcije EAE ne javlja samo u B, odnosno plazma ćelijama, već i u drugim ćelijama imunskog sistema, kao što su T limfociti i makrofagi. Obrazac aktivacije ER stresa razlikovao se kod dva soja, pri čemu je sveukupni odgovor na ER stres nakon imunizacije bio nešto izraženiji kod AO pacova u odnosu na DA pacove. Porast GRP78 molekula kod oba soja pacova ukazuje na povećanu potrebu za šaperonima unutar ER u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih životinja. Mobilizacija GRP78 i njegovo odvajanje od luminalnih domena senzora ER stresa dovodi do pokretanja UPR kod oba soja pacova. Međutim, kada se posmatra kinetika aktivacije UPR, kod AO pacova dolazi do izraženije aktivacije proapoptotskog proteina CHOP, koja je praćena i povećanim isecanjem PARP molekula. Takođe, kod AO pacova ranije dolazi do fosforilacije eIF2 α (3. dpi), čime se inhibira translacija, odnosno sprečava dalje nakupljanje proteina. Činjenica da inhibicija translacije dovodi do značajnog smanjenja ćelijske smrti povezane sa ER stresom potvrđuje da je smanjeno nakupljanje nesavijenih/nepravilno savijenih proteina veoma značajno za preživljavanje ćelija u uslovima ER stresa (Szegezdi i sar., 2006). Takođe, pored inhibicije translacije, farmakološka aktivacija fosforilacije eIF2 α može da ograniči diferencijaciju efektorskih Th17 ćelija, što dalje može povoljno da utiče na kliničko ispoljavanje bolesti (L. Chen i sar., 2021). Stimulacija fosforilacije eIF2 α , pored ograničavanja Th17 ćelijske diferencijacije u EAE, dovodi i do povećanog preživljavanja oligodendrocita, glavnih ćelija uključenih u proces mijelinizacije u CNS (Y. Chen i sar., 2019). Dalje, XBP1, koji se aktivira u odgovoru na ER stres, može imati ulogu u adaptaciji ćelije na ER stres aktivacijom ERAD i povećanjem transkripcije gena za proteine/enzime koji su uključeni u uvijanje proteina (Claudio Hetz i sar., 2015). Pored uloge u adaptaciji ćelije na ER stres, u EAE modelu je pokazano da XBP1 pospešuje diferencijaciju Th17 ćelija, odnosno da njegovo odsustvo smanjuje produkciju glavnog efekorskog citokina Th17 ćelija, IL-17 i transkripcionog faktora koji je odgovoran za diferencijaciju Th17 ćelijskog odgovora, ROR γ t (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). Dakle, konačni uticaj ER stresa na razvoj EAE zavisi od ravnoteže između suprotnih imunoregulatornih dejstava komponenata UPR, kao što su eIF2 α i XBP1. Rezultati ove doktorske disertacije su pokazali da se XBP1 molekul ranije aktivira kod DA pacova (5. dpi), i da se ova aktivacija dešava istovremeno sa fosforilacijom eIF2 α . S druge strane, XBP1 se kod AO pacova aktivira 7. dpi, ali kod njih dolazi do ranije fosforilacije eIF2 α koji, kao što je prethodno navedeno, ograničava encefalitogeni Th17 odgovor. Sve zajedno, indikativno je da pomeranje ravnoteže od Th17 suprimirajućeg eIF2 α odgovora prema Th17 stimulišućem XBP1 odgovoru, kao što je pokazano u ovom istraživanju, može doprineti podložnosti DA pacova, odnosno rezistenciji AO pacova ka razvoju i kliničkom ispoljavanju EAE.

Iako fosforilacija (inaktivacija) eIF2 α primarno dovodi do inhibicije translacije, postoje molekuli koji mogu da prevaziđu ovu inhibiciju (Schröder i Kaufman, 2005). Jedan od takvih molekula je transkripcioni faktor ATF4. Fosforilacija eIF2 α dovodi do selektivne aktivacije ATF4, transkripcionog faktora koji je odgovoran za ushodnu regulaciju proapoptotskog markera ER stresa CHOP (Szegezdi i sar., 2006). U našem istraživanju, aktivacija CHOP se javlja paralelno sa fosforilacijom eIF2 α , što potvrđuje vezu između ova dva molekula. Rana i naglašena aktivacija CHOP proteina kod AO pacova, praćena značajno povećanim isecanjem PARP molekula, mogla bi da sugerise da je njihova rezistencija na indukciju bolesti povezana sa jačom aktivacijom apoptoze povezane sa ER stresom u autoreaktivnim limfocitima AO pacova. Sa druge strane, aktivacija CHOP je kod DA pacova nešto slabija i takođe je praćena isecanjem PARP, koje je bilo slabije izraženo nego kod AO pacova. Ovakav rezultat ukazuje da u limfnim čvorovima životinja koje su podložne razvoju EAE dolazi do slabije, a moguće i kasnije aktivacije apoptoze nego u limfnim čvorovima pacova rezistentnih na razvoj bolesti. Ukoliko se analizira vremenska kinetika i razlika u dinamici aktivacije molekula uključenih u signalnu kaskadu UPR, naši rezultati sugerisu da kod DA pacova preovladava aktivacija IRE1 α , dok je dominantni put aktivacije UPR kod AO pacova preko PERK molekula. Naime, kod DA pacova dolazi do istovremene aktivacije XBP1 i CHOP, pri čemu IRE1 α aktivira oba proteina. Kao što je opisano u uvodu, IRE1 α dovodi do isecanja introna iz iRNK za XBP1, čime ga aktivira, dok se aktivacija CHOP ostvaruje preko p38 MAP kinaze (Walter i Ron, 2011; Wang i Ron, 1996). Sa druge strane, rana fosforilacija eIF2 α i aktivacija CHOP kod AO pacova može biti posledica aktivacije PERK molekula. Kao što je već objašnjeno, aktivacija PERK dovodi do inhibicije eIF2 α i posledične aktivacije transkripcionog faktora ATF4, koji dalje povećava transkripciju gena za CHOP (Walter i Ron, 2011). Jedan od načina indukcije apoptoze posredovane ER stresom je aktivacija MAP kinaza JNK i p38. Ove kinaze se aktiviraju kompleksom IRE1 α –TRAF2–ASK1 (Urano i sar., 2000), dok se aktivacija MAP kinaze ERK najverovatnije dešava posredstvom PI3K signalnog puta (Dai, Chen, i Li, 2009; Hu i sar., 2004). Istraživanja su pokazala da PI3K/AKT i MEK/ERK signalni putevi imaju značajnu ulogu u preživljavanju ćelija inhibicijom apoptoze koja je pokrenuta tokom odgovora na ER stres (Dai i sar., 2009). Rezultati ove teze pokazuju povećanu fosforilaciju ERK kod DA pacova, dok ista izostaje kod AO pacova, pa bi stoga fosforilacija ERK mogla da bude još jedan od faktora koji doprinosi razvoju EAE kod DA pacova. Aktivacija ERK ima dvostruku ulogu u preživljavanju, odnosno smrti ćelije, pri čemu u nekim slučajevima dovodi do aktivacije proapoptotskih signala, dok u drugim slučajevima ima antiapoptotsku ulogu (Dai i sar., 2009; Hu i sar., 2004). Izostanak aktivacije ERK kod AO pacova, kod kojih najverovatnije dolazi do apoptoze autoreaktivnih limfocita, kao i njegova aktivacija kod DA pacova kod kojih dolazi do razvoja EAE, sugerisu da bi aktivacija ERK u ER stresu tokom indukcije EAE mogla da ima ulogu u preživljavanju autoreaktivnih limfocita. Ovi rezultati koji ukazuju na moguću ulogu ER stresa u regulaciji osetljivosti na indukciju EAE u skladu su sa nalazima da imunizovani AO pacovi, iako ne ispoljavaju kliničke znakove EAE i imaju slabiji limfoproliferativni odgovor od DA pacova, ipak imaju rane patohistološke lezije u CNS slične onima kod DA pacova (Vukmanović i sar., 1989). Dakle, rezistencija AO pacova na razvoj EAE nije posledica izostanka aktivacije CNS-autoreaktivnih limfocita, već izmenjenog encefalitogeni odgovor u čijoj regulaciji bi mogao da učestvuje i ER stres.



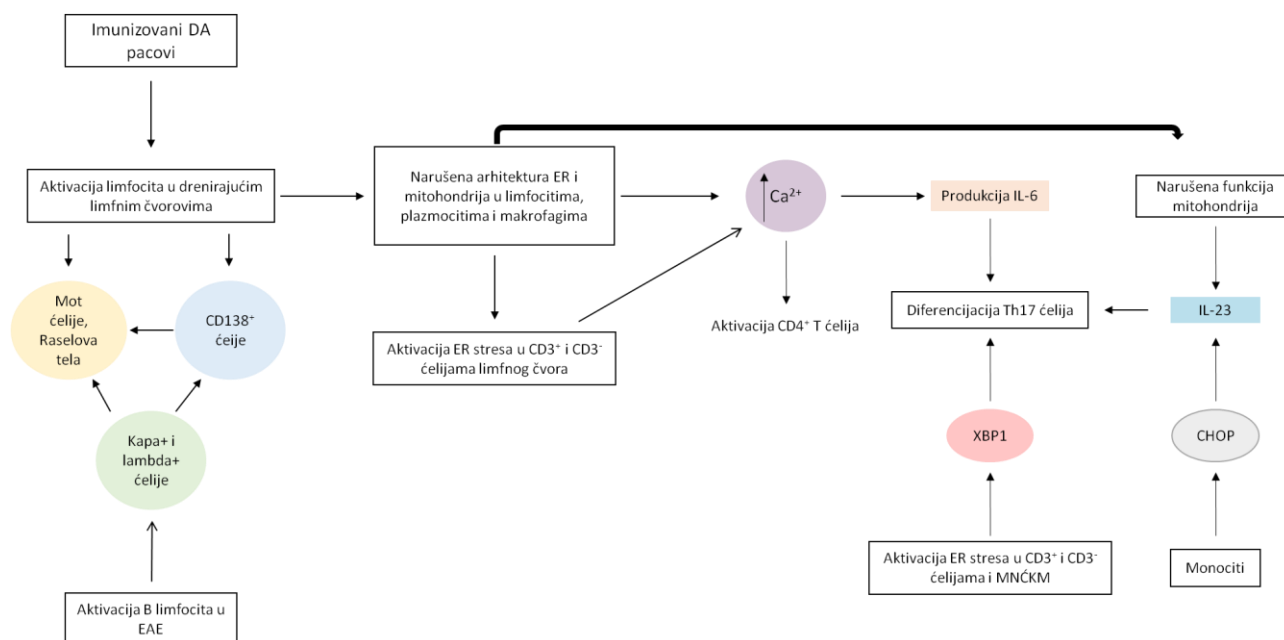
Šema 2. Različiti obrasci aktivacije ER stresa/UPR u indukciji EAE kod DA i AO pacova.

Pomeranje ravnoteže od Th17 inhibirajućeg ka Th17 stimulišućem odgovoru može doprineti rezistenciji imunizovanih AO pacova na indukciju EAE, odnosno podložnosti DA pacova razvoju bolesti (A). Ranija aktivacija procesa apoptoze, kao i izostanak fosforilacije MAP kinaze ERK, koja ima ulogu u preživljavanju ćelija, kod imunizovanih AO pacova takođe mogu doprineti rezistenciji AO pacova (B). Suprotno, aktivacija ERK kod imunizovanih DA pacova može doprineti preživljavanju autoreaktivnih ćelija, što pospešuje razvoj EAE.

Kada govorimo o razlikama između DA i AO pacova treba pomenuti da se ovi sojevi, osim po podložnosti ka razvoju EAE, razlikuju i u načinu na koji regulišu produkciju ROS i produkciju proinflammatory citokina (Miletić i sar., 2007). Proinflammatory citokini i ROS imaju ulogu u patogenezi ER stresa, pri čemu postoji pozitivna povratna sprega u kojoj ER stres dovodi do povećane produkcije ROS i proinflammatory citokina, a povećana produkcija ROS i proinflammatory citokina ima ulogu u nastanku ER stresa (Hillary i FitzGerald, 2018; Xue i sar., 2005). Važan izvor ROS su disfunkcionalne mitohondrije (Chaudhari i sar., 2014), a pokazano je i da narušena funkcija mitohondrija ima ulogu u razvoju EAE. *In vivo* konfokalna analiza kičmene moždine miševa kojima je indukovano EAE je pokazala disfunkciju mitohondrija (Sadeghian i sar., 2016), a uočeno je i da tokom patogeneze EAE dolazi do promena funkcije komponenata respiratornog lanca mitohondrija (Ng, Sadeghian, Heales, i Hargreaves, 2019). Narušena funkcija mitohondrija i komponenata respiratornog lanca je detektovana i na periferiji, u mišićima vilice i jetri životinja obolelih od EAE (Ng i sar, 2019). Na TEM fotomikrografijama limfnih čvorova imunizovanih DA pacova su uočene mitohondrije sa nabubrelim matriksom i narušenom strukturom mitohondrijalnih kristi, a detektovan je i prošireni ER, što potvrđuje povezanost produkcije ROS i ER stresa. Proširen lumen ER i narušena struktura mitohondrija su uočeni u različitim ćelijama imunskog sistema kao što su limfociti, plazmociti i makrofagi, za koje je poznato da učestvuju u patogenezi EAE (Constantinescu i sar., 2011; Hemmer i sar., 2006; Martin i Monson, 2007). Uporedna analiza interakcije ER stresa, oštećene funkcije mitohondrija, produkcije ROS i inflamatornog odgovora kod DA i AO pacova bi mogla pružiti dodatni uvid u njihovu složenu interakciju tokom inicijacije encefalitogenog imunskog odgovora.

Jedno od zanimljivih pitanja koje proističe iz gore opisanih rezultata je da li je i u kojoj meri ER stres prisutan u različitim ćelijama koje imaju ulogu u imunopatogenezi EAE. Do aktivacije odgovora na ER stres, odnosno do pokretanja UPR, dolazi u različitim tipovima ćelija tokom patogeneze EAE. Aktivacija UPR je pokazana u T limfocitima, makrofagima, oligodendrocitima i astrocitima (W. Lin i Stone, 2015), što je u skladu sa nalazom TEM fotomikrografija u okviru ovog istraživanja, gde je prošireni lumen ER uočen u različitim tipovima ćelija imunskog sistema. Uzimajući u obzir rezultat TEM analize, kao i podatke iz literature, primenjena je imunoblot metoda kako bi se detektovalo prisustvo markera ER stresa u CD3⁺ T limfocitima i CD3⁻ ćelijama (uglavnom B limfociti, makrofagi i NK ćelije) koje su dobijene sortiranjem ćelija izolovanih iz drenirajućih limfnih čvorova imunizovanih DA pacova. U obe ćelijske populacije je uočen značajan porast nivoa GRP78 i CHOP proteina, što ukazuje na aktivaciju ER stresa, kao i na pokretanje UPR. Ovi rezultati su u skladu sa prethodno opisanim podacima iz literature (W. Lin i Stone, 2015), kao i sa rezultatom TEM analize iz ovog istraživanja. Pored uloge u sintezi i obradi proteina (Schwarz i Blower, 2016), ER predstavlja najveće skladište jona kalcijuma u ćeliji (Koch, 1990). Poznato je da tokom ER stresa dolazi do oslobađanja jona kalcijuma u citosol (Claudio Hetz i sar., 2015), a pokazano je i da je kalcijum oslobođen iz ER neophodan za potpunu aktivaciju T limfocita (Thaxton i sar., 2017). Kalcijum takođe utiče i na produkciju proinflamatornih citokina IL-6 i IL-1 β u makrofagima (Sukhorukov i sar., 2020), što dodatno naglašava značaj ovih jona za aktivaciju i diferencijaciju CD4⁺ T ćelija s obzirom na činjenicu da IL-6, uz TGF β , učestvuje u diferencijaciji Th17 ćelija (Glatigny i Bettelli, 2018). S druge strane, diferencijacija Th17 ćelija može biti nezavisna od TGF- β , pri čemu bi značajnu ulogu u ovom procesu mogao da ima XBP1 (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). Na aktivaciju XBP1 utiču dva senzora ER stresa, ATF6 koji dovodi do povećane transkripcije gena za XBP1 i IRE -1 α koji obrađuje i time aktivira iRNK za ovaj protein (Walter i Ron, 2011). *In vitro* stimulacija naivnih T limfocita u prisustvu IL-6 i stimulatora ER stresa dovela je do diferencijacije Th17 ćelija, iako je TGF- β bio neutralisan anti-TGF- β antitelom (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). Pored IL-6 i TGF- β , za potpunu aktivaciju Th17 ćelija neophodan je i IL-23, koji se vezuje za svoj receptor, IL-23R, na površini Th17 ćelija. Vezivanje IL-23 za receptor pokreće signalnu kaskadu koja stimuliše klonsku ekspanziju i preživljavanje Th17 ćelija (Glatigny i Bettelli, 2018). Da ER stres ima ulogu u diferencijaciji Th17 ćelija pokazano je i nalazom da aktivacija PERK/CHOP puta u ćelijama monocitne loze doprinosi produkciji IL-23, koji zatim pospešuje razvoj Th17 ćelijskog odgovora. Gudal i saradnici su pokazali da ćelije kojima je utišan gen za CHOP proizvode značajno manje IL-23 nakon indukcije ER stresa u odnosu na ćelije koje imaju normalnu ekspresiju gena za CHOP (Goodall i sar., 2010; Heo et al., 2019). S druge strane, na produkciju IL-23 utiče i narušena funkcija mitohondrija. Mitohondrijalna disfunkcija pojačava produkciju IL-23 koja je stimulisana aktivacijom PERK/CHOP puta (Heo i sar., 2019), što potvrđuje vezu između ER stresa i mitohondrijalne disfunkcije koja je morfološki pokazana u ovom istraživanju TEM analizom. Diferencijacija B limfocita u plazmocyte koji proizvode antitela takođe zavisi od aktivacije UPR kao odgovora na ER stres i posledične aktivacije XBP1. XBP1 je jedini transkripcioni faktor za koji je poznato da je neophodan za terminalnu diferencijaciju B limfocita u plazmocyte (Reimold i sar., 2001; Todd i sar., 2009). Povećana ekspresija XBP1 u B limfocitima dovodi do promena u ćeliji koje su neophodne za njihovu diferencijaciju u plazmocyte: uvećanje ćelije, uvećanje organela i povećanje njihovih funkcionalnih kapaciteta i povećanje sinteze proteina (Shaffer i sar., 2004). B limfociti kojima je utišan gen za XBP1 mogu biti aktivirani, ali ne mogu biti diferencirani u efektorske plazma ćelije (Reimold i sar., 2001). Ovakvi rezultati sugerišu da XBP1 nema samo ulogu u adaptaciji ćelije na ER stres, nego i da bi mogao da bude ključni regulatorni molekul sekretujućih ćelija, među koje spadaju i B limfociti. U skladu sa podacima iz literature, koji pokazuju ulogu različitih tipova ćelija imunskog sistema (T i B limfociti, makrofagi) na razvoj EAE (Huitinga i sar., 1993; von Kutzleben i sar., 2017; Willenborg i Prowse, 1983), rezultati ovog istraživanja sugerišu da bi razvoj bolesti kod životinja imunizovanih CNS antigenima u prisustvu adjuvansa mogao bar delimično da zavisi od indukcije ER stresa i posledičnog pokretanja UPR. Ovu pretpostavku podržava blaži klinički tok EAE kod miševa koji imaju limfocitno-specifičnu deleciju XBP1 (Brucklacher-Waldert i sar.,

2017), kao i pozitivna korelacija između kliničkog skora EAE i nivoa markera ER stresa koja je uočena u ovom istraživanju. Nivoi GRP78 i CHOP proteina u mononuklearnim infiltratima CNS značajno se povećavaju sa napredovanjem bolesti, ukazujući na sve jaču aktivaciju UPR tokom razvoja bolesti. Treba napomenuti da je limfocitni infiltrat kičmene moždine uglavnom bio sačinjen od T limfocita (80%), što naglašava bitnu ulogu ER stresa u encefalitogenoj aktivnosti ovih ćelija.

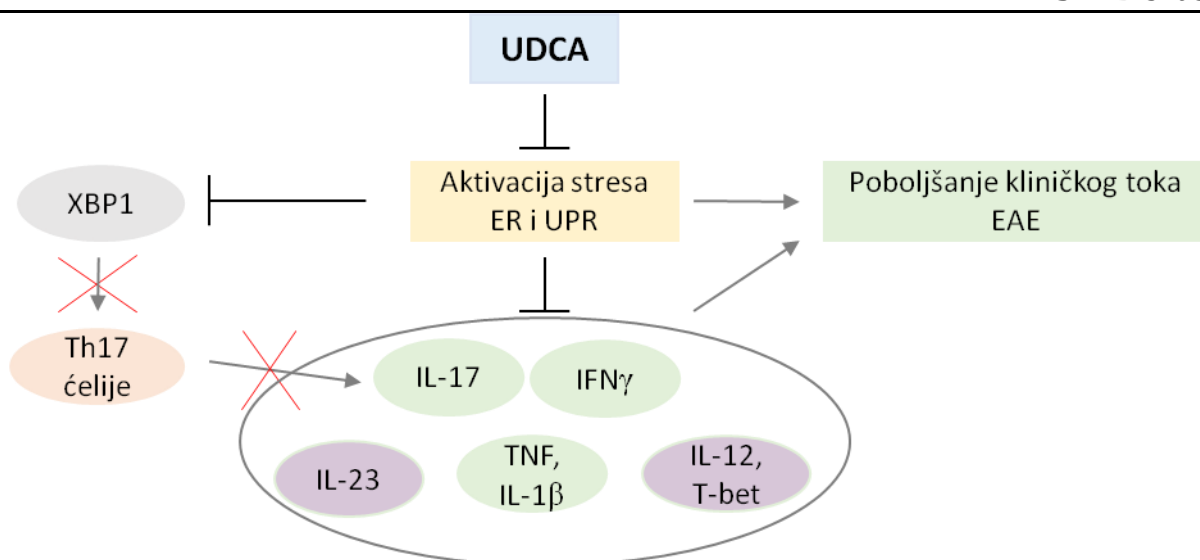


Šema 3: Aktivacija ER stresa u različitim tipovima ćelija tokom patogeneze EAE.

Nakon imunizacije CNS antigenima u prisustvu adjuvansa dolazi do ER stresa u $CD3^+$ T ćelijama i $CD3^-$ ćelijama kao što su B limfociti/plazmociti (Mot ćelije) i makrofagi. Narušena struktura ER može dovesti do oslobađanja kalcijuma iz ER koji dalje dovodi do oštećenja funkcije mitohondrija. Joni kalcijuma takođe pospešuju sekreciju IL-6 koji je neophodan za diferencijaciju Th17 efektorskih ćelija. Pored IL-6, za diferencijaciju Th17 ćelija je neophodan i IL-23, čiju produkciju pospešuje narušena struktura mitohondrija i aktivacija CHOP u ćelijama monocitne loze. Ulogu u diferencijaciju Th17 ćelija ima i XBP1.

Na kraju, demonstracijom sposobnosti hemijskog šaperona i inhibitora ER stresa, UDCA (Vang i sar., 2014), da poboljša klinički tok EAE potvrđeni su prethodni rezultati koji su pokazali pozitivan efekat UDCA i njenog primarnog metabolita TUDCA na EAE kod miševa (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). Kao što je već pomenuto u uvodu, UDCA/TUDCA su žučne kiseline koje se primarno koriste u terapiji primarnog bilijarnog holangitisa. Međutim, sve je veći broj istraživanja koja se bave ispitivanjem potencijalnih terapijskih efekata UDCA/TUDCA na bolesti koje nisu povezane sa oštećenjem jetre, kao što su dijabetes melitus, gojaznost, gastrointestinalni poremećaji, kardiovaskularne i neurodegenerativne bolesti (Vang i sar., 2014). Štaviše, nedavno je okončana klinička studija u kojoj je ispitivano dejstvo TUDCA u MS pod pretpostavkom da bi normalizacija redukovano nivoa žučnih soli u cirkulaciji mogla doprineti korekciji imunoloških poremećaja u ovoj bolesti (Bhargava i sar., 2020), što preliminarna analiza rezultata studije zaista i nagoveštava (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03423121). Ovu pretpostavku podržava istraživanje u kome je broj encefalitogenih Th1 i Th17 ćelija bio značajno snižen u drenirajućim limfnim čvorovima miševa kojima je indukovano EAE nakon tretmana TUDCA (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). U skladu sa tim rezultatima, u ovoj studiji je pokazano da UDCA u drenirajućim limfnim čvorovima imunizovanih DA pacova dovodi do značajno smanjene ekspresije iRNK za glavne efektorske citokine Th1 ($IFN\gamma$), odnosno Th17 (IL-17) odgovora, kao i do smanjene produkcije citokina (IL-12, IL-23) i transkripcionih faktora (T-bet) neophodnih za diferencijaciju ova dva ćelijska odgovora. UDCA je takođe dovela do značajno smanjene produkcije proinflamatornih citokina TNF

i IL-1 β , pri čemu IL-1 β učestvuje i u Th17 diferencijaciji. S druge strane, UDCA nije dovela do značajno smanjene ekspresije iRNK za Foxp3, transkripcijski faktor koji učestvuje u diferencijaciji T regulatornih ćelija, kao ni do smanjene ekspresije iRNK za TGF- β 1 koji predstavlja citokin Treg ćelija. Ovakav rezultat je u skladu sa nedavno publikovanim podacima koju pokazuju ulogu metabolizma žučnih kiselina u pomeranju ravnoteže između imunoregulatornih Treg ćelija i proinflamatornih Th17 ćelija ka Treg ćelijama (Hang i sar., 2019). Kako su Th1 i Th17 glavne efektorske ćelije odgovorne za patogenezu EAE, smanjena diferencijacija ovih ćelija, praćena smanjenom produkcijom njihovih efektorskih citokina, može da objasni povoljan efekat UDCA na klinički tok EAE. Naime, UDCA je dovela do poboljšanja kliničkog toka EAE, redukovala maksimalni i kumulativni skor, ali nije imala efekat na dan početka bolesti. Poslednji nalaz se razlikuje od rezultata studije na miševima gde je pokazano da TUDCA ima značajan efekat na dan početka EAE (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). Razlika u efektu UDCA/TUDCA na početak bolesti se može objasniti vremenskom razlikom u početku tretmana. Naime, u našem istraživanju životinje su tretirane UDCA od dana imunizacije do kraja eksperimenta, dok je u navedenom istraživanju TUDCA aplikovana u visokoj dozi dan pre indukcije EAE (500 mg/kg, intraperitonealno), nakon čega je primena TUDCA nastavljena svakodnevno u nižoj koncentraciji (Brucklacher-Waldert i sar., 2017). Značajan doprinos ove teze razumevanju imunoregulatornih mehanizama UDCA u EAE odnosi se na ispitivanje njenog efekta na ER stres u ovoj bolesti. Iako UDCA nije dovela do statistički značajnog sniženja markera ER stresa u odnosu na imunizovane DA pacove, odsustvo povećanja ekspresije markera ER stresa u drenirajućim limfnim čvorovima životinja obolelih od EAE koje su primile UDCA ukazuje da bi pozitivan efekat žučnih soli na neuroinflamaciju bar delom mogao biti posledica interakcije sa ER stresom/UPR u ćelijama imunskog sistema. Zanimljivo je da je UDCA značajno smanjila isecanje PARP, što ukazuje na inhibiciju procesa apoptoze u ćelijama imunskog sistema tokom indukcije EAE. Međutim, odustvo efekta UDCA na fosforilaciju MAP kinaza p38 i ERK, koje regulišu apoptozu, ukazuju da je anti-apoptotsko dejstvo UDCA u EAE nezavisno od modulacije MAP kinaza. Anti-apoptotski efekat UDCA na ćelije imunskog sistema bi mogao negativno da utiče na njeno anti-inflamatorno dejstvo u EAE, pa su stoga potrebna dalja istraživanja u tom pravcu. Treba naglasiti da se svi opisani efekti UDCA u ovom istraživanju se odnose na drenirajuće limfne čvorove imunizovanih pacova, ali i da tokom patogeneze EAE u CNS dolazi do reaktivacije autoreaktivnih T limfocita koji dalje pokreću neuroinflamaciju i dovode do oštećenja oligodendrocita i neurona i posledičnog razvoja bolesti (Constantinescu i sar., 2011). Pored dodatnog ispitivanja anti-inflamatornog i anti-Th1/Th17 efekta UDCA pokazanog u ovoj tezi, sposobnost GRP78/ATF6-zavisne indukcije da štiti oligodendrocite od inflamatornog oštećenja u EAE (Y. Hussien i sar., 2015; Stone i sar., 2018) zahteva dalja istraživanja efekata koje bi tretman neuroinflamacije žučnim solima mogao da ima direktno na rezidentne ćelije CNS.



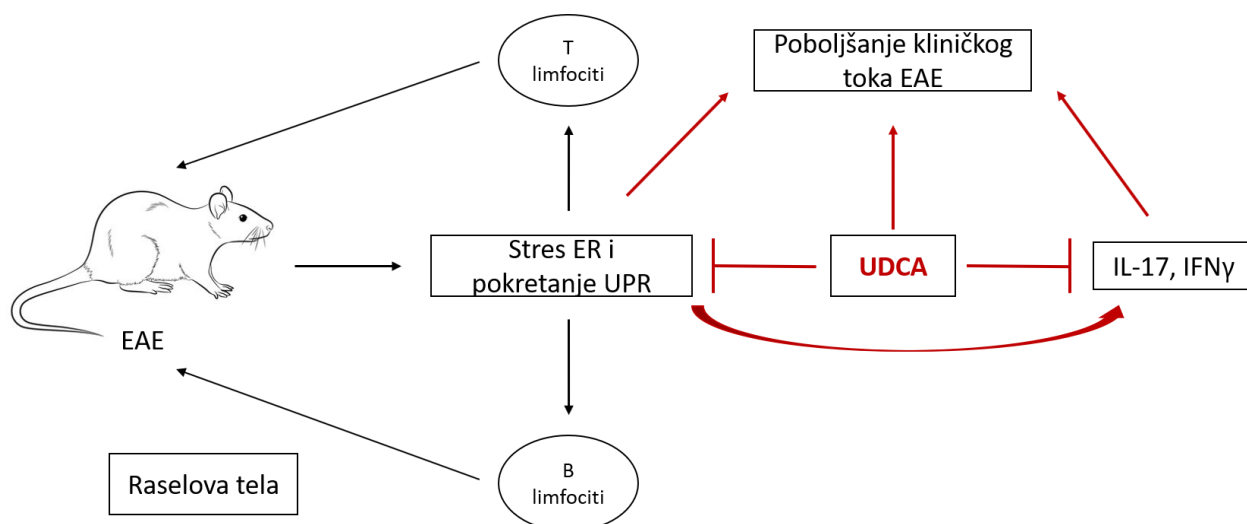
Šema 4: Potencijalni mehanizam protektivnog dejstva UDCA u EAE.

UDCA dovodi do smanjene produkcije proinflammatoryh citokina Th1 i Th17 ćelijskog odgovora, a najverovatniji mehanizam ovog dejstva je inhibicija aktivacije ER stresa i pokretanja UPR, što smanjuje diferencijaciju encefalitogenih Th1 i Th17 ćelija.

U skladu sa postavljenim ciljevima ove doktorske teze, a na osnovu dobijenih rezultata, mogu se izvesti sledeći zaključci:

1. Indukcija EAE dovodi do aktivacije ER stresa i kod pacova koji su podložni razvoju bolesti i kod onih koji su rezistentni ka razvoju kliničkih simptoma bolesti.
2. ER stres, u ćelijama imunskog sistema, predstavlja važan patogenetski faktor i stoga je značajna terapijska meta u neuroinflamaciji.
3. Inhibicija ER stresa dovodi do poboljšanja kliničkog toka EAE, a efekat je najverovatnije posredovan smanjenom produkcijom proinflamatornih citokina koji imaju značajnu ulogu u patogenezi EAE.

Dalja istraživanja uloge i modulacije ER stresa tokom patogeneze EAE mogu poboljšati sveukupno razumevanje na koji način dolazi do razvoja neuroinflamatornih bolesti i na koji način bi upravo modulacija ER stresa mogla doprineti njihovoj terapiji.



Šema 5: Uloga ER stresa u indukciji eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod pacova.

7 LITERATURA

- Almanza, A., Carlesso, A., Chintha, C., Creedican, S., Doultinos, D., Leuzzi, B., Samali, A. (2019). Endoplasmic reticulum stress signalling – from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal*, 286(2), 241-278.
- Amaral, J. D., Viana, R. J. S., Ramalho, R. M., Steer, C. J., & Rodrigues, C. M. P. (2009). Bile acids: regulation of apoptosis by ursodeoxycholic acid. *Journal of Lipid Research*, 50(9), 1721-1734.
- Axisa, P.-P., & Hafler, D. A. (2016). Multiple sclerosis: genetics, biomarkers, treatments. *Current Opinion in Neurology*, 29(3), 345-353.
- Badovinac, V., Mostarica-Stojković, M., Dinarello, C. A., & Stošić-Grujičić, S. (1998). Interleukin-1 receptor antagonist suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in rats by influencing the activation and proliferation of encephalitogenic cells. *Journal of Neuroimmunology*, 85(1), 87-95.
- Behan, P. O., & Chaudhuri, A. (2014). EAE is not a useful model for demyelinating disease. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 3(5), 565-574.
- Bellucci, A., Navarria, L., Zaltieri, M., Falarti, E., Bodei, S., Sigala, S., Spano, P. (2011). Induction of the unfolded protein response by α -synuclein in experimental models of Parkinson's disease. *Journal of Neurochemistry*, 116(4), 588-605.
- Bertolotti, A., Zhang, Y., Hendershot, L. M., Harding, H. P., & Ron, D. (2000). Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nature cell biology*, 2(6), 326-332.
- Bertram, L., & Tanzi, R. E. (2005). The genetic epidemiology of neurodegenerative disease. *The Journal of clinical investigation*, 115(6), 1449-1457.
- Bhargava, P., Smith, M. D., Mische, L., Harrington, E., Fitzgerald, K. C., Martin, K., Calabresi, P. A. (2020). Bile acid metabolism is altered in multiple sclerosis and supplementation ameliorates neuroinflammation. *The Journal of clinical investigation*, 130(7), 3467-3482.
- Braakman, I., & Hebert, D. N. (2013). Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 5(5), a013201-a013201.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1), 248-254.
- Brucklacher-Waldert, V., Ferreira, C., Stebegg, M., Fesneau, O., Innocentin, S., Marie, J. C., & Veldhoen, M. (2017). Cellular Stress in the Context of an Inflammatory Environment Supports TGF- β Independent T Helper-17 Differentiation. *Cell Reports*, 19(11), 2357-2370.
- Cash, J. G., Kuhel, D. G., Basford, J. E., Jaeschke, A., Chatterjee, T. K., Weintraub, N. L., & Hui, D. Y. (2012). Apolipoprotein E4 Impairs Macrophage Efferocytosis and Potentiates Apoptosis by Accelerating Endoplasmic Reticulum Stress. *Journal of Biological Chemistry*, 287(33), 27876-27884.
- Chaudhari, N., Talwar, P., Parimisetty, A., Lefebvre d'Hellencourt, C., & Ravanan, P. (2014). A Molecular Web: Endoplasmic Reticulum Stress, Inflammation, and Oxidative Stress. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8(1), e1281862.
- Chen, L., Bai, J., Peng, D., Gao, Y., Cai, X., Zhang, J., Wang, H. (2021). SZB120 Exhibits Immunomodulatory Effects by Targeting eIF2 α to Suppress Th17 Cell Differentiation. *The Journal of Immunology*, 206(5), 953-962.
- Chen, Y., Podojil, J. R., Kunjamma, R. B., Jones, J., Weiner, M., Lin, W., Popko, B. (2019). Sephin1, which prolongs the integrated stress response, is a promising therapeutic for multiple sclerosis. *Brain*, 142(2), 344-361.
- Clayton, B. L. L., & Popko, B. (2016). Endoplasmic reticulum stress and the unfolded protein response in disorders of myelinating glia. *Brain research*, 1648(Pt B), 594-602.
- Constantinescu, C. S., Farooqi, N., O'Brien, K., & Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British Journal of Pharmacology*, 164(4), 1079-1106.
- Corcos, D., Osborn, M. J., Matheson, L. S., Santos, F., Zou, X., Smith, J. A., Brüggemann, M. (2010). Immunoglobulin aggregation leading to Russell body formation is prevented by the antibody light chain. *Blood*, 115(2), 282-288.
- Cornejo, V. H., Pihán, P., Vidal, R. L., & Hetz, C. (2013). Role of the unfolded protein response in organ physiology: Lessons from mouse models. *IUBMB Life*, 65(12), 962-975.
- Cross, A. H., & Stark, J. L. (2005). Humoral immunity in multiple sclerosis and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunologic Research*, 32(1), 85-97.

- Cunnea, P., Mháille, A. N., McQuaid, S., Farrell, M., McMahon, J., & FitzGerald, U. (2011). Expression profiles of endoplasmic reticulum stress-related molecules in demyelinating lesions and multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 17(7), 808-818.
- Dai, R., Chen, R., & Li, H. (2009). Cross-talk between PI3K/Akt and MEK/ERK pathways mediates endoplasmic reticulum stress-induced cell cycle progression and cell death in human hepatocellular carcinoma cells. *Int J Oncol*, 34(6), 1749-1757.
- Dargahi, N., Katsara, M., Tselios, T., Androutsou, M.-E., De Courten, M., Matsoukas, J., & Apostolopoulos, V. (2017). Multiple Sclerosis: Immunopathology and Treatment Update. *Brain Sciences*, 7(7).
- Decourt, C., Galea, H. R., Sirac, C., & Cogné, M. (2004). Immunologic basis for the rare occurrence of true nonsecretory plasma cell dyscrasias. *Journal of Leukocyte Biology*, 76(3), 528-536.
- Delépine, M., Nicolino, M., Barrett, T., Golamaully, M., Mark Lathrop, G., & Julier, C. (2000). EIF2AK3, encoding translation initiation factor 2- α kinase 3, is mutated in patients with Wolcott-Rallison syndrome. *Nature Genetics*, 25(4), 406-409.
- Dendrou, C. A., Fugger, L., & Friese, M. A. (2015). Immunopathology of multiple sclerosis. *Nature Reviews Immunology*, 15(9), 545-558.
- Deng, J., Lu Phoebe, D., Zhang, Y., Scheuner, D., Kaufman Randal, J., Sonenberg, N., Ron, D. (2004). Translational Repression Mediates Activation of Nuclear Factor Kappa B by Phosphorylated Translation Initiation Factor 2. *Molecular and cellular biology*, 24(23), 10161-10168.
- Deslauriers, A. M., Afkhami-Goli, A., Paul, A. M., Bhat, R. K., Acharjee, S., Ellestad, K. K., Power, C. (2011). Neuroinflammation and Endoplasmic Reticulum Stress Are Coregulated by Crocin To Prevent Demyelination and Neurodegeneration. *The Journal of Immunology*, 187(9), 4788.
- Di Conza, G., & Ho, P.-C. (2020). ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity. *Cells*, 9(3), 695.
- Dumitrascu, O. M., Mott, K. R., & Ghiasi, H. (2014). A comparative study of experimental mouse models of central nervous system demyelination. *Gene Therapy*, 21(6), 599-608.
- Engin, F., Yermalovich, A., Nguyen, T., Hummasti, S., Fu, W., Eizirik, D. L., Hotamisligil, G. S. (2013). Restoration of the unfolded protein response in pancreatic β cells protects mice against type 1 diabetes. *Sci Transl Med*, 5(211), 211ra156.
- Fagone, P., & Jackowski, S. (2009). Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *Journal of Lipid Research*, 50, S311-S316.
- Fillatreau, S., Sweeney, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D., & Anderton, S. M. (2002). B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology*, 3(10), 944-950.
- Genain, C. P., & Hauser, S. L. (1996). Allergic Encephalomyelitis in Common Marmosets: Pathogenesis of a Multiple Sclerosis-like Lesion. *Methods*, 10(3), 420-434.
- Genç, K., Dona, D. L., & Reder, A. T. (1997). Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *The Journal of clinical investigation*, 99(11), 2664-2671.
- Glass, C. K., Saijo, K., Winner, B., Marchetto, M. C., & Gage, F. H. (2010). Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140(6), 918-934.
- Glatigny, S., & Bettelli, E. (2018). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 8(11).
- Goodall, J. C., Wu, C., Zhang, Y., McNeill, L., Ellis, L., Saudek, V., & Gaston, J. S. H. (2010). Endoplasmic reticulum stress-induced transcription factor, CHOP, is crucial for dendritic cell IL-23 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(41), 17698-17703.
- Görlach, A., Klappa, P., & Kietzmann, D. T. (2006). The Endoplasmic Reticulum: Folding, Calcium Homeostasis, Signaling, and Redox Control. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10), 1391-1418.
- Hang, S., Paik, D., Yao, L., Kim, E., Trinath, J., Lu, J., Huh, J. R. (2019). Bile acid metabolites control TH17 and Treg cell differentiation. *Nature*, 576(7785), 143-148.
- Harding, H. P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., & Ron, D. (2000). Regulated Translation Initiation Controls Stress-Induced Gene Expression in Mammalian Cells. *Molecular Cell*, 6(5), 1099-1108.
- Harding, H. P., Zhang, Y., & Ron, D. (1999). Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature*, 397(6716), 271-274.
- Hasegawa, H., Woods, C. E., Kinderman, F., He, F., & Lim, A. C. (2014). Russell body phenotype is preferentially induced by IgG mAb clones with high intrinsic condensation propensity: Relations between the biosynthetic events in the ER and solution behaviors in vitro. *mAbs*, 6(6), 1518-1532.

- Hattori, T., Ohoka, N., Hayashi, H., & Onozaki, K. (2003). C/EBP homologous protein (CHOP) up-regulates IL-6 transcription by trapping negative regulating NF-IL6 isoform. *FEBS Letters*, 541(1-3), 33-39.
- Hemmer, B., Nessler, S., Zhou, D., Kieseier, B., & Hartung, H.-P. (2006). Immunopathogenesis and immunotherapy of multiple sclerosis. *Nature Clinical Practice Neurology*, 2(4), 201-211.
- Heneka, M. T., Kummer, M. P., & Latz, E. (2014). Innate immune activation in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Immunology*, 14(7), 463-477.
- Heo, J.-N., Kim, D.-Y., Lim, S.-G., Lee, K., Suk, K., & Lee, W.-H. (2019). ER stress differentially affects pro-inflammatory changes induced by mitochondrial dysfunction in the human monocytic leukemia cell line, THP-1. *Cell Biology International*, 43(3), 313-322.
- Hetz, C., Chevet, E., & Oakes, S. A. (2015). Proteostasis control by the unfolded protein response. *Nature cell biology*, 17(7), 829-838.
- Hetz, C., & Saxena, S. (2017). ER stress and the unfolded protein response in neurodegeneration. *Nat Rev Neurol*, 13(8), 477-491.
- Hillary, R. F., & FitzGerald, U. (2018). A lifetime of stress: ATF6 in development and homeostasis. *Journal of Biomedical Science*, 25(1), 48.
- Høglund, R. A., & Maghazachi, A. A. (2014). Multiple sclerosis and the role of immune cells. *World journal of experimental medicine*, 4(3), 27-37.
- Hoozemans, J. J. M., van Haastert, E. S., Eikelenboom, P., de Vos, R. A. I., Rozemuller, J. M., & Scheper, W. (2007). Activation of the unfolded protein response in Parkinson's disease. *Biochem Biophys Res Commun*, 354(3), 707-711.
- Hoozemans, J. J. M., Veerhuis, R., Van Haastert, E. S., Rozemuller, J. M., Baas, F., Eikelenboom, P., & Scheper, W. (2005). The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica*, 110(2), 165-172.
- Hu, P., Han, Z., Couvillon, A. D., & Exton, J. H. (2004). Critical Role of Endogenous Akt/IAPs and MEK1/ERK Pathways in Counteracting Endoplasmic Reticulum Stress-induced Cell Death. *Journal of Biological Chemistry*, 279(47), 49420-49429.
- Huang, F. (2021). Ursodeoxycholic acid as a potential alternative therapeutic approach for neurodegenerative disorders: Effects on cell apoptosis, oxidative stress and inflammation in the brain. *Brain, Behavior, & Immunity - Health*, 18, 100348.
- Huitinga, I., Damoiseaux, J. G. M. C., Döpp, E. A., & Dijkstra, C. D. (1993). Treatment with anti-CR3 antibodies ED7 and ED8 suppresses experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats. *European Journal of Immunology*, 23(3), 709-715.
- Hussien, Y., Cavener, D. R., & Popko, B. (2014). Genetic inactivation of PERK signaling in mouse oligodendrocytes: Normal developmental myelination with increased susceptibility to inflammatory demyelination. *Glia*, 62(5), 680-691.
- Hussien, Y., Podojil, J. R., Robinson, A. P., Lee, A. S., Miller, S. D., & Popko, B. (2015). ER Chaperone BiP/GRP78 Is Required for Myelinating Cell Survival and Provides Protection during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Neurosci*, 35(48), 15921-15933.
- Jung, T. W., & Choi, K. M. (2016). Pharmacological Modulators of Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(2), 192.
- Junjappa, R. P., Patil, P., Bhattarai, K. R., Kim, H.-R., & Chae, H.-J. (2018). IRE1 α Implications in Endoplasmic Reticulum Stress-Mediated Development and Pathogenesis of Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, 9.
- Kamarehei, M., Kabudanian Ardestani, S., Firouzi, M., Zahednasab, H., Keyvani, H., & Harirchian, M. H. (2019). Increased expression of endoplasmic reticulum stress-related caspase-12 and CHOP in the hippocampus of EAE mice. *Brain Research Bulletin*, 147, 174-182.
- Kilkenny, C., Browne, W. J., Cuthill, I. C., Emerson, M., & Altman, D. G. (2010). Improving Bioscience Research Reporting: The ARRIVE Guidelines for Reporting Animal Research. *PLoS biology*, 8(6), e1000412.
- Kim, I., Xu, W., & Reed, J. C. (2008). Cell death and endoplasmic reticulum stress: disease relevance and therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery*, 7(12), 1013-1030.
- Koch, G. L. E. (1990). The endoplasmic reticulum and calcium storage. *BioEssays*, 12(11), 527-531.
- Kopito, R. R., & Sitia, R. (2000). Aggresomes and Russell bodies. *EMBO reports*, 1(3), 225-231.
- Kuerten, S., & Lehmann, P. V. (2011). The immune pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis: lessons learned for multiple sclerosis? *Journal of interferon & cytokine*

- research : the official journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research, 31(12), 907-916.
- Lamkanfi, M., Kalai, M., & Vandenabeele, P. (2004). Caspase-12: an overview. *Cell Death & Differentiation*, 11(4), 365-368.
- Lassmann, H. (2001). Classification of demyelinating diseases at the interface between etiology and pathogenesis. *Current Opinion in Neurology*, 14(3).
- Lassmann, H., & Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathologica*, 133(2), 223-244.
- Lee, A.-H., Heidtman, K., Hotamisligil, G. S., & Glimcher, L. H. (2011). Dual and opposing roles of the unfolded protein response regulated by IRE1 α and XBP1 in proinsulin processing and insulin secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(21), 8885-8890.
- Lei, K., & Davis, R. J. (2003). JNK phosphorylation of Bim-related members of the Bcl2 family induces Bax-dependent apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2432-2437.
- Li, G., Mongillo, M., Chin, K.-T., Harding, H., Ron, D., Marks, A. R., & Tabas, I. (2009). Role of ERO1 α -mediated stimulation of inositol 1,4,5-triphosphate receptor activity in endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *The Journal of cell biology*, 186(6), 783-792.
- Li, J., Ni, M., Lee, B., Barron, E., Hinton, D. R., & Lee, A. S. (2008). The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity and stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell death and differentiation*, 15(9), 1460-1471.
- Li, J., Wang, J. J., Yu, Q., Wang, M., & Zhang, S. X. (2009). Endoplasmic reticulum stress is implicated in retinal inflammation and diabetic retinopathy. *FEBS Letters*, 583(9), 1521-1527.
- Lin, C.-C., & Edelson, B. T. (2017). New Insights into the Role of IL-1 β in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis and Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*, 198(12), 4553-4560.
- Lin, W., Bailey, S. L., Ho, H., Harding, H. P., Ron, D., Miller, S. D., & Popko, B. (2007). The integrated stress response prevents demyelination by protecting oligodendrocytes against immune-mediated damage. *The Journal of clinical investigation*, 117(2), 448-456.
- Lin, W., Harding, H. P., Ron, D., & Popko, B. (2005). Endoplasmic reticulum stress modulates the response of myelinating oligodendrocytes to the immune cytokine interferon-gamma. *The Journal of cell biology*, 169(4), 603-612.
- Lin, W., Kemper, A., Dupree, J. L., Harding, H. P., Ron, D., & Popko, B. (2006). Interferon- γ inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress. *Brain*, 129(5), 1306-1318.
- Lin, W., & Lin, Y. (2010). Interferon- γ inhibits central nervous system myelination through both STAT1-dependent and STAT1-independent pathways. *Journal of Neuroscience Research*, 88(12), 2569-2577.
- Lin, W., & Stone, S. (2015). The unfolded protein response in multiple sclerosis. *Frontiers in Neuroscience*, 9.
- Lin, W., & Stone, S. (2020). Unfolded protein response in myelin disorders. *Neural Regeneration Research*, 15(4).
- Lin, Y., Huang, G., Jamison, S., Li, J., Harding, H. P., Ron, D., & Lin, W. (2014). PERK activation preserves the viability and function of remyelinating oligodendrocytes in immune-mediated demyelinating diseases. *The American journal of pathology*, 184(2), 507-519.
- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., & Vass, K. (1988). Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *The American journal of pathology*, 130(3), 443-454.
- Lyons, J.-A., San, M., Happ, M. P., & Cross, A. H. (1999). B cells are critical to induction of experimental allergic encephalomyelitis by protein but not by a short encephalitogenic peptide. *European Journal of Immunology*, 29(11), 3432-3439.
- Mahmoudi Aliabadi, P., Al-Qaisi, K., Jani, P. K., Honjo, K., Klemm, U., Lee, K.-H., . . . Kubagawa, H. (2023). Enhanced Mott cell formation linked with IgM Fc receptor (Fc μ R) deficiency. *European Journal of Immunology*, 53(7), 2250315.
- Maldonado, J. E., Brown, A. L., Bayrd, E. D., & Pease, G. L. (1966). Cytoplasmic and intranuclear electron-dense bodies in the myeloma cell. *Archives of Pathology*, 81(6), 484-500.

- Martin, M. D. P., & Monson, N. L. (2007). Potential role of humoral immunity in the pathogenesis of multiple sclerosis (MS) and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *FBL*, 12(7), 2735-2749.
- Martinovic, T., Vidicevic, S., Ciric, D., Bumbasirevic, V., Stanojevic, Z., Tasic, J., . . . Kravic-Stevovic, T. (2023). The presence of Mott cells in the lymph nodes of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Histochemistry and Cell Biology*.
- Mattioli, L., Anelli, T., Fagioli, C., Tacchetti, C., Sitia, R., & Valetti, C. (2006). ER storage diseases: a role for ERGIC-53 in controlling the formation and shape of Russell bodies. *Journal of Cell Science*, 119(12), 2532-2541.
- Maurel, M., Chevet, E., Tavernier, J., & Gerlo, S. (2014). Getting RIDD of RNA: IRE1 in cell fate regulation. *Trends in Biochemical Sciences*, 39(5), 245-254.
- Mc Guire, C., Prinz, M., Beyaert, R., & van Loo, G. (2013). Nuclear factor kappa B (NF- κ B) in multiple sclerosis pathology. *Trends in Molecular Medicine*, 19(10), 604-613.
- McFarland, H. F., & Martin, R. (2007). Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nature Immunology*, 8(9), 913-919.
- Meares, G. P., Liu, Y., Rajbhandari, R., Qin, H., Nozell, S. E., Mobley, J. A., . . . Benveniste, E. N. (2014). PERK-dependent activation of JAK1 and STAT3 contributes to endoplasmic reticulum stress-induced inflammation. *Molecular and cellular biology*, 34(20), 3911-3925.
- Mh  ille, A. N., McQuaid, S., Windebank, A., Cunnea, P., McMahon, J., Samali, A., & FitzGerald, U. (2008). Increased Expression of Endoplasmic Reticulum Stress-Related Signaling Pathway Molecules in Multiple Sclerosis Lesions. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 67(3), 200-211.
- Mileti  , T., Kova  evi  -Jovanovi  , V., Vuji  , V., Stanojevi  , S., Miti  , K., Lazarevi  -Macanovi  , M., & Dimitrijevi  , M. (2007). Reactive oxygen species (ROS), but not nitric oxide (NO), contribute to strain differences in the susceptibility to experimental arthritis in rats. *Immunobiology*, 212(2), 95-105.
- Morishima, N., Nakanishi, K., Takenouchi, H., Shibata, T., & Yasuhiko, Y. (2002). An Endoplasmic Reticulum Stress-specific Caspase Cascade in Apoptosis: cytochrome c-independent activation of caspase-9 by caspase-12. *Journal of Biological Chemistry*, 277(37), 34287-34294.
- Ng, X., Sadeghian, M., Heales, S., & Hargreaves, I. P. (2019). Assessment of Mitochondrial Dysfunction in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Models of Multiple Sclerosis. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(20).
- N   Fhlathartaigh, M., McMahon, J., Reynolds, R., Connolly, D., Higgins, E., Counihan, T., & Fitzgerald, U. (2013). Calreticulin and other components of endoplasmic reticulum stress in rat and human inflammatory demyelination. *Acta Neuropathologica Communications*, 1, 37-37.
- Oakes, S. A., & Papa, F. R. (2015). The Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Human Pathology. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 10(1), 173-194.
- Okuda, Y., Sakoda, S., Fujimura, H., Saeki, Y., Kishimoto, T., & Yanagihara, T. (1999). IL-6 plays a crucial role in the induction phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 101(2), 188-196.
- Omar, I., Lapenna, A., Cohen-Daniel, L., Tirosh, B., & Berger, M. (2016). Schlafen2 mutation unravels a role for chronic ER stress in the loss of T cell quiescence. *Oncotarget*, 7(26), 39396-39407.
- Omura, T., Asari, M., Yamamoto, J., Oka, K., Hoshina, C., Maseda, C., Shimizu, K. (2013). Sodium tauroursodeoxycholate prevents paraquat-induced cell death by suppressing endoplasmic reticulum stress responses in human lung epithelial A549 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 432(4), 689-694.
- Oshitari, T., Hata, N., & Yamamoto, S. (2008). Endoplasmic reticulum stress and diabetic retinopathy. *Vascular health and risk management*, 4(1), 115-122. doi:10.2147/vhrm.2008.04.01.115
- Pelc, S., De Maertelaere, E., & Denolin-Reubens, R. (2008). CSF Cytology of Acute Viral Meningitis and Meningoencephalitis. *European Neurology*, 20(2), 95-102.
- Perry, V. H., Nicoll, J. A. R., & Holmes, C. (2010). Microglia in neurodegenerative disease. *Nature Reviews Neurology*, 6(4), 193-201.
- Plastini, M. J., Desu, H. L., & Brambilla, R. (2020). Dynamic Responses of Microglia in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 14.

- Pyrko, P., Schönthal, A. H., Hofman, F. M., Chen, T. C., & Lee, A. S. (2007). The Unfolded Protein Response Regulator GRP78/BiP as a Novel Target for Increasing Chemosensitivity in Malignant Gliomas. *Cancer Research*, 67(20), 9809-9816.
- Rangachari, M., & Kuchroo, V. K. (2013). Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology. *Journal of Autoimmunity*, 45, 31-39.
- Ransohoff, R. M., Kivisäkk, P., & Kidd, G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*, 3(7), 569-581.
- Reimold, A. M., Iwakoshi, N. N., Manis, J., Vallabhajosyula, P., Szomolanyi-Tsuda, E., Gravallesse, E. M., Glimcher, L. H. (2001). Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature*, 412(6844), 300-307.
- Ribourtout, B., & Zandecki, M. (2015). Plasma cell morphology in multiple myeloma and related disorders. *Morphologie*, 99(325), 38-62.
- Robinson, A. P., Harp, C. T., Noronha, A., & Miller, S. D. (2014). Chapter 8 - The experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) model of MS: utility for understanding disease pathophysiology and treatment. In D. S. Goodin (Ed.), *Handbook of Clinical Neurology* (Vol. 122, pp. 173-189): Elsevier.
- Ron, D., & Walter, P. (2007). Signal integration in the endoplasmic reticulum unfolded protein response. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(7), 519-529.
- Ruggiano, A., Foresti, O., & Carvalho, P. (2014). Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *The Journal of cell biology*, 204(6), 869-879.
- Ryno, L. M., Wiseman, R. L., & Kelly, J. W. (2013). Targeting unfolded protein response signaling pathways to ameliorate protein misfolding diseases. *Current opinion in chemical biology*, 17(3), 346-352.
- Sadeghian, M., Mastrolia, V., Rezaei Haddad, A., Mosley, A., Mullali, G., Schiza, D., . . . Smith, K. J. (2016). Mitochondrial dysfunction is an important cause of neurological deficits in an inflammatory model of multiple sclerosis. *Scientific Reports*, 6(1), 33249.
- Scherer, D. C., Brockman, J. A., Chen, Z., Maniatis, T., & Ballard, D. W. (1995). Signal-induced degradation of I kappa B alpha requires site-specific ubiquitination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 92(24), 11259.
- Schröder, M., & Kaufman, R. J. (2005). The mammalian unfolded protein response. *Annual Review of Biochemistry*, 74(1), 739-789.
- Schuck, S., Prinz, W. A., Thorn, K. S., Voss, C., & Walter, P. (2009). Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of cell biology*, 187(4), 525-536.
- Schwarz, D. S., & Blower, M. D. (2016). The endoplasmic reticulum: structure, function and response to cellular signaling. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 73(1), 79-94.
- Shaffer, A. L., Shapiro-Shelef, M., Iwakoshi, N. N., Lee, A.-H., Qian, S.-B., Zhao, H., Staudt, L. M. (2004). XBP1, Downstream of Blimp-1, Expands the Secretory Apparatus and Other Organelles, and Increases Protein Synthesis in Plasma Cell Differentiation. *Immunity*, 21(1), 81-93.
- Shen, J., Chen, X., Hendershot, L., & Prywes, R. (2002). ER Stress Regulation of ATF6 Localization by Dissociation of BiP/GRP78 Binding and Unmasking of Golgi Localization Signals. *Developmental Cell*, 3(1), 99-111.
- Soldani, C., & Scovassi, A. I. (2002). Poly(ADP-ribose) polymerase-1 cleavage during apoptosis: An update. *Apoptosis*, 7(4), 321-328.
- Sprenkle, N. T., Sims, S. G., Sánchez, C. L., & Meares, G. P. (2017). Endoplasmic reticulum stress and inflammation in the central nervous system. *Molecular neurodegeneration*, 12(1), 42-42.
- Stefflerl, A., Brehm, U., & Linington, C. (2000, 2000/). *The myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG): a model for antibody-mediated demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis*. Paper presented at the Advances in Research on Neurodegeneration, Vienna.
- Stern, J. N. H., Yaari, G., Vander Heiden, J. A., Church, G., Donahue, W. F., Hintzen, R. Q., O'Connor, K. C. (2014). B cells populating the multiple sclerosis brain mature in the draining cervical lymph nodes. *Science Translational Medicine*, 6(248), 248ra107-248ra107.
- Stone, S., Wu, S., Jamison, S., Durose, W., Pallais, J. P., & Lin, W. (2018). Activating transcription factor 6a deficiency exacerbates oligodendrocyte death and myelin damage in immune-mediated demyelinating diseases. *Glia*, 66(7), 1331-1345.

- Sukhorukov, V. N., Khotina, V. A., Bagheri Ekta, M., Ivanova, E. A., Sobenin, I. A., & Orekhov, A. N. (2020). Endoplasmic Reticulum Stress in Macrophages: The Vicious Circle of Lipid Accumulation and Pro-Inflammatory Response. *Biomedicines*, 8(7).
- Susanne, G., Katrien, L. d. G., Bernhard, G., & Robert, W. (2004). Antibodies against glycosylated native MOG are elevated in patients with multiple sclerosis. *Neurology*, 63(12), 2381.
- Szegezdi, E., Logue, S. E., Gorman, A. M., & Samali, A. (2006). Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis. *EMBO Rep*, 7(9), 880-885.
- Tabas, I., & Ron, D. (2011). Integrating the mechanisms of apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress. *Nature cell biology*, 13(3), 184-190.
- Tang, G., Minemoto, Y., Dibling, B., Purcell, N. H., Li, Z., Karin, M., & Lin, A. (2001). Inhibition of JNK activation through NF- κ B target genes. *Nature*, 414(6861), 313-317.
- Taylor, J. P., Hardy, J., & Fischbeck Kenneth, H. (2002). Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Science*, 296(5575), 1991-1995.
- Thaxton, J. E., Wallace, C., Riesenberger, B., Zhang, Y., Paulos, C. M., Beeson, C. C., Li, Z. (2017). Modulation of Endoplasmic Reticulum Stress Controls CD4(+) T-cell Activation and Antitumor Function. *Cancer Immunology Research*, 5(8), 666-675.
- Todd, D. J., McHeyzer-Williams, L. J., Kowal, C., Lee, A.-H., Volpe, B. T., Diamond, B., Glimcher, L. H. (2009). XBP1 governs late events in plasma cell differentiation and is not required for antigen-specific memory B cell development. *Journal of Experimental Medicine*, 206(10), 2151-2159.
- Trapp, B. D., & Nave, K.-A. (2008). Multiple Sclerosis: An Immune or Neurodegenerative Disorder? *Annual Review of Neuroscience*, 31(1), 247-269.
- Tsunoda, I., Libbey, J. E., Kuang, L.-Q., Terry, E. J., & Fujinami, R. S. (2005). Massive Apoptosis in Lymphoid Organs in Animal Models for Primary and Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *The American journal of pathology*, 167(6), 1631-1646.
- Uddin, M. S., Tewari, D., Sharma, G., Kabir, M. T., Barreto, G. E., Bin-Jumah, M. N., Ashraf, G. M. (2020). Molecular Mechanisms of ER Stress and UPR in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Molecular Neurobiology*, 57(7), 2902-2919.
- Urano, F., Wang, X., Bertolotti, A., Zhang, Y., Chung, P., Harding Heather, P., & Ron, D. (2000). Coupling of Stress in the ER to Activation of JNK Protein Kinases by Transmembrane Protein Kinase IRE1. *Science*, 287(5453), 664-666.
- Usui, M., Yamaguchi, S., Tanji, Y., Tominaga, R., Ishigaki, Y., Fukumoto, M., Ishihara, H. (2012). Atf6 α -null mice are glucose intolerant due to pancreatic β -cell failure on a high-fat diet but partially resistant to diet-induced insulin resistance. *Metabolism - Clinical and Experimental*, 61(8), 1118-1128.
- Valentin-Torres, A., Savarin, C., Hinton, D. R., Phares, T. W., Bergmann, C. C., & Stohlman, S. A. (2016). Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation*, 13(1), 46.
- van den Berg, R., Haenen, G. R. M. M., van den Berg, H., & Bast, A. (2007). Transcription factor NF- κ B as a potential biomarker for oxidative stress. *British Journal of Nutrition*, 86(S1), S121-S127.
- Vang, S., Longley, K., Steer, C. J., & Low, W. C. (2014). The Unexpected Uses of Urso- and Tauroursodeoxycholic Acid in the Treatment of Non-liver Diseases. *Global Advances in Health and Medicine*, 3(3), 58-69.
- Villar, L. M., García-Sánchez, M. I., Costa-Frossard, L., Espiño, M., Roldán, E., Páramo, D., Álvarez-Cermeño, J. C. (2012). Immunological Markers of Optimal Response to Natalizumab in Multiple Sclerosis. *Archives of Neurology*, 69(2), 191-197.
- von Kutzleben, S., Pryce, G., Giovannoni, G., & Baker, D. (2017). Depletion of CD52-positive cells inhibits the development of central nervous system autoimmune disease, but deletes an immune-tolerance promoting CD8 T-cell population. Implications for secondary autoimmunity of alemtuzumab in multiple sclerosis. *Immunology*, 150(4), 444-455.
- Vukmanović, S., Stojković, M. M., & Lukić, M. L. (1989). Experimental autoimmune encephalomyelitis in "low" and "high" interleukin 2 producer rats: I. Cellular basis of induction. *Cellular Immunology*, 121(2), 237-246.
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The Unfolded Protein Response: From Stress Pathway to Homeostatic Regulation. *Science*, 334(6059), 1081.
- Wang, X., & Ron, D. (1996). Stress-Induced Phosphorylation and Activation of the Transcription Factor CHOP (GADD153) by p38 MAP Kinase. *Science*, 272(5266), 1347-1349.

- Way, S. W., & Popko, B. (2016). Harnessing the integrated stress response for the treatment of multiple sclerosis. *The Lancet Neurology*, 15(4), 434-443.
- Wensheng, L., Yifeng, L., Jin, L., Ali, G. F., Sharon, W. W., Benjamin, C., Brian, P. (2013). Oligodendrocyte-Specific Activation of PERK Signaling Protects Mice against Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience*, 33(14), 5980.
- Willenborg, D. O., & Prowse, S. J. (1983). Immunoglobulin-deficient rats fail to develop experimental allergic encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology*, 5(2), 99-109.
- Wiseman, R. L., Mesgarzadeh, J. S., & Hendershot, L. M. (2022). Reshaping endoplasmic reticulum quality control through the unfolded protein response. *Molecular Cell*, 82(8), 1477-1491.
- Woo, C. W., Cui, D., Arellano, J., Dorweiler, B., Harding, H., Fitzgerald, K. A., Tabas, I. (2009). Adaptive suppression of the ATF4-CHOP branch of the unfolded protein response by toll-like receptor signalling. *Nature cell biology*, 11(12), 1473-1480.
- Xue, X., Piao, J.-H., Nakajima, A., Sakon-Komazawa, S., Kojima, Y., Mori, K., . Nakano, H. (2005). Tumor Necrosis Factor alpha; (TNFalpha) Induces the Unfolded Protein Response (UPR) in a Reactive Oxygen Species (ROS)-dependent Fashion, and the UPR Counteracts ROS Accumulation by TNFalpha. *Journal of Biological Chemistry*, 280(40), 33917-33925.
- Yamazaki, H., Hiramatsu, N., Hayakawa, K., Tagawa, Y., Okamura, M., Ogata, R., Kitamura, M. (2009). Activation of the Akt-NF-κB Pathway by Subtilase Cytotoxin through the ATF6 Branch of the Unfolded Protein Response1. *The Journal of Immunology*, 183(2), 1480-1487.
- Yue, Y., Stanojlovic, M., Lin, Y., Karsenty, G., & Lin, W. (2019). Oligodendrocyte-specific ATF4 inactivation does not influence the development of EAE. *Journal of Neuroinflammation*, 16(1), 23.
- Zhang, H., Jin, Z., & Cui, R. (2014). Russell body gastritis/duodenitis: A case series and description of immunoglobulin light chain restriction. *Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology*, 38(5), e89-e97.
- Ziemssen, T., & Ziemssen, F. (2005). The role of the humoral immune system in multiple sclerosis (MS) and its animal model experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *Autoimmunity Reviews*, 4(7), 460-467.

PRILOZI

Publikovani radovi iz ove doktorske disertacije

Martinovic T, **Vidicevic S**, Ciric D, Bumbasirevic V, Stanojevic Z, Tasic J, Petricevic S, Isakovic A, Martinovic VC, Drndarevic N, Trajkovic V, Kravic-Stevovic T. The presence of Mott cells in the lymph nodes of rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Histochem Cell Biol.* 2023 Nov 12. doi: 10.1007/s00418-023-02252-y.

Vidičević-Novaković S, Stanojević Ž. Molecular mechanisms involved in endoplasmic reticulum stress development - what do we know up today. *Medicinski podmladak.* 2024; 75(2). doi: 10.5937/mp75-44722

Biografija autora

Dr Sašenka Vidičević Novaković je rođena 8. 5. 1989. godine u Beogradu. Medicinski fakultet Univerziteta u Beogradu je upisala 2008. godine, a diplomirala u julu 2014. godine sa prosečnom ocenom 9,75. Od treće godine studija bila je redovni demonstrator na predmetu medicinska biohemija. Za vreme studija dr Vidičević Novaković je napisala više studentskih naučno-istraživačkih radova, od kojih je jedan bio nagrađen nagradom Univerziteta za najbolji studentski naučno-istraživački rad u okviru grupe medicinskih fakulteta. Pore toga, dr Vidičević Novaković je aktivno bila uključena u rad Centra za stručni i naučno-istraživački rad studenata.

Po završetku studija, školske 2014/2015 godine, upisuje doktorske akademske studije iz molekularne medicine na Medicinskom fakultetu Univerziteta u Beogradu. Za saradnika u nastavi, za užu naučnu oblast Medicinska i klinička biohemija izabrana je u februaru 2015. godine. U zvanje asistenta, za istu oblast, izabrana je 2017. godine. Tokom svog saradničkog i asistentskog staža, dr Vidičević Novaković je bila mentor većeg broja studentskih naučno-istraživačkih radova koji su prezentovani na kongresima u zemlji i inostranstvu.

Specijalističke studije iz laboratorijske medicine je upisala 2016. godine, a specijalistički ispit je položila u oktobru 2022. godine.

Naučno-istraživački rad dr Vidičević Novaković je realizovan je kroz projekte finansirane od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije. Prvo kroz projekat pod nazivom „Modulacija signalnih puteva koji kontrolišu intracelularni energetske balans u terapiji tumora i neuro-imuno-endokrinih poremećaja“ (evidencioni broj III 41025, rukovodilac prof. dr Vladimir Trajković), a potom kroz projekat Medicinskog fakulteta, Univerziteta u Beogradu broj 451-03-47/2023-01/200110. U okviru svog naučno-istraživačkog rada dr Sašenka Vidičević Novaković dva puta boravila na Institutu za neuroimunologiju i Multiplu sklerozu u Centru za Molekularnu Neurobiologiju, Hamburg (Zentrum für molekulare Neurobiologie Hamburg) u laboratoriji prof. dr Stefana Golda. Prvi put u okviru bilateralne saradnje Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu i Univerzitetske klinike Ependorf u Hamburgu, a potom u okviru programa Nemačke agencije za akademsku razmenu (Deutsche Akademische Austauschdienst - DAAD).

Dr Sašenka Vidičević Novaković je koautor na 12 publikacija objavljenih u celini u časopisima indeksiranim u *Institute of Science Index* (SCI) bazi podataka. Ukupna citiranost svih radova je 60, a Hiršov, *h-index* iznosi 5 prema indeksnoj bazi SCOPUS.

Prilog 1.

Izjava o autorstvu

Ime i prezime autora: **Sašenka Vidičević Novaković**

Broj indeksa: **MM 01/14**

Izjavljujem

da je doktorska disertacija pod naslovom

Uloga stresa endoplazmatskog retikuluma u indukciji eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod pacova

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.11.2023.

Prilog 2.

Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada

Ime i prezime autora: **Sašenka Vidičević Novaković**

Broj indeksa: **MM-01/14**

Studijski program: **Molekularna medicina**

Naslov rada: **Uloga stresa endoplazmatskog retikuluma u indukciji eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod pacova**

Mentor: **profesor dr Željka Stanojević**

Komentor: **profesor dr Vladimir Trajković**

izjavljujem da je štampana verzija mog doktorskog rada istovetna elektronskoj verziji koju sam predala radi pohranjivanja u **Digitalnom repozitorijumu Univerziteta u Beogradu**.

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

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

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.11.2023.

Prilog 3.

Izjava o korišćenju

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

Uloga stresa endoplazmatskog retikuluma u indukciji eksperimentalnog autoimunskog encefalomijelitisa kod pacova

koja je moje autorsko delo.

Disertaciju sa svim prilogima predala sam u elektronskom formatu pogodnom za trajno arhiviranje.

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

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

(Molimo da zaokružite samo jednu od šest ponuđenih licenci, kratak opis licenci dat je na poledini lista).

Potpis doktoranda

U Beogradu, 15.11.2023.

1. Autorstvo. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence, čak i u komercijalne svrhe. Ovo je najslobodnija od svih licenci.
2. Autorstvo – nekomercijalno. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
3. Autorstvo – nekomercijalno – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela. U odnosu na sve ostale licence, ovom licencom se ograničava najveći obim prava korišćenja dela.
4. Autorstvo – nekomercijalno – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca ne dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.
5. Autorstvo – bez prerada. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, bez promena, preoblikovanja ili upotrebe dela u svom delu, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela.
6. Autorstvo – deliti pod istim uslovima. Dozvoljavate umnožavanje, distribuciju i javno saopštavanje dela, i prerade, ako se navede ime autora na način određen od strane autora ili davaoca licence i ako se prerada distribuira pod istom ili sličnom licencom. Ova licenca dozvoljava komercijalnu upotrebu dela i prerada.

Slična je softverskim licencama, odnosno licencama otvorenog koda.