

UNIVERZITET U BEOGRADU
BIOLOŠKI FAKULTET

Milan B. Stefanović

Povezanost potencijalno regulatornih varijanti u
genima *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* i ekspresije
odabranih ciljnih gena sa nastankom i težinom
multiple skleroze

doktorska disertacija

Beograd, 2024

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF BIOLOGY

Milan B. Stefanović

Association of potentially regulatory variants in
genes *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* and expression of
selected target genes with onset and severity of
multiple sclerosis

doctoral dissertation

Belgrade, 2024

Mentor:

dr Maja Živković, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

Članovi komisije:

dr Aleksandra Stanković, naučni savetnik

Institut za nuklearne nauke „Vinča”, Institut od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju,
Univerzitet u Beogradu

dr Goran Brajušković, redovni profesor, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu

dr Evica Dinčić, redovni profesor, Medicinski fakultet, Univerzitet odbrane u Beogradu

Datum odbrane: _____

ZAHVALNICA

Zahvaljujem Republici Srbiji za finansiranje rada na doktoratu u periodu od 2017-2022. putem programa stipendiranja studenata doktorskih akademskih studija.

Zahvaljujem dr Aleksandri Stanković, naučnoj savetnici, kao rukovodiocu projekta osnovnih istraživanja „Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti” i teme „Genetska osnova hronične inflamacije” kroz koje su finansirana istraživanja čiji su rezultati ušli u ovaj doktorat i zbog privilegije da radim na ovim projektima. Takođe sam zahvalan na brojnim korisnim savetima tokom izrade doktorata i brzom i temeljnom pregledu i analizi doktorata.

Zahvaljujem profesoru dr Goranu Brajuškoviću na tome što me je preporučio dr Maji Živković, naučnoj savetnici, rukovodiocu Laboratorije za radiobiologiju i molekularnu genetiku, Instituta za nuklearne nauke „Vinča”. Bez te preporuke ne bih bio ovde danas. Zahvaljujem na izuzetnoj posvećenosti pri analizi teksta doktorata.

Zahvaljujem svojoj mentorki dr Maji Živković što je prihvatila preporuku i svesrdno se trudila da me nauči i sprovede kroz sve korake izrade doktorata. Svestan sam da nisam bio najlakši saradnik, ali sve dobre stvari u životu su obično teške. Trudio sam se da budem dobar najviše što je moguće i da prihvatim njene savete i nadam se da sam naučio mnogo.

Zahvaljujem dr Dušanki Savić-Pavićević, koordinatoru modula doktorskih studija koje sam pohađao, na ekpeditivnim i profesionalnim interakcijama.

Hvala profesorki dr Evici Dinčić, i njenim saradnicima sa Vojnomedicinske akademije, koja je pokrenula istraživanja genetike multiple skleroze u Srbiji i kroz dugogodišnju saradnju sa našom grupom kreirala bazu uzoraka i podataka neophodnih za realizaciju ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem dr Ivani Kolić i dr Ljiljani Stojković na temeljnom radu u prikuljanju i organizaciji podataka.

Zahvaljujem dr Ivanu Životiću, mom kumu, što me je obučio da radim u laboratoriji i što mi je pomogao oko izrade prvog rada.

Zahvaljujem dr Ljiljani Stojković na krucijalnoj asistenciji u razumevanju statistike i na pomoći tokom izrade drugog rada doktorske disertacije.

Zahvaljujem dr Ani Đorđević na uputstvima vezanih za obavljanje ELISA-e.

Zahvaljujem Kristini Mitrović na deljenju krucijalnih informacija oko procedure doktorata i na nesalomivom sportskom duhu.

Pogotovo zahvaljujem svim kolegama i rukovodstvu koji su imali dovoljno poveranja u mene da mi konstantno zadaju brojne bitne zadatke nevezane za doktorat, kroz koje sam mnogo naučio, hvala Vam na ukazanom poverenju.

Posebno hvala mojoj nevesti, Nataši Mačak, što mi je ulepšala život. Zahvaljujući tebi ljubavi imam još jedan razlog osim laboratorijskog rada da ustanem iz kreveta.

Sažetak

Prethodne studije i analiza algoritmima za poboljšanje procene uzročnosti genetičkih varijanti su ukazale da su varijante *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs12946510 najverovatnije uzročne varijante, u hromozomskim lokusima u kojima se nalaze, za nastanak multiple skleroze (MS). Ciljevi doktorske disertacije su obuhvatili analizu asocijacije navedenih varijanti i ekspresije odabranih ciljnih gena sa nastankom i težinom MS kao i procenu efekta genetičkih varijanti na regulaciju ekspresije ciljnih gene kod pacijenata i zdravih ispitanika iz populacije Srbije. Za ostvarivanje ciljeva primenjene su eksperimentalne metode za genotipizaciju genetičkih varijanti i ekspresije gena koje koriste TaqMan® tehnologiju, a naknadnom statističkom analizom su ispitane asocijacije i korelacije genetičkih i kliničkih podataka. Od tri ispitane varijante, *IL2RA* rs2104286 je povezana sa nastankom MS-a, gde ređi alel G ispoljava protektivan efekat. Detektovan je kombinovani efekat varijante *HLA-DRB1*15:01* i *IFI30* rs11554159 ređeg homozigotnog genotipa AA na progresiju MS-a. Ekspresija gena *ORMDL3* i *GSDMB* u MĆPK je smanjena kod pacijenata sa relapsno remitentnim tokom MS u odnosu na zdrave ispitanike. Utvrđena je asocijacija varijante *IKZF3* rs12946510, koja je prethodno definisana kao ona koja modifikuje nivo transkripcije određenih gena u različitim tkivima, sa ekspresijom gena *ORMDL3* i *GSDMB* u MĆPK pacijenata sa relapsno remitentnim tokom MS. Rezultati ukazuju na kombinovane efekte genetičkih varijanti i imunomodulatorne terapije na promene u ekspresiji gena u MĆPK pacijenata sa relapsno remitentnim MS-om. Diskusijom rezultata sugerisani su molekularni mehanizmi koji potencijalno objašnjavaju detektovane asocijacije i predloženi pravci za buduća istraživanja.

Ključne reči: Multipla skleroza, tačkasti polimorfizmi, uzročne varijante, ekspresija gena, *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3*, *ORMDL3*, *GSDMB*, *IKZF3*, *HLA-DRB1*15:01*

Naučna oblast: Molekularna biomedicina

Uža naučna oblast: Molekularna biologija multiple skleroze

Abstract:

Previous studies and algorithm analysis for improved assessment of genetic variant causality have pointed to variants *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 and *IKZF3* rs12946510 as the most probable causal variants, in their chromosomal loci, for the development of multiple sclerosis (MS). Goals of the doctoral dissertation encompass the analysis of the association of specified variants and expression of the selected target genes with MS development and severity, as well as the assessment of genetic variant's effect on the expression of target genes in patients and healthy controls from Serbian population. To achieve the dissertation goals, experimental methods for genotyping and gene expression analysis based on TaqMan® technology were applied, and subsequent statistical analysis was used to assess association and correlations of genetic and clinical data. Of the three investigated variants, *IL2RA* rs2104286 is associated with MS risk, with the rare G allele being protective. A combined effect of variant *HLA-DRB1*15:01* and rare *IFI30* rs11554159 homozygote, AA, on MS progression was detected. Expression of genes *ORMDL3* and *GSDMB* in PBMCs is diminished in relapsing remitting MS patients in comparison to healthy controls. The variant *IKZF3* rs12946510, which was previously defined as a gene expression modifying variant in different tissues, was associated with expression of *ORMDL3* and *GSDMB* in PBMCs of MS patients with relapsing remitting MS. Results show combined effects of genetic variants and immunomodulatory therapy on gene expression changes in PBMCs of patients with relapsing remitting MS. Discussion of the results suggests molecular mechanisms which potentially explain the detected associations and future directions of scientific research were proposed.

Key words: Multiple sclerosis, SNP, causal variants, gene expression, *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3*, *ORMDL3*, *GSDMB*, *IKZF3*, *HLA-DRB1*15:01*

Scientific field: Molecular biomedicine

Scientific subfield: Genetics of multiple sclerosis

SKRAĆENICE

ANOVA – Analiza varijanse (eng. *Analysis of variance*)

BCR – B ćelijski receptor (eng. *B cell receptor*)

CD – Klaster diferencijacije (eng. *Cluster of differentiation*)

CNS – Centralni nervni sistem

CRISPR – Klasterovane ujednačeno razmaknote kratke palindromske sekvence (eng. *Clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)

CST – Cerebrospinalna tečnost

Ct – Broj ciklusa u kome se dostiže vrednost fluorescencije koja je veća od predeterminisane vrednosti (eng. *Threshold cycle*)

EAE – Eksperimentalni autoimuni encefalomijelitis

EDSS – Proširena skala stanja disabiliteta (eng. *Expanded disability status scale*)

EDTA - Etilendiamidtetraacetatna kiselina

ELISA – Imuno apsorpcija kuplovana sa enzimom (eng. *Enzyme-linked immunosorbent assay*)

eQTL – Lokus kvantitativne ekspresije (eng. *Expression quantitative trait loci*)

ER – Endoplazmatični retikulum

FOXO1 - Transkripcioni regulator sa domenom glave viljuške O1 (eng. *Forkhead Box O1*)

FoxP3 – Transkripcioni regulator sa domenom glave viljuške P3 (eng. *Forkhead box P3*)

GILT – Interferonom gama inducibilna tiolna reduktaza (eng. *Gamma inducible thiol reductase*)

GRB7 – Protein vezan za receptor za faktor rasta 7 (eng. *Growth factor receptor-bound protein*)

GTE_x – Baza podataka interakcija genotip-tkivna ekspresija gena (eng. *Genotype-tissue expression consortium*)

GWAS – Studija genomske asocijacije (eng. *Genome wide association study*)

HDAC – Histonska deacetilaza 1 (eng. *Histone deacetylase 1*)

HLA – Ljudski leukocitni antigen (eng. *Human leucocyte antigen*)

IFI30 – Interferon gama inducibilni protein 30 (eng. *Interferon gamma inducible protein 30*)

IFN γ – Interferon gama (eng. *Interferon gamma*)

IKZF3 – Član IKAROS cink-prsti familije 3 (eng. *IKAROS family zinc finger 3*)

IL – Interleukin (eng. *Interleukin*)

IL2RA – Alfa subjedinica receptora za interleukin-2 (eng. *Interleukin-2 alpha subunit*)

IL7RA – Alfa subjedinica receptora za interleukin-7 (eng. *Interleukin-7 alpha subunit*)

IMSGC – Međunarodni konzorcijum za genetiku multiple skleroze (eng. *International multiple sclerosis genetic consortium*)

JAK – Janus kinaza (eng. *Janus kinase*)

KMB – Krvno moždana berijera

KDS - 3-ketodihidrosfingozina

KEGG – Kjoto enciklopedija gena i genoma

LD – neravnoteža vezanosti (eng. *Linkage disequilibrium*)

MBG – Adekvatno za primenu u molekularnoj biologiji (eng. *Molecular biology grade*)

MBP – Mijelinski bazni protein (eng. *Myelin basic protein*)

MČPK – Mononuklearne ćelije periferne krvi

MEF2C – Transkripcioni faktor pojačivač miocita 2C (eng. *Myocyte Enhancer Factor 2C*)

MHC – Glavni kompleks histokompatibilnosti (eng. *Major histocompatibility complex*)

Mi-2/NuRD – Komplex za remodelovanje nukleozoma i deacetilaciju

MOG – Mijelinski oligodendrocitni glikoprotein (eng. *Myelin oligodendrocyte glycoprotein*)

MPV17L2 – Protein sličan MPV17 2 (eng. *Mpv17-like protein 2*)

MS – Multipla skleroza

MSSS – Skor težine multiple skleroze (eng. *Multiple sclerosis severity score*)

MTA2 – Protein asociran sa metastazom 2 (eng. *Metastasis-associated protein 2*)

NFAT – Jedarni faktor aktiviranih T ćelija (eng. *Nuclear factor of activated T cells*)

NF-κB – Jedarni faktor kapa B (eng. *Nuclear factor kappa B*)

NK ćelije – Urođene ćelije ubice (eng. *Natural killer cells*)

NLRP3 – Protein koji sadrži pirinski domen NLR familije 3 (eng. *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*)

PCR – Lančana reakcija polimeraze (eng. *Polymerase chain reaction*)

PICS – Probabilistička interpretacija uzročnih SNP-ova (eng. *Probabilistic interpretation of causal SNPs*)

PLP – Mijelinski proteolipidni protein (eng. *Myelin proteolipid protein*)

PPMS – Primarno progresivna multiple skleroza

RRMS – Relapsno remitentna multipla skleroza

S1P – Sfingozin-1-fosfat

SDS – Natrijum dodecil sulfat (eng. *Sodium dodecyl sulfate*)

SERCA2 – Kalcijum ATPaza sarkoplazmatičnog/endoplazmatičnog retikuluma 2 (eng. *Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 2*)

SIN3 – Komplex transkripcionih regulatora homolog Sin proteinima

SNP – Tačkasti polimorfizmi (eng. *Single nucleotide polymorphism*)

SOCE - Rezervom Ca^{2+} indukovana ulaska Ca^{2+} (eng. *Ca^{2+} store operated Ca^{2+} entry*)

SPMS – Sekundarno progresivna multiple skleroza

SPT – Serin palmitoil koenzim A transferaza (eng. *Serine palmitoyl coenzyme A transferase*)

sQTL – Locus kvantitativnog splajsovanja (eng. *Splicing quantitative trait loci*)

STAT – Transducer signala i aktivator transkripcije (eng. *Signal transducers and activators of transcription*)

TCR – T ćelijski receptor (eng. *T cell receptor*)

TNF α – Faktor nekroze tumora alfa (eng. *Tumor necrosis factor alpha*)

Treg – Regulatorne T ćelije

TRIS – Tris(hidroksimetil)aminometan

ZBP2 – Protein koji se vezuje za zonu pelucidu 2 (eng. *Zona pellucida binding protein 2*)

SADRŽAJ

1. UVOD.....	1
1.1. Neuropatologija multiple skleroze.....	1
1.2. Čelije adaptivnog imunskog sistema u multiploj sklerozi.....	2
1.3. Kliničke karakteristike multiple skleroze.....	2
1.4. Epidemiologija multiple skleroze.....	3
1.5. Genetika multiple skleroze.....	4
1.6. Značaj tačkastih genetičkih varijanti u multiploj sklerozi i procena njihove uzročne veze sa MS-om.....	5
1.7. Uticaj tačkastih genetičkih polimorfizama na ekspresiju gena u multiploj sklerozi.....	6
1.8. Gen <i>IL2RA</i> i rs2104286.....	7
1.9. Gen <i>IFI30</i> i rs11554159.....	8
1.10. Hromozomski region 17q12-21 i rs12946510.....	10
1.10.1. Gen <i>ORMDL3</i>	11
1.10.2. Gen <i>GSDMB</i>	12
1.10.3. Gen <i>IKZF3</i>	13
2. HIPOTEZA I CILJEVI.....	14
3. MATERIJAL I METODE.....	14
3.1. Učesnici.....	14
3.2. Metode.....	15
3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi primenom fenol-hloroformske metode..	15
3.2.2. Genotipizacija primenom PCR alelske diskriminacije bazirane na TaqMan® tehnologiji.....	16
3.2.3. Izdvajanje MČPK iz periferne krvi.....	16
3.2.4. Izolacija RNK iz MČPK primenom TRI Reagent-a.....	17
3.2.5. Analiza koncentracije i čistoće izolovane DNK i RNK na NanoDrop™ 1000 mikrovolumenskom UV spektrofotometru.....	17
3.2.6. Fluorimetrijska analiza koncentracije RNK na Invitrogen™ Qubit™ 3 fluorimetru.....	18
3.2.7. Digestija genomske DNK iz RNK uzorka i reverzna transkripcija iRNK.....	18
3.2.8. Analiza nivoa ekspresije ciljnih iRNK primenom TaqMan® bazirane relativne kvantifikacije.....	19
3.2.9. Izolacije plazme iz periferne krvi.....	19

3.2.10. Analiza koncentracije proteina od interesa u plazmi primenom „sendvič” ELISA-e.....	20
3.2.11. Statistička obrada podataka.....	20
4. REZULTATI.....	21
4.1. Demografske i kliničke karakteristike učesnika.....	21
4.2. Asocijacija genetičkih varijanti <i>IL2RA</i> rs2104286, <i>IFI30</i> rs11554159 i <i>IKZF3</i> rs12946510 sa rizikom za nastanak multiple skleroze.....	25
4.3. Asocijacija genetičkih varijanti <i>IL2RA</i> rs2104286, <i>IFI30</i> rs11554159 i <i>IKZF3</i> rs12946510 sa kliničkim parametrima multiple skleroze.....	27
4.4. Asocijacija nivoa relativne ekspresije iRNK <i>ORMDL3</i> , <i>GSDMB</i> i <i>IKZF3</i> iz MČPK sa MS-om.....	29
4.5. Asocijacija genotipova <i>IKZF3</i> rs12946510, <i>IL2RA</i> rs2104286 i <i>IFI30</i> rs11554159 sa reletivnom ekspresijom gena <i>ORMDL3</i> , <i>GSDMB</i> i <i>IKZF3</i> u MČPK pacijenata sa MS-om i zdravih kontrola.....	31
4.6. Korelacija nivoa relativne ekspresije iRNK gena <i>ORMDL3</i> , <i>GSDMB</i> i <i>IKZF3</i> iz MČPK sa kliničkim i demografskim parametrima u grupi pacijenata sa MS-om.....	35
4.7. Kombinovani uticaj <i>IKZF3</i> rs12946510 genotipa, pola, faze bolesti i Interferon β terapije na nivo relativne ekspresije iRNK gena <i>ORMDL3</i> , <i>GSDMB</i> i <i>IKZF3</i> u MČPK.....	36
4.8. Asocijacija koncentracije CD25 u krvnoj plazmi sa MS i statusom Interferon β terapije.....	39
4.9. Korelacija koncentracije CD25 u krvnoj plazmi sa kliničkim parametrima MS.....	40
5. DISKUSIJA.....	41
6. ZAKLJUČCI.....	48
7. LITERATURA.....	49

1. UVOD

Multipla skleroza (MS) je hronična i progresivna bolest centralnog nervnog sistema (CNS). Elementi adaptivnog imunskog sistema napadaju mijelinski omotač i oligodendrocite pacijenta izazivajući demijelinizaciju, neurološku disfunkciju, smrt neurona, neurodegeneraciju, i posledično, neurološki deficit (Lassmann, 2018). MS je vodeći uzrok netraumatičnog neurološkog deficita kod mladih punoletnika, sa procenjenom globalnom populacijom pacijenata od 2.8 miliona u 2020., i sa rastućom globalnom prevalencom u zemljama u razvoju i razvijenim zemljama (Browne i sar., 2014; Waltom i sar., 2020). Izuzetan zdravstveni i ekonomski teret koji MS nameće i činjenica da je MS još uvek neizlečiva bolest ističe značaj istraživanja faktora koji dovode do njenog nastanka i progresije.

1.1. Neuropatologija multiple skleroze

MS je prevashodno izazvana infiltracijom ćelija i efektorskih proteina adaptivnog imunskog sistema u CNS koji imaju proinflamatorni efekat i njihovom reakcijom na proteine mijelinskog omotača na aksonima i u oligodendrocitima (Lassmann 2018). Uobičajene mete autoimunskog napada su mijelinski oligodendrocitni proteini (MOG), mijelin bazni protein (MBP) i mijelinski proteolipidni protein (PLP) (Bielekova i sar., 2004; Riedhammer i Weissert, 2015). Ovaj vid autoimunskog odgovora dovodi do karakteristične histopatologije MS-a sa mestima imunske aktivnosti i demijelinizacije zvane MS lezije (plak ili ožiljak su prihvaćeni sinonimi). Pored demijelinizacije (Lucchinetti i sar., 2000), u lezijama se odigravaju procesi inflamacije (Frischer i sar., 2009), aksonalne degeneracije (Frischer i sar., 2009; Haider i sar., 2016), smrt oligodendrocita (Lucchinetti i sar., 2000), reaktivne glioze (Tanuma i sar., 2006) i, posledično, neurodegeneracije (Tanuma i sar., 2006; Frischer i sar., 2009; Haider i sar., 2016). Takođe, lezije su okarakterisane narušavanjem krvno moždane barijere (KMB) na nivou lezije i u okolnom CNS tkivu (Vos i sar., 2005). Imunski infiltrati periferne krvi u MS lezijama su predominantno T limfociti, sa najvećim udelom citotoksičnih CD8+ T ćelija, dok su B ćelije i plazma ćelije takođe prisutne, ali u manjem broju (Frischer et al., 2009). Lezije mogu sadržati i lokalne ćelije mikroglije kao i infiltrate makrofaga (Frischer et al., 2009). Shodno stepenu fagocitoze koja se dešava zbog aktivnosti aktivirane mikroglije i makrofaga iz periferne krvi, lokacije fagocitoznih ćelija u leziji, kao i intenzitetu demijelizacije lezije se mogu podeliti na aktivne, mešovite i neaktivne (Kuhlmann i sar., 2017). Aktivne lezije karakteriše demijelinizacija, difuzna i intenzivna infiltracija makrofaga i mikroglije, kao i difuzni i perivaskularni infiltrati T ćelija. Mešovite lezije imaju manju količinu limfocitnih infiltrata unutar lezija i poseduju karakterističnu perifernu distribuciju makrofaga i mikroglije. Neaktivne lezije imaju vrlo mali imunskih infiltrat, glijalne ožiljke i primetni gubitak aksona. Mešovite i neaktivne lezije su karakteristične za pogresivne forme bolesti. Remijelinizacija se može zapaziti u svakom tipu lezije, ali je kapacitet za remijelinizaciju generalno oslabljen u neaktivnim lezijama (Kuhlmann i sar., 2017). U CNS-u individua sa MS-om odigrava se i difuzna degeneracija aksona izvan lezija, koja dovodi do uvećanog broja patološki izmenjenih aksona u beloju masi, koja izgleda kao da nije izmenjena (eng. *normal appearing white matter*) (Kutzelnigg i sar., 2005).

Oštećenja mijelinskog omotača aksona se mogu odigrati usled efekata na nivou samog aksona ili putem eliminacije oligodendrocita (Lucchinetti i sar., 2000; Kuhlmann i sar., 2017). Inflamacija je glavni izazivač demijelinizacije u lezijama MS-a. Inflatorna sredina lezije toksičnim citokinima (Selmaj i sar., 1991; Vartanian i sar., 1995), reaktivnim jedinjenjima kiseonika (Diaz-Sanchez i sar., 2006; Fischer i sar., 2012) i mijelin specifičnim antitelima (Lucchinetti i sar., 2000) dovodi do ciljane fagocitoze, što je glavni efektorski mehanizam oštećenja mijelina aksona ili oligodendrocita. Osim patogenog efekta inflamacije u CNS-u, treba uzeti u obzir da je inflamacija, pogotovo sa stanovišta

dopremanja i aktiviranja fagocitoznih ćelija, takođe neophodna za remijelinizaciju (Cunha i sar., 2020).

Uspešnost remijelinizacije aksona u leziji zavisi od diferencijacije ćelija prekursora oligodendrocita što može biti poremećeno proinformativnim signalima na nivou lezija (Kirby i sar., 2019). Kod pacijenata sa MS-om kapacitet za remijelinizaciju slabi vremenom usled gubitka kapaciteta za diferencijaciju oligodendrocitnih prekursora ćelija što je izazvano starenjem (Neumann i sar., 2019).

Oštećenja i gubici aksona su karakteristični za neuropatologiju MS lezija (Trapp i sar., 1998; Frischer i sar., 2009). Sa imunopatološkog stanovišta, ovo se dešava posredstvom inflamatorne sredine na demijelizovane aksone ili putem direktne aktivnosti ćelijskih aktera adaptivnog imunskog sistema. Inflamatorna sredina promoviše oštećenja aksona putem oslobađanja metaloproteinaza matriksa, proteolitičkih enzima, azot monoksida (Diaz-Sanchez i sar., 2006) i reaktivnih vrsta kiseonika od strane gljivnih i imunskih ćelija (Diaz-Sanchez i sar., 2006; Fischer i sar., 2012).

1.2. Ćelije adaptivnog imunskog sistema u multiploj sklerozi

MS je prevashodno bolest remećenja mehanizama i homeostaze adaptivnog imunskog sistema i generalno se smatra bolešću najviše definisanom aktivnošću CD4+ T ćelija (Lassmann i sar., 2018).

CD4+ Th1 i Th17 subfenotipovi ćelija su zastupljeni u MS-u (Kaskow i Baecher-Allan, 2018). CD4+ T ćelije koje su autoreaktivne na mijelin, migriraju kroz narušenu KMB (Frischer i sar., 2009; Bahbouhi i sar., 2009) i limfociti putem interakcije T ćelijskog receptora (eng. *T Cell Receptor*, TCR) i antigena prezentovanom u MHC II (eng. *Major Histocompatibility Complex*) kompleksu prepoznaju epitope mijelina prezentovane od strane ćelija poput dendritskih (Mundt i sar., 2019) i mikroglije (Matyszak i sar., 1999). Nakon prezentacije antigena, CD4+ T ćelije oslobađaju efektorske citokine poput interferona γ (IFN γ) i faktora nekroze tumora α (TNF α) (Ford i sar., 1996; Kruglov i sar., 2011; Kirby i sar., 2019) koji ispoljavaju štetni efekat u CNS-u.

Osim pomoćničkih CD4+ T limfocita, CD8+ T limfociti i B limfociti mogu igrati bitne uloge u patogenezi MS-a (Cencioni i sar., 2021; Mockus et al., 2021). Pretpostavljeni mehanizam kojim CD8+ ćelije doprinose patogenezi MS-a (Mockus i sar., 2021) je da mijelin specifične CD8+ T ćelije migriraju kroz KMB u CNS-u (Ifergan i sar., 2011), prepoznaju epitope prezentovane od strane MHC I na CNS ćelijama (Huseby i sar., 2001) i vrše njihovo ubijanje (van Nierop i sar., 2017). Efektorske B ćelije specifične za mijelin prolaze kroz krvno moždanu barijeru i proizvode mijelin specifična antitela koja se vezuju za mijelinske proteina i promovišu demijelinizaciju (Quintana i sar., 2012a; Palanichamy i sar., 2014; Liu i sar., 2017). Mijelin specifične B ćelije takođe prezentuju mijelinske antigene pomoćničkim CD4+ T ćelijama (Harp i sar., 2008).

U MS-u uloga CD4+ CD25+ FoxP3+ T regulatornih limfocita (Treg) je supresija efektorske aktivnosti limfocita (Viglietta i sar., 2004) i promocija remijelinizacije (Dombrowski i sar., 2017). Treg ćelije MS pacijanata imaju inhibiranu imunosupresivnu aktivnost (Martinez-Forero i sar., 2008; Derakshani i sar., 2021) i imaju smanjen kapacitet za proliferaciju u odnosu na ćelije zdravih osoba (Viglietta i sar., 2004).

1.3. Kliničke karakteristike multiple skleroze

MS je okarakterisana pojavljivanjem lezija u širokom dijapazonu lokacija u mozgu ili kičmenoj moždini, što može izazvati široki spektar neuroloških simptoma i deficita koji se pojavljuju u MS-u (Charil i sar., 2003), kao i različitim vremenskim profilima akumulacije nivoa neuroloških deficita

koji definiše progresiju bolesti (Roxburgh i sar., 2005; Lubin i sar., 2014). Diseminacija lezija u kontekstu mesta u CNS i vremenu se smatra glavnim dijagnostičkim kriterijumom za MS (McDonald i sar., 2001; Polman i sar., 2001; Polman i sar., 2011; Thompson i sar., 2018). Većina pacijenata sa MS-om ima bifaznu kliničku sliku definisanu periodima naglog porasta trenutnog neurološkog deficita, tj. relapsima, i periodima oporavka od akutnog neurološkog deficita nakon relapsa, tj. remisija (Lublin i sar., 1996; Lublin i sar., 2014).

Pacijenti sa MS-om ispoljavaju tri klinički definisana temporalna profila akumulacije neurološkog deficita: relapsno remitentni (RRMS), sekundarno progresivni (SPMS) i primarno progresivni (PPMS) (Lublin i sar., 1996; Lublin i sar., 2014). Oko 85% individua (Klineova i Lublin., 2018) sa dijagnostikovanom MS-om započinu sa RRMS formom bolesti, koju karakterišu periodi relapsa praćeni periodima remisija (Lublin i sar., 1996). U ovoj formi progresija, tj. akumulacija neurološkog deficita, dešava se kontinuiranom neuroloških simptoma u periodu nakon remisije (Lublin i sar., 1996). Remisije mogu da podrazumevaju i potpuni nestanak neuroloških simptoma zapaženih tokom relapsa (Lublin i sar., 1996). Većina pacijenata sa RRMS će u periodu od 20 godina nakon dijagnoze razviti SPMS formu bolesti (Klineova i Lublin., 2018). SPMS forma je okarakterisana kontinuiranom akumulacijom neurološkog deficita sa mogućnošću pojave platoa u akumulaciji deficita, uz potencijalne sporadične relapse i remisije (Lublin i sar., 1996; Lublin i sar., 2014). Kod manjeg broja pacijenata, oko 10-20%, bolest započinje sa PPMS formom (Klineova i Lublin., 2018). Ova forma MS-a okarakterisana je kontinuiranom akumulacijom disabiliteta od samog početka bolesti, sa mogućnosti privremenih platoa neurološkog deficita, poboljšanja neuropatoloških simptoma i odsustvom relapsa (Lublin i sar., 1996; Lublin i sar., 2014).

Prihvaćeni standard u dijagnostici MS-a definisan je McDonaldovim kriterijumima (McDonald i sar., 2001; Polman i sar., 2005; Polman i sar., 2011; Thompson i sar., 2018). Standardi za dijagnozu RRMS podrazumevaju utvrđivanje barem 2 relapsa koji se mogu asociirati sa lezijama sa objektivnim kliničkim dokazima ili jedno kliničko pogoršanje sa nalazima antitela u cerebrospinalnoj tečnosti (CST) (Polman i sar., 2011; Thompson i sar., 2018). PPMS se dijagnostifikuje kod pacijenata sa 1 godinom progresije disabiliteta koji imaju barem 2 od 3 dodatna kriterijuma: jedna ili više lezija u mozgu, 2 ili više lezija u kičmenoj moždini, prisustvo antitela u CST (Polman i sar., 2011; Thompson i sar., 2018).

1.4. Epidemiologija multiple skleroze

Generalni trend geografske distribucije MS-a podrazumeva veću učestalost MS-a u populacijama lociranim na severnoj hemisferi (Browne i sar., 2014; Walton i sar., 2020; www.atlasofms.org). Ovaj fenomen poznat je naučnoj zajednici nekoliko decenija unazad i razvijen je veći broj hipoteza o tome šta dovodi do ove pojave. Vodeća hipoteza koja objašnjava ovu distribuciju je uticaj insolacije na produkciju vitamina D koja kada je manja povećava rizik za nastanak MS-a (Sintzel i sar., 2018). Jedan od vodećih faktora spoljne sredine koji utiče na rizik za nastanak MS-a je metabolisana količina vitamina D (Munger i sar., 2006; Sintzel i sar., 2018), što je pod uticajem količine UV zračenja apsorbovanog kožom (Armas i sar., 2007; Sintzel i sar., 2018).

Globalno, žene imaju 2 puta veći rizik da razviju MS (Waltom i sar., 2020). Osim MS-a, veći broj autoimunskih inflamatornih poremećaja ima veću učestalost u ženskom delu populaciji (Ngo i sar., 2014). Žene generalno ispoljavaju prve simptome ranije nego muški pacijenti, sa izuzetkom pacijenata sa PPMS (Miclea i sar., 2019). Veći broj hipoteza baziranih na biološkim razlikama između polova predložene su za objašnjavanje ove diskrepance u učestalostima uključujući hipoteze bazirane na potencijalnom uticaju polnih hormona i varijanti na polnim hromozomima (Ngo i sar., 2014).

Multipla skleroza je bolest mlađe životne dobi u kojoj većina pacijenata ispoljava prve simptome u periodu od 18-40 godine života (Romero-Pinel i sar., 2022; Prosperini i sar., 2022) sa globalnom

prosečnom starosti na početka bolesti od oko 32 godine (www.atlasofms.org). Poslednjih nekoliko decenija zabeležen je globalni trend porasta starosti pri dijagnozi u većem broju različitih populacija (Romero-Pinel i sar., 2022; Prosperini i sar., 2022; Habbestad i sar., 2024).

Prema MS Atlasu, globalna prevalenca MS-a je 37 na 100000 ljudi, sa evropskom prevalansom od 137 na 100000. MS Atlas deli zemlje sa stanovništva učestalosti na 100000 stanovnika na sledeći način: 0-25 su zemlje ekstremno niske učestalosti, 26-50 niske učestalosti, 51-100 srednje učestalosti, 101-200 visoke učestalosti i preko 201 kao zemlje ekstremno visoke učestalosti. Prema Atlasu, Srbija ima učestalost od 136 po 100000 stanovnika čineći je zemljom visoke učestalosti na nivou Evropskog proseka (www.atlasofms.org).

1.5. Genetika multiple skleroze

Multipla skleroza je kompleksno oboljenje u čijoj osnovi leži interakcija faktora sredine i većeg broja genetičkih varijanti. Nasledni efekat u nastanku MS-a je pokazan na srodničkim i blizanačkim studijama sa procenjenom heritabilnošću bolesti od oko 50% (O’Gorman i sar., 2012; Boles i sar., 2023). Doprinos genetičke komponente bolesti u nastanku i progresiji MS-a je značajan i uključuje, ali nije ograničen, na epistazu, poligenost, inkompletnu penetrantnost i efekat okoline (Zuvich i sar., 2009; Patsopoulos 2018). Genetički lokus koji je najjače i najrepliciranije asociran sa rizikom za MS je *HLA* (eng. *Human Leukocyte Antigen*) koji kodira β lanac MHC II, a alel *HLA-DRB1*15* asociran je sa povećanim rizikom u velikom broju populacija (Schmidt i sar., 2007; Zuvich i sar., 2009; Patsopoulos i sar., 2018). Preciznije, nosilac alela *HLA-DRB1*15* ima odnos šansi (eng. *Odds Ratio*, OR) od 2-4 za nastanak MS u odnosu na nosioce drugih alela (Schmidt i sar., 2007; IMSCG 2007; IMSCG 2011a; IMSCG 2019). To je potvrđeno i istraživanjem u populaciji pacijenata iz Srbije, gde je utvrđen OR od oko 2.09 za nastanak MS (Živković i sar., 2009). Decenijama su glavni dokazi genetičke asocijacije sa MS-om bili vezani za MHC II (Schmidt i sar., 2007), sa potencijalnim modifikujućim efektom u MHC I regionima (Fogdell-Hahn i sar., 2000; Harbo i sar., 2004), implicirajući MS kao bolest čija je genetička osnova predominantno definisana sa stanovništva antigen prezentacije. Iako je jos 1994-e godine pretpostavljeno da će se definisati genetičke varijante izvan gena koji kodiraju MHC I ili II (Ebers i Sadovnick, 1994) pristup izučavanja gena kandidata nije dao dovoljno jasne rezultate asocijacije pojedinačnih varijanti van HLA lokusa sa nastankom MS. U cilju boljeg razumevanja genetike MS-a bilo je neophodno dopuniti pristup izučavanju genetičke komponente, kao što je urađeno za sve kompleksne bolesti čoveka, primenom novog koncepta i poboljšanjem tehnološkog pristupa (Patsopoulos, 2018). Česta bolest – česta varijanta (eng. *Common disease – Common variant*) je pristup u definisanju genetičke osnove kompleksnih bolesti koji polazi od pretpostavke da je genetička predispozicija uslovljena umerenim efektom većeg broja relativno čestih alela na većem broju lokusa sa kojima je rizik za nastanak bolesti asociran (Reich i Lander, 2001). Meta-analize srodničkih studija impliciraju da je MS bolest čija je heritabilnost pod umerenim uticajem *HLA-DRB1*15:01* i manjim uticajem većeg broja lokusa (O’Gorman i sar., 2012). Početak ere studija asocijacije na celokupnom genomu (eng. *Genome Wide Association Studies*, GWASs) uveo je novi koncept ispitivanja asocijacije genetičkih varijanti sa osobinama i bolestima bez prethodnog postavljanja hipoteze o njihovoj biološkoj ulozi. Rezultatima prvih GWASs definisane su dodatne varijante van HLA koje su asocirane sa MS-om, u *IL2RA* (eng. *Interleukin-2 Receptor Alpha*) i u *IL7R* (IMSCG, 2007). Validnost rezultata GWASs zavisi od veličine uzorka i potvrde rezultata u nezavisnom uzorku, što je dovelo do formiranja međunarodnog konzorcijuma za genetiku multiple skleroze (eng. *International Multiple Sclerosis Genetic Consortium*, IMSCG) koji je, kroz nekoliko GWAS-ova za MS, do sada identifikovao preko 200 autozomalnih ne-HLA lokusa asociranih sa rizikom za nastanak MS-a (IMSCG 2019). Ovi lokusi su asocirani sa imunskim funkcijama poput citokinske signalizacije (IMSCG 2007; De Jager i sar., 2009; IMSCG 2011a; IMSCG 2019), regulacijom transkripcije imunskih gena (De Jager i sar., 2009; IMSCG 2013), migracijom limfocita (IMSCG 2013; IMSCG 2019), transdukcijom sekundarnih signala (IMSCG

2011a; IMSSGC 2013) i regulacijom aktivacije T limfocita (IMSSGC 2011a; IMSSGC 2019). Izvan jedarnog genoma, mitohondrijalni haplotipovi asociirani su sa rizikom za nastanak MS-a (Tranah i sar., 2015). U poređenju sa studijama koje izučavaju asocijaciju genetičkih varijanti sa nastankom MS-a relativno je malo genetičkih studija koje su izučavale asocijaciju sa kliničkim parametrima, težinom i progresijom bolesti, ali je pokazano da se varijante koje utiču na težinu nalaze ne samo u lokusima asociiranim sa imunskom funkcijom već u lokusima asociiranim sa CNS komponentom progresije bolesti (IMSSGC 2011b; IMSSGC 2023).

1.6. Značaj tačkastih genetičkih varijanti u multiploj sklerozi i procena njihove uzročne veze sa MS-om

Jedan od najvećih izazova u razumevanju genetičkih rezultata u kompleksnim bolestima poput MS-a je interpretacija uzročnih varijanti statistički značajno asociiranih sa MS-om. Glavni uzroci poteškoća su gustina varijanti (SNP)-ova u lokusima od interesa, visoka neravnoteža vezanosti nasleđivanja (eng. *Linkage Disequilibrium*, LD) i njihove haplotipske asocijacije sa bolestima. Šta više, indeks varijante i najjače asociirane varijante u haplotipu (najjače asociirane varijante se zovu „vodeće varijante”) ne moraju biti uzročne varijante (Farh i sar., 2015; Schaid i sar., 2018). Asocijacija varijanti bez preciziranja uzročnosti može dati samo ograničeno razumevanje mehanizama etiologije i patogeneze kompleksnih oboljenja.

Postoji niz pristupa u rešavanju problema interpretacije uzročnosti asociiranih varijanti sa kompleksnim oboljenjima, uključujući integrativne analize genoma, transkriptoma i epigenoma relevantnih ćelijskih tipova (Farh i sar., 2015; Schaid i sar., 2018). Na primer, integracija GWAS-ova i epigenetičkih rezultata može da analizira epigenetički potpis na nivou hromatinskog regiona u kom se haplotip nalazi i samim tim se može izneti zaključak o tome koja je od varijanti haplotipa verovatnije uzročna sa stanovišta njene pozicije u strukturi hromatina (Farh i sar., 2015; Roostaei i sar., 2021). Jedna metoda za precizno mapiranje uzročnih tačkastih polimorfizama (eng. *Single Nucleotide polymorphism*, SNP) koja je bazirana na integraciji informacija sa GWAS-ova i na Bajesovoj interpretaciji kauzalnosti je probabilistička interpretacija uzročnih SNP-ova (eng. *Probabilistic Interpretation of Causal SNPs*, PICS). PICS metoda za precizno mapiranje razvijena je od strane Farh i sar., 2015-e godine na osnovu eksperimentalnih podataka velikog broja genetički okarakterisanih uzoraka studijom iz 2013. godine (IMSSGC, 2013) i primenjena na najčešćim autoimunskim oboljenjima uključujući MS. Svrha PICS-a je procena verovatnoće da je pojedinačni tačkasti polimorfizam u haplotipu uzorčna varijanta uzimajući u obzir haplotipsku strukturu, LD varijanti i obrazac asocijacije sa bolešću u lokusu (Farh i sar., 2015).

PICS je dizajniran tako da poznavanjem jačine asocijacije vodećeg SNP-a, izraženom kroz p vrednost, sa bolešću i sa SNP-om koji je kandidat da bude proglašen kao uzročni, izraženo kroz LD, izvrši procenu verovatnoće uzročnosti kandidat SNP-a. Inicijalna pretpostavka algoritma PICS je da je asocijacija vodećeg SNP-a i SNP-a koji je kandidat da bude uzročna varijanta samo i isključivo kao produkt LD vrednosti. Odnosno, da je snaga asocijacije vodećeg SNP-a i uzročnog kandidat SNP-a izražena kroz χ^2 vrednost linearno zavisna od kvadrata koeficijenta korelacije r^2 , što se može izraziti sledećom formulom: $\chi^2 = (n-1)r^2$, gde je n veličina uzorka. Ukoliko su ovi uslovi zadovoljeni verovatnoća uzročnosti SNP-a B, ukoliko je SNP A vodeći, se računa primenom Bajesove teoreme na sledeći način:

$$p(B^{\text{uzročna}}|A^{\text{vodeća}}) = p(A^{\text{vodeća}}|B^{\text{uzročna}}) \times p(A^{\text{vodeća}})/p(B^{\text{uzročna}}),$$

$p(B^{\text{uzročna}}|A^{\text{vodeća}})$ – verovatnoća da je SNP B kauzalni SNP ako je SNP A vodeći;

$p(A^{\text{vodeća}}|B^{\text{uzročna}})$ – verovatnoća da je SNP A vodeći ukoliko je SNP B kauzalni;

$p(A^{\text{vodeća}})$ – verovatnoća da je SNP A vodeći;

$p(B^{\text{uzročna}})$ – verovatnoća da je SNP B kauzalni.

Verovatnoća da je SNP A ujedno i vodeći i kauzalni SNP se računa sledećemo formulom:

$$p(B^{\text{uzročna}}|A^{\text{vodeća}}) + p(A^{\text{uzročna}}|A^{\text{vodeći}}) = 1$$

(Farh i sar., 2015).

1.7. Uticaj tačkastih genetičkih varijanti na ekspresiju gena u multiploj sklerozi

Jedno od najintragantnijih otkrića GWAS ere je činjenica da većina SNP-ova asociranih sa rizikom i/ili uzročnih SNP-ova za kompleksne poligene bolesti nisu locirani u sekvenci molekula DNK koja kodira za proteine (Farh i sar., 2015; Huang i sar., 2015; Albert i Kruglyak, 2015). Najnovija studija urađena analizom genomskih informacija 47429 MS pacijenata i 68734 kontrola pokazala je da od 200 autozomalnih SNP-ova asociranih sa MS-om van MHC regiona, samo je 5 locirano u egzonskim sekvencama gena koji kodiraju za proteine (IMSGC 2019). Analiza PICS-om 39 GWAS-ova za 21-nu autoimunsku bolest utvrdila je da je manje od 10% uzročnih varijanti locirano u protein kodirajućim sekvencama (Farh i sar., 2015). Oko 60% uzročnih SNP-ova locirano je u pojačivačkim regionima asociranim sa aktivnostima imunskih ćelija (Farh i sar., 2015). Ovi regioni sadrže elemente genoma koji su uključeni u inicijaciju transkripcije gena i/ili su u hromatinskoj strukturi koja podleže histonskoj acetilacije nakon stimulacije imunskih ćelija (Farh i sar., 2015). Oko 8% uzročnih SNP-ova locirano je u promotorima gena (Farh i sar., 2015). Sve ovo ukazuje da modifikacija proteinske sekvence nije glavni mehanizam kojim SNP-ovi utiču na fenotip kompleksnih bolesti poput, (Farh i sar., 2015; Albert i Kruglyak, 2015). Jedan od mehanizama kojim se objašnjavaju MS-a heterogeni i plejotropni efekti tačkastih genetičkih varijanti na kompleksne poligene fenotipske karakteristike je uticaj varijante na ekspresiju gena (Huang i sar., 2015; Albert i Kruglyak, 2015; GTEx Consortium 2020).

Varijante koje vrše uticaj na ekspresiju gena se zovu regulatorne varijante (Huang i sar., 2015; Albert i Kruglyak, 2015). Konzorcijum za analizu tkivnih efekata genotipa na ekspresiju (GTEx Consortium, eng. *Genotype Tissue Expression database*) klasifikuje regulatorne varijante kao one koje modifikuju nivo transkripcije (eng. *Expression Quantitative Trait Loci*, eQTL) i kao one koje modifikuju alternativno splajsovanje transkripta (eng. *Splicing Quantitative Trait Loci*, sQTL) (GTEx Consortium 2020). Regulatorne varijante mogu da utiču na ekspresiju gena u blizini varijante (*cis* regulatorni efekat) ili na gene udaljenim od varijante (*trans* regulatorni efekat) (GTEx Consortium 2020). Regulatorne varijante mogu da vrše uticaj na nivo ekspresije nekog gena putem većeg broja mehanizama, modifikujući: mesta vezivanja regulatornih proteina transkripcije, metilaciju molekula DNK, strukturu hromatina, interakciju sa malim regulatornim RNK, interakciju sa dugim nekodirajućim molekulima RNK, editovanje molekula RNK i uticaj na degradaciju molekula RNK (Huang i sar., 2015; Albert i Kruglyak, 2015).

Detaljna studija mapiranja SNP-ova asociranih sa MS-om i njihovog potencijalnog efekta na ekspresiju iRNK čiji su rezultati objavljeni 2020. godine pokazala je da 172 SNP-a asociranih sa MS-om ispoljavaju efekat cis-eQTL-a za 129 gena u mononuklearnim ćelijama periferne krvi (MČPK) (Gresle i sar., 2020). 21 cis-eQTL ispoljava efekat na diferencijalnu ekspresiju gena između pacijenata sa MS-om i zdravih individua, implicirajući vid genotip-fenotip interakcije u MČPK (Gresle i sar., 2020).

Procenjeno je da 10-20% uzročnih SNP-ova za najčešće autoimunske bolesti menjaju strukturu molekula DNK u mestima vezivanja transkripcionih regulatora (Farh i sar., 2015). Rezultati PICS-a impliciraju da kauzalni SNP-ovi za komplekse autoimunske bolesti generalno ne modifikuju ekspresiju gena kroz direktno menjanje strukture regulatornih elemenata već kroz modulaciju aktivnosti sa pojačivača transkripcije kroz promenu okolnih nukleotida (Farh i sar., 2015). Rezultati meta-analize pokazali su da je 15 SNP-ova asociranih sa MS-om locirano u vezivnim mestima transkripcionih regulatora, od kojih su 5 eQTL-ovi za gene relevantne za MS (Lin i sar., 2015).

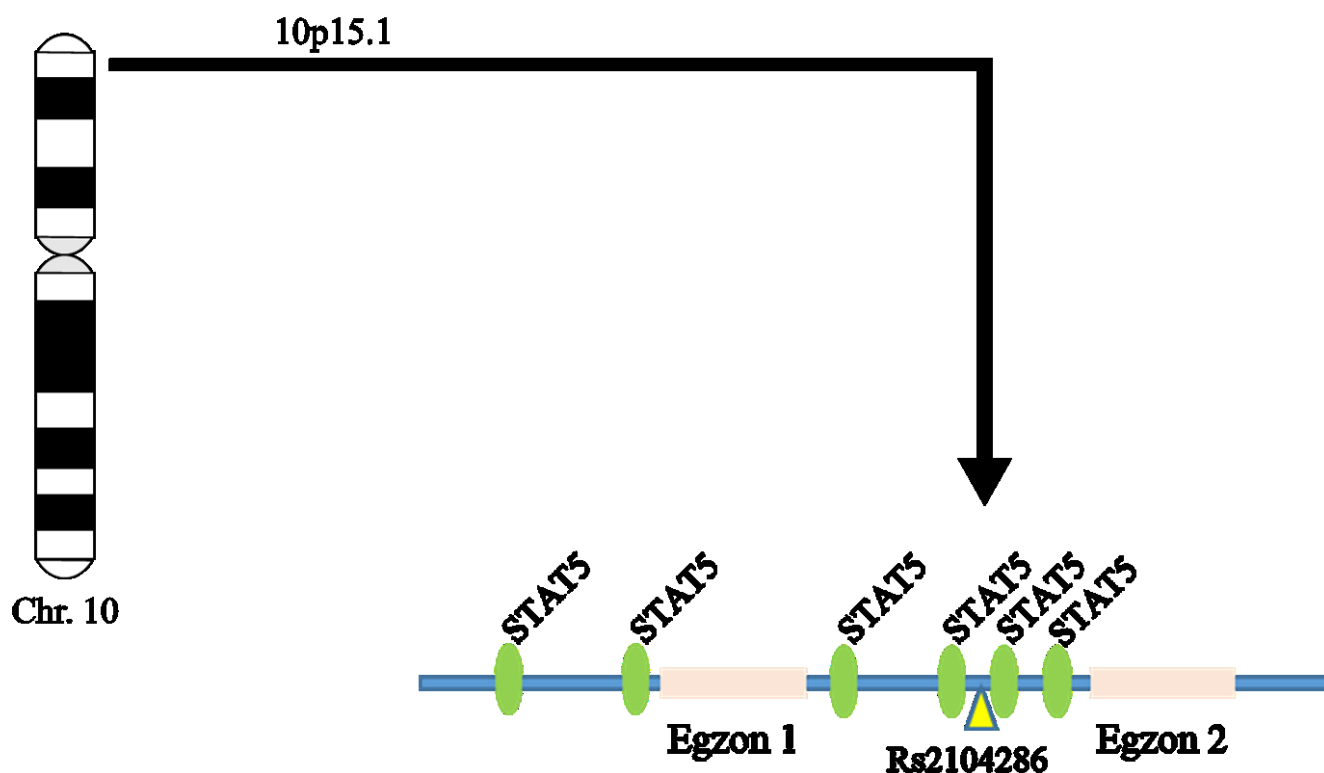
1.8. Gen *IL2RA* i rs2104286

Gen *IL2RA* (eng. *Interleukin-2 Receptor Subunit Alpha*), lociran u 10p15.1 hromozomskom regionu kodira subjedinicu Alfa receptora za Interleukin-2 (CD25) (www.ensembl.org) i deo je receptorskog kompleksa sa visokim afinitetom (zajedno sa Beta i Gama subjedinicom) (Rickert i sar., 2004; Stauber i sar., 2006) koji ima sposobnost inicijacije intenzivne propagacije IL-2 signala, što je neophodno za pravilnu funkcionalnu aktivnost T limfocita (Busse i sar., 2010; Shatrova i sar., 2016; Toomer i sar., 2019; Permanyer i sar., 2021). Subjedinica *IL2RA* je jedinstvena za IL-2 signalizaciju dok su subjedinice Beta i Gama konstitutivni delovi receptorskih kompleksa i za druge citokine (Liao i sar., 2013).

IL-2 ima jedinstvenu karakteristiku kao pro- i anti-inflamatorni citokin, i kao citokin neophodan za inicijaciju i propagaciju imunskog odgovora i njegovu homeostazu (Liao i sar., 2013). IL-2 citokin je glavni faktor proliferacije CD4⁺ T limfocita, efekat postiže putem JAK-STAT5 (eng. *Janus Kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription 5*) signalnog puta iniciranog sa receptora za IL-2 (Liao i sar., 2013; Smith i sar., 2016; Li i sar., 2017). IL-2 promovise funkcionalnu maturaciju antigen stimulisanih efektorskih CD4⁺ T limfocita (Liao i sar., 2008; Liao i sar., 2011). Osim svojih uticaja na efektorske CD4⁺ ćelija, IL-2 promovise proliferaciju i citolitičku aktivnost antigen stimulisanih CD8⁺ T ćelija (Lai i sar., 2009), NK ćelija (eng. *Natural Killer Cells*) (Dunne i sar., 2001) i proliferaciju i maturaciju B limfocita (Jelinek i sar., 1986). Efekat IL-2 na imunsku homeostazu je od izuzetnog značaja. IL-2 je esencijalan za aktivaciju supresorske funkcije (Thornton i sar., 2004; Wuesti i sar., 2008), proliferaciju (Wuesti i sar., 2008) i preživljavanje (Elpek i sar., 2007; Wuest i sar., 2008) CD4⁺ CD25⁺ FoxP3⁺ Treg ćelija. CD4⁺ T ćelije MS pacijenata ispoljavaju sniženi kapacitet za odgovor na IL-2 u odnosu na ćelije iz zdravih individua (Cerosaletti i sar., 2013).

Alfa subjedinica je inducibilno eksprimirana na CD4⁺ T ćelijama (Busse i sar., 2010; Smith i sar., 2016; Belot i sar., 2018). IL-2 signalizacija, prevashodno JAK-STAT5 put prenosa signala (Smith i sar., 2016), dovodi do demetilacije *IL2RA* lokusa što je praćeno intenzivnim porastom ekspresije *IL2RA* na površini CD4⁺ T limfocita (Smith i sar., 2016; Belot i sar., 2018), i posledično intenzivnijeg vezivanja IL-2 (Busse i sar., 2010), inicijacije i propagacije signalizacije i fosforilacije STAT5 regulatornog proteina transkripcije (Smith i sar., 2016). To dovodi do transkripcije *IL2RA* reprezentujući vid pozitivne povratne sprege u aktivaciji CD4⁺ T limfocita (Li i sar., 2017). Većina FoxP3⁺ CD4⁺ Treg ćelija konstitutivno ekprimira *IL2RA* na svojoj površini (Liao i sar., 2013). Neizmenjen nivo ekspresije *IL2RA* esencijalna je za održavanje periferne tolerancije posredstvom Treg ćelija (Toomer i sar., 2019; Permanyer i sar., 2021). Jedan od mehanizama kojim Treg ćelije suprimiraju aktivaciju CD4⁺ T efektorskih ćelija je kroz kompeticiju za IL-2 sa efektorskim T limfocitima kroz ekspresiju receptora sa visokim afinitetom (Busse i sar., 2010). Nakon aktivacije, CD25 biva brzo eliminisan sa površine ćelija delovanjem metaloproteinaza matriksa (MMP2 i MMP9 prevashodno) (Sheu i sar., 2001), dovodeći do porasta solubilne forme CD25 (sCD25) u perifernoj krvi u inflamatornim stanjima (Maier i sar., 2009a; Cerosaletti i sar., 2013). Prisustvo solubilnog CD25 negativno utiče na propagaciju IL-2 signalizacija (Maier i sar., 2009a; Cerosaletti i sar., 2013). Viša serumska koncentracija sCD25 asocirana je sa MS-om i težom formom bolesti (Maier i sar., 2009a).

Varijanta *IL2RA* rs2104286 (A>G) locirana je u prvom intronu gena *IL2RA* u okviru superpojačivačkog regiona pod kontrolom STAT5 (grafikon U1; www.ensembl.org). PICS algoritam okarakterisao je rs2104286 kao glavnu uzročnu varijantu za rizik za nastanak MS u okviru ovog regiona (Farh i sar., 2015). Alel G asociran je sa protektivnim efektom u kontekstu rizika za nastanak MS (IMSGC 2007; De Jager i sar., 2009, IMSGC 2013; Farh i sar., 2015) i drugih autoimunskih bolesti poput dijabetesa tipa 1 (Tang i sar., 2015), Grejvsove bolesti (Du i sar., 2021) i juvenilnog idiopatskog artritisa (Hinks i sar., 2009). Studije vektora sa luciferaznim esejima su pokazale da vektori koji sadrže sekvencu alela G varijante rs2104286 imaju smanjen intenzitet inicijacije transkripcije u odnosu na vektore sa alelom A (Schwartz i sar., 2017). Genotip AA asociran je sa nižom signalizacijom IL-2 u CD4⁺ CD25⁺ T ćelijama periferne krvi, izraženom kroz stepen fosforilacije STAT5, nižom ekspresijom *IL2RA* na površini CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁺ Treg ćelija (Cersaletti i sar., 2013), kao i sa višom koncentracijom sCD25 u serumu (Maier i sar., 2009b). Kontradiktorno, ne stimulisane CD4⁺ FoxP3⁺ CD25⁺ Treg ćelije zdravih individua i MS pacijenata sa genotipom AA varijante rs2104286 ispoljavaju veću ekspresiju *IL2RA* na svojoj membrani (Cersaletti i sar., 2013). CD4⁺ Th1 i Th17 limfociti iz homozigota AA rs2104286 *IL2RA* imaju smanjen nivo ekspresije CD25 na svojoj površini u odnosu na ćelije sa genotipom GG (Buhelt i sar., 2019).



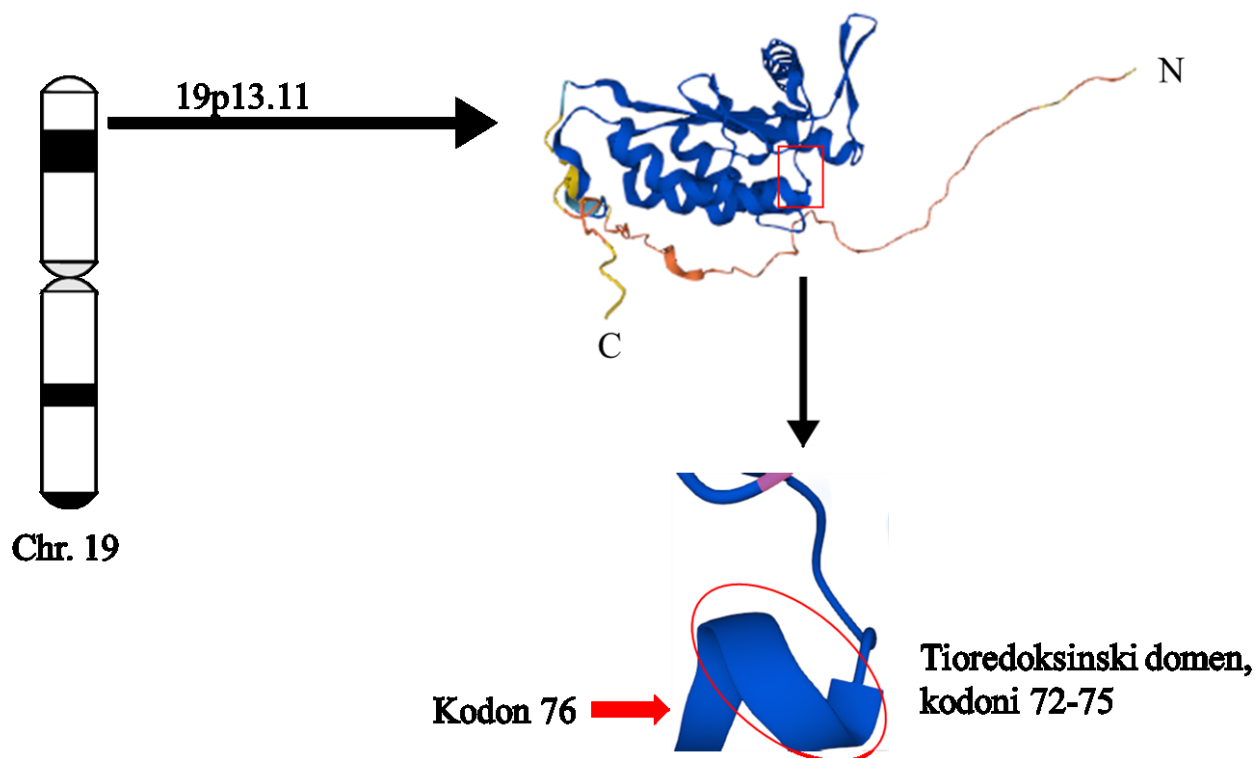
Grafikon U1: Pozicija varijante *IL2RA* rs2104286 u hromozomskom regionu između prvog i drugog egzona gena *IL2RA*, u okviru superpojačivačkog regiona pod kontrolom STAT5.

1.9. Gen *IFI30* i rs11554159

Gen *IFI30*, lociran u hromozomskom regionu 19p13.11, kodira enzim Interferon gama inducibilnu tiolnu reduktazu (eng. *Gamma Interferon Inducible Thiol Reductase*, GILT). GILT je jedini poznati enzim koji redukuje disulfidne veze u lizozomima u ćelijama čoveka (Arunachalam i sar., 2000; Rausch i Hastings, 2015). Ova enzimska aktivnost ima ulogu u održavanju oksido-redukcionog potencijala ćelija (Bogunovic i sar., 2008; Maric i sar., 2009) i ulogu u pripremi antigena za

prezentaciju (Maric i sar., 2001; Hastings i sar., 2006). Ovaj vid obrade antigena uključen je u prezentaciji ekstracelularnih fagocitovanih antigena posredstvom MHC II (Hastings i sar., 2006; Bogunovic i sar., 2010) ili putem unakrsne-prezentacije posredovane MHC I (Singh i Cresswell, 2010). Pored direktnog efekta na disulfidne veze antigena (Hastings i sar., 2006; Bergman i sar., 2012), GILT vrši uticaj na obradu antigena indukcijom aktivacije tiolne proteaze Katepsina S na nivou endozoma (Balce i sar., 2014). GILT je konstitutivno eksprimiran na visokom nivou u antigen prezentujućim ćelijama poput monocita, makrofaga i B ćelija (Arunachalam i sar., 2000; Maric i sar., 2001; Lackman i sar., 2007). Ekspresija GILT utiče na selekciju epitopa preko MHC II, menjajući epitopski sadržaj prezentovan na MHC II (Bogunovic i sar., 2010). Splenociti iz miševa divljeg soja (eng. *wild type*, *wt*) i miševa sa inaktiviranim *Ifi30* (*ifi30*^{-/-} *knockout*-a) imaju varijaciju od oko 10% u ekspresiji individualnih sopstvenih peptidnih epitopa na nivou MHC II kompleksa (Bogunovic i sar., 2010). Pokazano je da ekspresija GILT utiče na slabiju aktivaciju T limfocita (Barjakterević i sar., 2006) i umanjenu reaktivnost na sopstveni antigen (Maric i sar., 2009), nezavisno od ekspresije GILT na nivou antigen prezentujućih ćelija (Barjakterević i sar., 2006; Maric i sar., 2009). Ekspresija GILT na nivou epitelnih ćelija timusa je bitna zarad regulacije autoimunosti i antigenog repertoara T ćelija, putem MHC II epitopske prezentacije, negativne selekcije i delecije autoreaktivnih CD4⁺ T ćelija, ilustrujući bitnu ulogu GILT-a u regulaciji centralne tolerance (Rausch i sar., 2020). Potencijalna uloga enzima u MS-u ilustrovana je eksperimentima na miševima sa eksperimentalnim autoimunskim encefalomijelitisom (eng. *Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*, EAE), animalnim modelom MS, koji su *ifi30*^{-/-} *knockout*. Nakon indukcije EAE, ovi miševi imaju teži oblik bolesti i drugačiji epitopski repertoar koji ne eksprimira MOG 35-55 epitop, koji je glavni epitop inicijator EAE kod *wt* miševa (Bergman i sar., 2012). Šta više, *ifi30*^{-/-} miševi nisu sposobni da razviju EAE nakon ubrizgavanja pacovskog MOG 35-55 peptida usled disulfidnih veza u okviru ovog dela antigena (Bergman i sar., 2012). Zanimljivo, *ifi30*^{-/-} miševi ispoljavaju patogenezu EAE kojom dominiraju B ćelije, za razliku od patogeneze posredovane CD4⁺ T limfocitima kod *wt* miševa (Bergman i sar., 2012).

Genetička varijanta rs11554159 (G>A) je locirana u drugom egzonu *IFI30*, menjajući značenje 76 kodona (R76Q) lociranog pored tioredoksin-sličnog motiva CXXC (kodoni 72-75) koji čini aktivno mesto enzima (grafikon U2 ; www.ensembl.org; Arunachalam i sar., 2000). Bioinformatički program PolyPhen2 predviđa da ređi alel A utiče negativno na enzimsku funkciju (Turcot i sar., 2012). IMSCG GWAS je asociirao rs11554159 alel G sa rizikom za nastanak MS (IMSCG 2013). PICS je okarakterisao genetičku varijantu *IFI30* rs11554159 kao najverovatniju kauzalnu varijantu za nastanak MS u lokusu u kome se nalazi (Farh i sar., 2015).



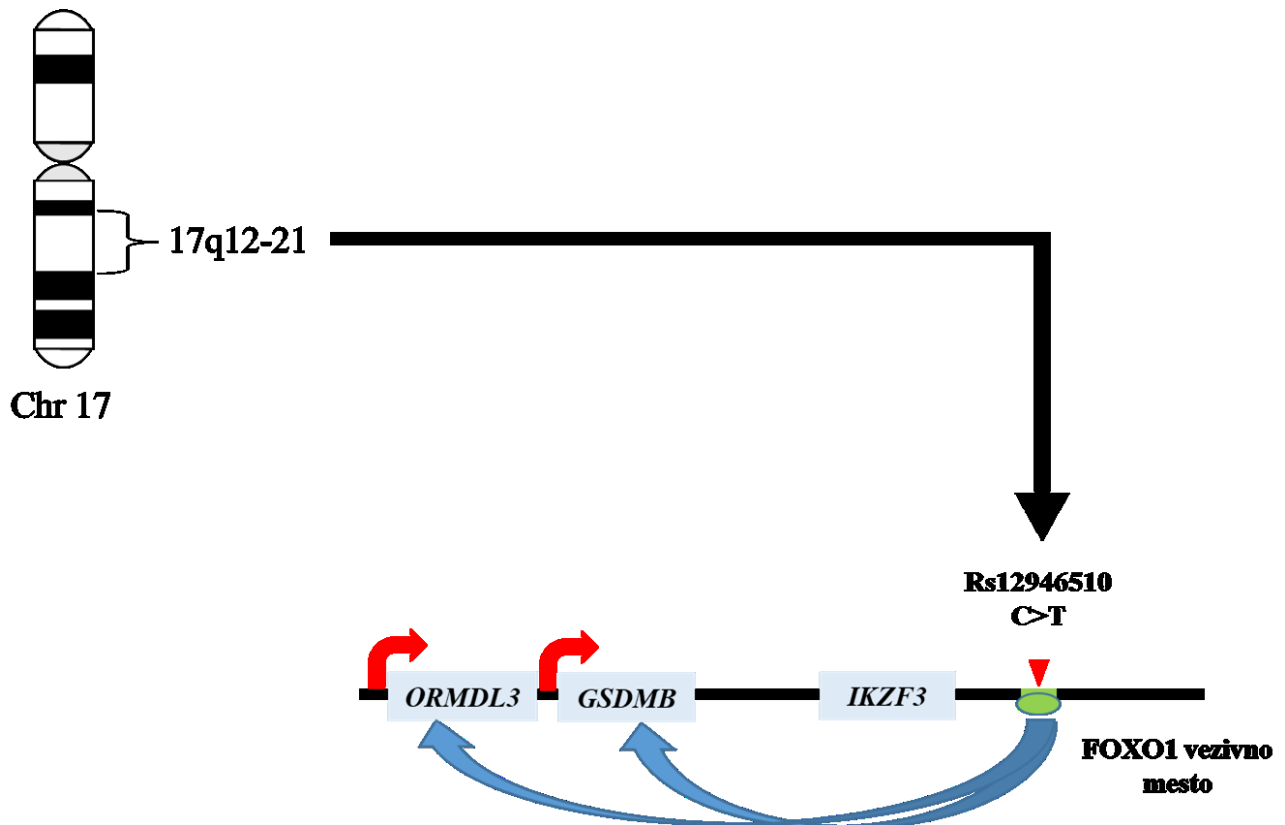
Grafikon U2: Pozicija varijante *IFI30* rs11554159 u okviru hromozoma 19 i u okviru enzima GILT. Varijanta menja strukturu 76 kodona (označen crvenom strelicom) koji se nalazi neposredno pored aktivnog mesta enzima koji se sastoji od tioredoksinskog motiva koji zauzima kodone 72-75 (u crvenoj elipsi). 3D model predviđene strukture proteina je preuzet sa internet stranice UniProt-a (<https://www.uniprot.org/uniprotkb/P13284/entry#structure>).

1.10. Hromozomski region 17q12-21 i rs12946510

17q12-21 je hromozomski region veličine ~ 18.5Mb lociran na dužem kraku 17-og hromozoma (www.genome.ucsc.edu). Hromozomski region 17q12-21 poseduje veći broj gena koji imaju bitne uloge u adaptivnom imunskom sistemu i asociran je sa bolestima imunske preosetljivosti. Osim asocijacije sa astmom (Zhao i sar., 2015), varijante u ovom regionu takođe su asocirane sa rizikom za nastanak autoimunskih oboljenja poput inflamatornih bolesti debelog creva (Barrett i sar., 2008; Jostins i sar., 2012), Grejvsove bolesti (Li i sar., 2018), reumatoidnog artritisa (Stahl i sar., 2010; Saevarsdottir i sar., 2022), dijabetesa tipa 1 (Barrett i sar., 2009) i MS-a (Keshari i sar., 2016; Putscher i sar., 2022).

Tačkasti polimorfizam rs12946510 (C>T) lociran je u okviru 17q12-21 u intergenskom regionu između gena *GRB7* (eng. *Growth Factor Receptor Bound Protein 7*) i *IKZF3* (eng. *IKAROS Family Zinc Finger 3*) (www.ensembl.org). Ovaj SNP lociran je u okviru pojačivača za *FOXO1* (eng. *Forkhead Box O1*) i alelna varijanta T vrši disrupciju vezivnog mesta vršeći negativan uticaj na dinamiku vezivanja *FOXO1* za molekul DNK (grafikon U3; Hitomi i sar., 2017; Ustiugova i sar., 2019). IMSGC je asocirao alel T ove varijante sa rizikom za nastanak MS-a (IMSGC 2013), dok je PICS okarakterisao rs12946510 kao kandidata za uzročnu varijantu za nastanak bolesti (Farh i sar., 2015). Osim asocijacije sa MS-om, rs12946510 takođe je asociran sa težom formom astme (Herrera-Luis i sar., 2021), primarnim holangitisom žučne kese (Hitomi i sar., 2017) i inflamatornim bolestima debelog creva (Jostins i sar., 2012; Di Narzo i sar., 2016). GTEx (GTEx Consortium 2020) karakteriše

rs12946510 kao lokus kvantitativne ekspresije (eng. *Expression Quantitative Trait Locus*, eQTL) za gene *ORMDL3* (eng. *Orisomucoid 1-Like Sphingolipid Biosynthesis Regulator 3*), *GSDMB* (eng. *Gasdermin B*) i *IKZF3* u perifernoj krvi (<https://www.gtexportal.org/home/snp/rs12946510>).



Grafikon U3: Pozicija varijante *IKZF3* rs12946510 u okviru hromozomskog regiona 17q12-21. Varijanta je locirana u vezivnom mestu transkripcionog aktivatora FOXO1 i modifikuje njegovu sposobnost vezivanja za DNK, remeteći sposobnost pozitivne regulacije transkripcije gena u regionu. Varijanta je eQTL-om za *ORMDL3* i *GSDMB*. Grafikon je modifikacije ilustracije iz Hitomi i sar., 2017.

1.10.1. Gen *ORMDL3*

Protein *ORMDL3*, konstitutivno eksprimiran na nivou membrane endoplazmatičnog retikuluma (ER) (Hjelmqvist i sar., 2002), bitan je regulator imunske funkcije putem modulacije aktivacije T limfocita regulacijom ulaza Ca^{2+} u ćelije i preko negativne regulacije proizvodnje sfingolipidnih signalnih jedinjenja, koja su esencijalna za izlazak limfocita iz limfoidnih tkiva u krvotok (Carreras-Sureda i sar., 2013; Carreras-Sureda i sar., 2016; Gupta i sar., 2014, Davis i sar., 2019; Xie i sar., 2023).

ORMDL3 negativno utiče na aktivaciju T limfocita inhibicijom eksplozivnog ulaska Ca^{2+} u ćeliju putem procesa koji se označava kao rezervom Ca^{2+} indukovani ulazak Ca^{2+} (eng. *Ca^{2+} store operated Ca^{2+} entry*, SOCE) (Carreras-Sureda i sar., 2013; Carreras-Sureda i sar., 2016). Povišena ekspresija *ORMDL3* dovodi do umanjenog transporta Ca^{2+} iz citoplazme u ER i mitohondrije, dovodeći do niže koncentracije Ca^{2+} u ER i mitohondrijama, rezultujući u manjem gradijentu razlike između ovih organela i citoplazme (Cantero-Recasens i sar., 2010; Carreras-Sureda i sar., 2013). Eksplozivni porast koncentracije citoplazmatičnog Ca^{2+} dovodi do aktivacije fosfataze Kalcineurina koja, uklanjanjem fosfata, aktivira glavni transkripcioni regulator aktivacije T limfocita NFAT (eng. *Nuclear Factor of Activated T Cells C1*) (Yang i Jafri., 2020). Pokazano je da u Jurkat T ćelijama *ORMDL3* promoviše inaktivaciju Ca^{2+} struja aktiviranih Ca^{2+} oslobađanjem i dovodi do inhibicije

translokacije NFAT iz citoplazme u nukleus i smanjene sinteze IL-2 (Carreras-Sureda i sar., 2013). Na nivou ER ORMDL3 kolokalizuje sa i inhibira ER Ca^{2+} ATP pumpu SERCA2 (eng. *Sarcoplasmic/Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 2*), koja je bitna za održavanja Ca^{2+} homeostaze ER-a (Cantero-Recasens i sar., 2010; Carreras-Sureda i sar., 2013). Ovaj efekat ORMDL3 na aktivaciju limfocita može da zavisi od varijanti u regionu 17q12-21, što je pokazano na primeru rs12936231-rs7216389 C-T haplotipa asociiranog sa astmom. Haplotip je asociiran sa višim nivoom ekspresije *ORMDL3* i posledično slabijim SOCE, što dovodi do toga da T ćelije koje nose haplotip imaju slabiju dinamiku aktivacije i manju produkciju IL-2, CD25, IFN γ i proliferaciju (Carreras-Sureda i sar., 2016).

Protein ORMDL3 takođe je inhibitor aktivnosti enzima SPT (eng. *Serine Palmitoyl Coenzyme A Transferase*). SPT katalizuje produkciju 3-ketodihidrosfingozina (KDS) od supstrata palmitoil-CoA i serina. KDS je prekursor svih biološki relevantnih vrste sfingolipida (npr. ceramida i sfingozin-1-fosfat), čineći SPT aktivnost uskim grlom sinteze sfingolipida (Zheng i sar., 2006). ORMDL3 je deo negativne povratne sprege *de novo* sinteze sfingolipida budući da povišene koncentracije ceramida pozitivno utiču na translaciju ORMDL3 i na ORMDL3 posredovanu inhibiciju SPT u ORMDL3-SPT kompleksu (Gupta i sar., 2014; Davis i sar., 2019; Xie i sar., 2023). Ceramid-indukovana signalizacija ima efekat promocije apoptoze u MČPK (Belaud-Rotureau i sar., 2000) i ceramid je prekursor sfingozina-1-fosfata (S1P) (Zheng i sar., 2006), uključenog u imunske funkcije T limfocita. S1P je glavni hemokin koji reguliše izlazak T limfocita iz limfoidnih organa tokom fizioloških uslova (Schwab i sar., 2005) i stimuliše njihov ulazak i retenciju u inflamiranim tkivima (Kataoka i sar., 2005; Jaigirdar i sar., 2017). Koncentracija S1P je naročito visoka na mestima inflamacije (Jaigirdar i sar., 2017), povišena je u CST MS pacijenata i koncentracija u CST korelira sa trenutnim neurološkim deficitom izraženim kroz Proširenu skalu stanja disabiliteta (eng. *Expanded Disability Status Scale*, EDSS) (Kułakowska i sar., 2010). *Ormdl3*^{-/-} *knockout* miševi imaju povišene koncentracije ceramida i sfingozina na nivou CNS-a (Clarke i sar., 2019).

1.10.2. Gen *GSDMB*

Gen *GSDMB* kodira protein Gasdermin B koji ima ulogu u piroptozu, vrsti inflamatorne ćelijske smrti koji zavisi od gasderminske familije proteina (Zahid i sar., 2021). Gasdermin B je efektor dva tipa nekanonske piroptotoze: indukovane promocijom proteolitičke aktivnosti Kaspaze 4 koja cilja Gasdermin D (*GSDMD*) (Chen i sar., 2019) ili inicirane proteolitičkom aktivnošću Granzima A oslobođenog od strane citotoksičnih CD8⁺ i NK limfocita tokom ciljanog ubijanja ćelija (Zhou i sar., 2020; Gong i sar., 2022). Tokom citotoksične indukcije, Granzim A endoproteolitički seče protein na poziciji K244 iza lizina oslobađajući N terminalni domen Gasdermina B koji formira pore na ćelijskoj membrani promovišući kaskadu procesa koji vode do piroptoze (Zhou i sar., 2020; Zahid i sar., 2021; Gong i sar., 2022). Incijacija piroptoze perforiranjem ćelijske membrane je karakteristična za sve članove gasderminske familije, ali Gasdermin B je jedini član koji je aktiviran Granzimom A (Zhou i sar., 2020; Zahid i sar., 2021; Gong i sar., 2022). Drugi mehanizam kojim *GSDMB* promoviše nekanonsku piroptozu je formiranje kompleksa sa Kaspazom 4, promovišući njeno proteolitičko sečenje *GSDMD*, što rezultira formiranjem *GSDMD* pora na ćelijskoj membrani i inicijacijom piroptoze (Chen i sar., 2019).

U maloj grupi ispitanika, pokazano je da je profil alternativnog splajsovanje iRNK *GSDMB* u MČPK drugačiji između RRMS pacijenata i kontrola (Cardamone i sar., 2017). U istoj grupi, pokazano je da je iRNK *GSDMB* eksprimirana na nižem nivou u MČPK RRMS pacijenata u odnosu na kontrole (Cardamone i sar., 2017).

1.10.3. Gen *IKZF3*

Gen *IKZF3* kodira regulatorni protein transkripcije Aiolos, član Ikaros Zinc Finger porodice transkripcionih regulatora, koji se vezuje za molekul DNK posredstvom motiva TGGGAA cinkanim prstima (Caballero i sar., 2007; Wang i sar., 2019). Aiolos ima brojne funkcije u regulaciji razvića i funkcije limfocita, generalno vršeći svoju funkciju kao homodimer ili kao heterodimer sa proteinom Ikaros (kodiranim od stane *IKZF1*). Način na koji protein IKZF3 reguliše transkripciju ciljnih gena nije u potpunosti razjašnjen, ali je poznato da, zajedno sa IKZF1, pozitivno utiče na regrutaciju faktora koji vrše deacetilaciju histona, poput Mi-2/NuRD, SIN3, HDAC1 i MTA2 posledično suprimirajući transkripciju gena, što ga čini potentnim transkripcionim represorom (Koipally i sar., 1999; Caballero i sar., 2007). Aiolos vrši pozitivan uticaj na transkripciju ciljanih gena i kroz direktnu interakciju sa promotorima (Romero i sar., 1999). Fosforilisane forme Aiolosa se translociraju iz citoplazme u nukleus, mehanizmom zavisnim od signalizacije preko IL-2 (Romero i sar., 1999).

Aiolos je neophodan za pravilnu funkcionalnu maturaciju i aktivaciju B limfocita. Pokazano je da *Aiolos*^{-/-} *knockout* miševi imaju značajno povećanu proporciju pre-B ćelija u koštanoj srži, povišenu proporciju aktiviranih B ćelija u slezini i povećanu produkciju antitela, uključujući i antitela na sopstvene antigene, i povišenu proliferaciju kao odgovor na stimuluse (Wang i sar., 1998). Osim maturacije, Aiolos je neophodan za generaciju dugoživećih efektorskih B ćelija sa visokoafinitetnim B ćelijskim receptorom (BCR) (Cortés i Georgopoulos, 2004).

Specifične uloge *IKZF3* u razviću i funkciji T limfocita se generalno ispoljavaju tokom kasnijih faza funkcionalne maturacije T ćelija. Aiolos pomaže Th17 tip funkcionalne diferencijacije CD4⁺ T limfocita putem utišavanja promotora gena *Il2* u limfocitima miševa, produkcije CD4⁺ Th17 memorijskih ćelija, i suprimira Th1 tip funkcionalne diferencijacije *in vivo* i *in vitro* (Quintana i sar., 2012b). Aiolos formira kompleks sa FoxP3 transkripcionim regulatorom i promoviše supresivne kapacitete indukovanih CD4⁺ FoxP3⁺ T reg ćelija (Gandhi i sar., 2010). Aiolos deficijentni limfociti uzrokuju težu formu EAE u uslovima Th1 polarizacije (Quintana i sar., 2012b).

Takođe, *IKZF3* u limfocitima ima ulogu u regulaciji ćelijskog umiranja po tipu apoptoze. Aiolos može imati proapoptotske i antiapoptotske funkcije. U TS1 $\alpha\beta$ T ćelijskim linijama Aiolos inhibira apoptozu promovišući ekspresiju gena *BCL2* kroz direktnu interakciju sa promotorom (Romero i sar., 1999), dok Jurkat T ćelije transfekovane sa *IKZF3* imaju povišenu stopu apoptoze i zastoja u G₀/G₁ fazi ćelijskog ciklusa (Zhuang i sar., 2015). Na nivou citoplazme T ćelija, Aiolos blokira aktivnost antiapoptotskog proteina Bcl-x_L kroz nekovalentnu interakciju (Rebollo i sar., 2001). Fosforilacija Aiolos-a indukovana IL-4 (koja ne dovodi do translokacije u nukleus) neophodna je za disocijaciju proteina i antiapoptotsku aktivnost Bcl-x_L (Rebollo i sar., 2001).

U kontekstu genetike autoimunskih bolesti, varijante u *IKZF3* su prethodno asocirane sa MS-om (Keshari i sar., 2016), Grejvsovom bolešću (Li i sar., 2018), reumatoidnim artritisom (Stahl i sar., 2010) i sistemskim lupusom eritromatosusom (Cai i sar., 2014).

2. HIPOTEZA I CILJEVI

Definisane su dve osnovne hipoteze ove studije. Prva je da su odabrane genetičke varijante u asocijaciji sa nastankom MS i kliničkim parametrima težine i progresije bolesti. Druga je da su odabrane varijante asociirane sa nivoom transkripcije u humanim MČPK pacijenata sa MS. Hipoteza uključuje i mogući udruženi efekat varijanti na kliničke manifestacije MS i regulaciju transkripcije ciljnih gena.

Na osnovu hipoteza definisani su ciljevi:

1. Ispitivanje asocijacije odabranih varijanti *IL2RA*, *IFI30* i *IKZF3* sa nastankom MS, težinom i progresijom bolesti, analizom varijanti u grupi zdravih individua i pacijenata sa MS u populaciji Srbije
2. Analiza nivoa ekspresije *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* u MČPK i koncentracije solubilnog CD25 u plazmi periferne krvi kod pacijenata sa MS i asocijacije sa kliničkim parametrima bolesti.
3. Ispitivanje uticaja varijanti *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs12946510 na ekspresiju gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* kod zdravih individua i pacijenata sa MS.

3. Materijal i metode

3.1. Učesnici

Uzorak analiziran u ovoj studiji sastojao se od 312 zdravih individua koji su činili kontrolnu grupu i grupu od 461 pacijenta. Pacijenti uključeni u studiju su genetički nesrodne individue koje su bile dijagnostikovane i klinički okarakterisane u periodu od 2008.-2020. godine na Klinici za Neurologiju Vojnomedicinske akademije u Beogradu (VMA). Svi pacijenti su dijagnostikovani u skladu sa proširenim McDonaldovim kriterijumima (Polman i sar., 2011; Thompson i sar., 2018) i forma bolesti je klasifikovana primenom utvđenih kliničkih informacija (Lublin i sar., 1996; Lublin i sar., 2014). 374 pacijenta imala su RRMS formu bolesti u trenutku uzorkovanja, dok je 87 imalo SPMS. Od RRMS pacijenata 70 je lečeno Interferonom β , dozom od 0.25 mg Betaferon[®]-a (Bayer AG, Leverkusen, Nemačka) svaki drugi dan u periodu od barem 6 meseci. Detaljni klinički i demografski parametri prikupljeni su za ispitanike uključene u studiju, tokom pregleda neurologa. Neurološki deficit je određen primenom EDSS-a (Kurtzke, 1983). EDSS parametar opisuje trenutni stepen neurološkog deficita kroz skalu koja se kreće od 0 (u potpunosti neizmenjena neurološka funkcija) do 10 (smrt usled MS) u intervalima od 0.5.

Imajući u vidu specifičan vremenski profil MS-a i mogućnost smanjenja EDSS-a u remisiji nakon relapsa, nije dovoljno precizno koristiti EDSS za opis težine MS. U cilju poboljšanja procene težine bolesti poslednjih dvadeset godina razvijani su algoritmi korigovanja EDSS za trajanje bolesti, koja pokazuje veliku varijabilnost među pacijentima. Jedan od razvijenih sistema skorovanja je skor težine multiple skleroze (eng. *Multiple Sclerosis Severity Score*, MSSS) (Roxburg i sar. 2005) koji se najčešće primenjuje u istraživanjima MS-a. MSSS parametar opisuje težinu kliničke slike MS-a korigujući EDSS za trajanje bolesti izraženoj u godinama. Parametar osim što opisuje težinu bolesti može se koristiti za predikciju brzine akumulacije neuroloških deficita. Algoritam koji se primenjuje za određivanje individualnog MSSS je napravljen analizom istorije bolesti 9892 pacijenta iz 11 evropskih populacija (Roxburgh i sar., 2005). EDSS i MSSS su izračunati u trenutku uzorkovanja krvi. Kontrolnu grupu su činili zdrave individue koje nisu u srodstvu, bez porodične istorije MS-a,

koji su dobrovoljno pristali da učestvuju u studiji i čiji su uzorci i podaci prikupljeni tokom sistematskih i kontrolnih zdravstvenih pregleda u Institutu za nuklearne nauke „Vinča”, Institutu od nacionalnog značaja za Republiku Srbiju, i VMA.

Etički komitet VMA odobrio je studiju i prikupljane uzoraka za eksperimentalne analize. Sve individue su dobrovoljno učestvovalе nakon što su informisane o studiji i tom prilikom dali informisani pristanak za učešće.

3.2. Metode

3.2.1. Izolacija DNK iz periferne krvi primenom fenol-hloroformske metode

Genomska DNK izolovana je iz ~ 3 ml zamrznute periferne krvi skladištene na -20°C, prethodno sakupljene u vakutanerima koji koriste limunsku kiselinu ili EDTA (etilendiamidtetraacetatna kiselina) kao antikoagulirajuće agense, primenom varijacije fenol-hloroformske metode po Kunkelu (Kunkel i sar., 1977). U ovoj metodi eritrociti i citoplazmatski elementi bivaju razoreni lizogenim rastvorom. Jedra se izoluju centrifugiranjem i onda se proteolitički digestiraju kombinacijom aktivnosti proteinaze K i deterdženta natrijum dodecil sulfata (eng. *sodium dodecyl sulfate*, SDS) koji dezintegriše jedarni ovoj. DNK iz jedarnog lizata je pročišćena razdvajanjem faza fenola, hloroforma i hloroform-izoamil alkohola. Precipitacije DNK je izvršena primenom etanola i natrijum acetata i nakon sušenja taloga DNK, makromolekul je rastvoren u autoklaviranoj vodi za molekularnu biologiju (eng. *Molecular Biology Grade*, MBG).

Procedura fenol-hloroformske ekstrakcije DNK iz periferne krvi:

1. Uzorak od 3 ml krvi je otopljen i promešan sa 24 ml lizogenog rastvora (0.11 g/ml Saharoze, 10 mM TRIS-HCl pH 7.5-8, 5 mM MgCl₂, 1% Triton X-100).
2. Smeša je centrifugirana 10 minuta, rcf od 800 g na 4°C
3. Nakon odlivanja supernatanta u talog je sipano 125 µl lizacionog pufera (24 mM EDTA pH~8, 75 mM NaCl), 62.5 µl 10% SDS-a i 500 ng proteinaze K.
4. Talog je potom resuspendovan u lizirajućoj smeši i inkubiran na 37°C preko noći (10-20 sati).
5. Smešu je prebačena u sterilnu mikrocentrifugnu tubu od 1.5 ml i u nju je sipano 500 µl ekvilibrisanog fenola sa pH ~ 8, dobijena smešu je promešana invertovanjem tuba.
6. Smeša je centrifugirana 19 minuta, rcf od 12400 g na sobnoj temperaturi.
7. Gornja vodena faza je prebačena u novu sterilnu mikrocentrifugnu tubu od 1.5 ml, u nju je sipano 200 µl ekvilibrisanog fenola i 200 µl stabilisanog hloroforma, dobijena smeša je promešana invertovanjem tuba
8. Smeša je centrifugirana 19 minuta, rcf od 12400 g na sobnoj temperaturi.
9. Gornju vodena faza je prebačen u novu sterilnu mikrocentrifugnu tubu od 1.5 ml, u nju je sipano u 400 µl rastvora stabilisanog hloroforma i izolamil alkohola (24:1), dobijena smeša je promešana invertovanjem tuba.
10. Smeša je centrifugirana 19 minuta, rcf od 12400 g na sobnoj temperaturi.
11. Gornju vodena faza je prebačena u novu sterilnu mikrocentrifugnu, volumen gornje vodene faze je izmeren i sipano je po 2.1 puta veći volumen smeše apsolutnog etanola i 3M natrijum-acetata pH ~ 5 (10:1).
12. Uzorak je promešan invertovanjem dok nit precipitirane DNK nije bila jasno vidljiva.
13. Uzorak je inkubiran na -20°C najmanje sat vremena.
14. Tube sa DNK su centrifugirane 19 minuta, rcf od 12000 g na 4°C.

15. Apsolutni etanol je odliven, talog DNK je propran sa 200 µl 70% etanola (apsolutni etanol rastvoren sa MBG vodom) i ceo volumen 70% etanola je izliven pipeton.
16. Talog je isušen na 50°C dok ne postane proziran (oko 45 minuta).
17. Osušen talog je rastvoren u 100 µl autoklavirane MBG vode.
18. Uzorak je čuvan na 4°C.

3.2.2. Genotipizacija primenom PCR alelske diskriminacije bazirane na TaqMan® tehnologiji

Genetička analiza varijanti od interesa je izvršena primenom TaqMan® bazirane PCR alelske diskriminacije na aparatu 7500 Applied Biosystems Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) prema uputstvu proizvođača (Applied Biosystems, 2010a). Reakciona smeša bila je volumena od 5 µl i sadržala je 2.5 µl TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), 1.4 µl autoklavirane MBG vode, 0.1 µl adekvatnog TaqMan® Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) i 1 µl razbaženja DNK od interesa ~ 50 ng/µl. Reakcija se vrši u „bunarićima” MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), koji je osiguran primenom MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). MBG vodu koristili smo kao negativnu kontrolu. Temperaturalni profil reakcije bio je sledeći: 10 minuta na 95°C i 40 ciklusa od: 15 sekundi 95°C i 1 minuta na 60°C. Programiranje reakcija i dodeljivanje genotipova vršeno je primenom SDS softvera v1.4.1. (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD). Samo uzorci koji su zadovoljili kvalitet alelske diskriminacije veći od 95% korišćeni su za genetičku analizu. Za TaqMan® baziranu alelsku diskriminaciju korišćeni su sledeći eseji: C_16095542_10 za *IL2RA* rs2104286, C_25473867_10 za *IFI30* rs11554159, C_31651862_10 za *IKZF3* rs12946510 i esej za rs3135388, dizajniran po porudžbini (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD), koji je korišćen kao surogat varijanta za prisustvo ili odsustvo *HLA-DRB1*15:01* varijante MHC II kompleksa (Živković i sar., 2009).

3.2.3. Izdvajanje MČPK iz periferne krvi

MČPK su izdvojene iz periferne krvi primenom centrifugiranja u gradijentu fikola iz sveže krvi koja je prikupljena u vakutanerima koji primenjuju EDTA kao antikoagulirajući agens (V ~ 3ml). Fikol ima dvostruku ulogu: taloženje eritrocita i proizvodnja gradijenta koncentracije koji daje jasnu lako izdvojivu fazu MČPK. Kao izvor gradijenta fikola korišćen je Lymphocyte Separation Medium, LSM 1077, PAA (GE Healthcare, Chicago, IL, SAD) gustine 1.077 g/ml.

Procedura za izdvajanje MČPK iz sveže periferne krvi gradijentom fikola:

1. Uzorak od 3 ml krvi je prebačen u sterilisanu epruvetu i krv je razblažena sa istim volumenom fiziološkog rastvora (NaCl 9 g/L), smeša je promešana laganim invertovanjem.
2. 3 ml separacionog medijuma baziranog na fikolu je sipano u sterilnu tubu za centrifugiranje i onda je, polako i pažljivo, uz zid tube sipana razblažena krv (želimo izbeći mešanje separacionog medijuma i razblažene krvi).
3. Tuba sa medijumom i krvlju je centrifugirana 20 minuta, rcf od 800 g na sobnoj temperaturi.
4. Bela interfaza, koja se nalazi između iztalozenih eritrocita i providne faze, je prebačena u novu sterilnu tubu za centrifugiranje i 6 ml fiziološkog rastvora je dodato.
5. Tuba je centrifugirana 10 minuta, rcf od 250 g na sobnoj temperaturi.
6. Na dnu tube se nalazi talog MČPK, fiziološki rastvor je odliven i ćelije su resuspendovane u fiziološkom rastvoru koji preostane u tubi, ili je izolacija RNK iz MČPK odmah početa ili je talog zamrznut primenom tečnog azota i čuvan na -80°C do izolacije RNK.

3.2.4. Izolacija RNK iz MČPK primenom TRI Reagent-a

RNK iz MČPK koje su izdvojene iz sveže krvi je izolovana metodom baziranoj na primeni TRI Reagent Solution®-a (Ambion, Austin, TX, SAD). TRI Reagent je rastvor guanidijum-tiocijanata i kiselog fenola. Jedna od glavnih karakteristika ovog rastvora je ta da se može istovremeno primeniti za izolaciju RNK, DNK i proteina iz uzorka tkiva ili ćelija. Guanidijum-tiocijanat se koristi zbog svoje sposobnosti da denaturiše proteina što dovodi do taloženja proteina u organskoj fazi i zaštite nukleinskih kiselina od efekata nukleaza usled inaktivacije istih. Kiseli fenol (pH ~ 4-6) se koristi za razdvajanje DNK i RNK, budući da DNK u kiseloj sredini gubi nalektrisanje fosfatne grupe i rastvorljivost u vodi, dok RNK na istoj pH i dalje ostaje hidrofilna tako da se raspoređuje u vodenoj fazi. Uz dodatak hloroforma i posle centrifugiranja stvaraju se dve distinktno faze i interfaza: fenolna donja organska faza u kojoj se predominantno nalaze proteini i lipidi, bela međufaza u kojoj je predominantno DNK i hloroformska gornja vodena faza u kojoj je rastvorena RNK. RNK iz vodene faze je posle toga pročišćena primenom izopropanola i etanola. Nakon toga RNK se prosuši, rastvori u Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) (Ambion, Austin, TX, SAD) i skladišti na -80°C do daljnjeg korišćenja.

Procedura za izolaciju RNK iz MČPK primenom TRI Reagent Solution®:

1. U tubu sa resuspendovanim MČPK sipano je 1 ml TRI Reagent-a, rastvor je promešan pipetom i inkubiran 5 minuta na sobnoj temperaturi.
2. Smeša sa TRI Reagent-om i MČPK je prebačana u sterilnu mikrocentrifugnu tubu od 1.5 ml.
3. Sipano je 200 µl stabilisanog hloroforma, smeša je promešana invertovanjem i inkubirana je na sobnoj temperaturi 15 minuta.
4. Smešu je centrifugirana 15 minuta, rcf od 12000 g na 4°C.
5. Gornja vodena faza je prebačena u novu sterilnu mikrocentrifugnu tubu od 1.5 ml, dodato 500 µl izopropanola, sipato je 20 µg MBG glikogena i uzorak je inkubiran na sobnoj temperaturi 10 minuta.
6. Uzorak je inkubiran na -20°C barem sat vremena.
7. Uzorak je centrifugiran 8 minuta, rcf od 12000 g na 4°C.
8. Izopropanol je odliven, dodano 1 ml 75% etanola (apsolutni etanol rastvoren sa vodom bez nukleaza) i talog RNK je odvojen od zida tube invertovanjem.
9. Uzorak je centrifugiran 5 minuta, rcf od 7500 g na 4°C.
10. Etanol je pažljivo odliven, dodato 1 ml 75% etanola i talog RNK je odvojen od zida tube invertovanjem.
11. Uzorak je centrifugiran 5 minuta, rcf od 7500 g na 4°C.
12. Etanol je odliven (u potpunosti, rezidualni etanol se može izbaciti pipetom) i talog je osušen na 37°C dok ne postane providan (oko 30 minuta).
13. RNK je rastvorena sa 25 µl vode bez nukleaza.
14. Uzorak je čuvan na -80°C.

3.2.5. Analiza koncentracije i čistoće izolovane DNK i RNK na NanoDrop™ 1000 mikrovolumenskom UV spektrofotometru

Analize prinosa i čistoće izolovanih uzoraka DNK i RNK utvrđena je UV spektrofotometrijskom metodom primenom aparata NanoDrop™ 1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific,

Waltham, MA, SAD). Princip UV spektrofotometrije podrazumeva analizu apsorbanci alikvota uzorka na talasnim dužinama od 260, 230 i 280 nm i korišćenje dobijenih apsorbanci za izračunavanja koncentracije nukleinskih kiselina u uzorku i analiza odnosa apsorbanci za informacije o potencijalnim kontaminacijama koje bi mogle negativno da utiču na nizvodnu aplikaciju uzorka. Pre početka merenja uzoraka neophodno je odrediti apsorbanu rastvarača („blank”) u kojoj su nukleinske kiseline rastvorene (MBG voda ili voda bez nukleaza), vrednosti apsorbanci rastvarača se automatski oduzimaju od sirovih dobijenih vrednost apsorbanci i izvedene apsorbance se analiziraju kao apsorbance molekula od interesa (Thermo Fisher Scientific, 2010). Koncentracija DNK i RNK u uzorku se dobijaju analizom apsorbanci na talasnoj dužini od 260 nm (A_{260}) budući da je to talasna dužina koju nukleobaze maksimalno apsorbuju. Apsorbanca na 230 (A_{230}) se primenjuje za analizu kontaminacije izazvane organskim jedinjenima poput fenola, etanola, guanidina i gikogena, ali ova apsorbanca takođe detektuje i peptidne veze, dok se apsorbanca na 280 (A_{280}) koristi za analizu kontaminacije proteinima i aminokiselinama (ali takođe i fenolom budući da 280 nm je maksimum apsorbcije aromatičkih hemijskih grupa koje su sadržane od strane fenilalanina, triptofana, tirozina i fenola).

3.2.6. Fluorimetrijska analiza koncentracije RNK na Invitrogen™ Qubit™ 3 fluorimetru

Neposredno pre nizvodne aplikacije uzoraka, izvršeno je merenje koncentracije RNK primenom fluorimetrijske metode. U ovu svrhu korišćen je AccuBlue® Broad Range RNA Quantitation Kit (Biotium, Fremont, CA, USA) na aparatu Invitrogen™ Qubit™ 3 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD), na način predviđen od strane proizvođača (www.biotium.com/wp-content/uploads/2018/06/PI-31073.pdf, Thermo Fisher Scientific, 2014). Princip metode je baziran na analizi fluorescencije kompleksa fluoroboje i ciljanog makromolekula. Fluoroboja se specifično vezuje za RNK i kompleksa fluoroboja-RNA se ekscitira svetlošću specifične talasne dužine (630nm) koja dovodi do oslobađanja fluorescentnog signala fluoroboje vezane za RNK (670nm). Koncentracije RNK je izračunata shodno intenzitetu fluorescentnog signala.

3.2.7. Digestija genomske DNK iz RNK uzorka i reverzna transkripcija iRNK

Urađena je reverzna transkripcija iRNK iz uzorka izolovane RNK u odnosu 1:1 pre analize ekspresije ciljnih iRNK. Procedura je podrazumevala 2 koraka: degradacija rezidualne DNK primenom DNaze I i reverzna transkripcija iRNK primenom oligodT₁₈ oligomera kao prajmera i reverzne transkriptaze kao cDNK sintetišućeg enzima. Ulazna količina cele RNK za DNK digestiju je bila 500 ng. Digestija rezidualne DNK je izvršena primenom enzima DNase I, RNase-free (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD) u kombinaciji sa hemikalijama preporučenim od strane proizvođača: 10X Reaction Buffer with MgCl₂ koji je izvor Mg²⁺ za enzimsku funkciju DNaze I, 50 mM EDTA čija je svrha heliranje Mg²⁺ onemogućavajući Mg²⁺ katalizovanu neenzimsku degradaciju RNK na višim temperaturama (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) i Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) (Ambion, Austin, TX, USA) koja se koristi za razblaživanje uzorka RNK. Nakon DNK digestije urađena je reverzna transkripcija svih RNK sa poliA repom primenom RevertAid™ RT Kit-om (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, SAD). Komponente kita su: RevertAid RT koji vrši reverznu transkripciju, RiboLock RNase Inhibitor koji inhibira aktivnost RNaze štiteći integritet RNK uzorka, 10 mM dNTP Mix kao izvor dNTP-ova za cDNK sintezu, Oligo(dT)₁₈ primer kao prajmer za sintezu cDNK i Nuclease-Free Water (not DEPC-Treated) (Ambion, Austin, TX, SAD). Digestija DNK i reverzna transkripcija RNK sa poliA repom je urađena u skladu sa procedurom i protokolom preporučenim od strane proizvođača (Thermo Fischer Scientific 2013).

3.2.8. Analiza relativne ekspresije ciljnih iRNK primenom TaqMan® metodologije

Nivo ekspresije ciljnih iRNK je bio analiziran primenom relativne kvantifikacije baziran na TaqMan® PCR-u u realnom vremenu na aparatu 7500 Applied Biosystems Real-Time PCR system (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD) u skladu sa preporukama proizvođača (Applied Biosystems, 2010b). Metoda je bazirana na analizi porasta nivoa fluorescencije u reakcionoj smeši tokom PCR-a u realnom vremenu izazvanog degradacijom TaqMan® probe, koja se komplementarno sparuje sa cDNK metom, egzonukleaznom aktivnošću Taq polimeraze. Glavni parametar koji se izvodi iz detektovanih promena u nivou fluorescencije je Ct (eng. *Threshold cycle*) koji označava broj ciklusa PCR-a pri kojem je nivo fluorescencije značajno porastao u odnosu na bazalnu fluorescenciju reakcione smeše pre PCR-a, čineći ovaj parametar invertno proporcijalnim količini ciljne cDNK u reakcionoj smeši. U eksperimentu relativne kvantifikacije, pored Ct vrednosti ciljnih cDNK, neophodno je dobiti i Ct vrednosti endogenih kontrolnih cDNK. Endogene kontrole su RNK koje se eksprimiraju na visokom nivou i konstitutivno u svim ćelijama analiziranog organizma. Svrha endogenih kontrola u TaqMan® baziranoj relativnoj kvantifikaciji je normalizacija količine ciljne RNK (odnosno cDNK) u kontekstu količine ćelija ili tkiva koje su ušle u izolaciju RNK omogućavajući poređenje ekspresija između uzoraka. PCR reakcija je rađena u „bunarićima” MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, SAD), koji je osiguran MicroAmp™ Optical Adhesive Film (Applied Biosystems, Foster City, California, USA), u 12.5 µl reakcione smeše koja se sastojala od 6.25 µl TaqMan™ Universal Master Mix II, no UNG (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD), 0.625 µl TaqMan® eseja, 4.625 µl autoklavirane MBG vode i 1 µl cDNK. Temperaturalni profil PCR reakcije je bio 10 minuta na 95°C i 40 ciklusa: 15 sekundi na 95°C i minut na 60°C. Programiranje PCR reakcije i analiza Ct vrednosti je urađena na SDS softveru v1.4.1. (Applied Biosystems, Foster City, California, SAD). Svi uzorci su bili rađeni u duplikatu i srednje Ct vrednosti su uzete u obzir za daljnje analize. Vrednosti nivoa relativne ekspresije gena od interesa se izražavaju formulom:

$$\text{Relativna ekspresija ciljne iRNK} = 2^{-(\text{Srednja vrednost Ct ciljne iRNK} - \text{Srednja vrednost Ct endogene kontrole})}$$

Kao endogena kontrola je odabrana iRNK za gen *PPIA* (eng. *Peptidylprolyl isomerase A*, poznat i kao *Ciklofilin A*). Sledeći eseji su korišćeni za TaqMan® bazirani relativnu kvantifikaciju ciljnih cDNK: Hs00918021_m1 za *ORMDL3*, Hs00218565_m1 za *GSDMB*, Hs00232635_m1 za *IKZF3* i Hs99999904_m1 za *PPIA*. Statistički značajni rezultati analize relativne ekspresije iRNK su izraženi kao stepen promene (eng. *fold change*).

3.2.9. Izolacije plazme iz periferne krvi

Plazma iz periferne krvi je izolovana centrifugiranjem 3 ml sveže periferne krvi, sakupljene u vakutanerima sa EDTA kao antikoagulišućim agensom, u roku od 30 minuta od sakupljanja.

Procedura izolacije plazme iz periferne krvi:

1. Krv u vakutaneru je promešana laganim inverovanjem 5 puta.
2. Vakutaner sa krvlju je centrifugiran 15 minuta, rcf od 1000 g na 4°C.
3. Gornju providna faza je prebačena u sterilne mikrocentrifugne tube, plazma je čuvana na -80°C do daljnjeg korišćenja.

3.2.10. Analiza koncentracije proteina u plazmi primenom „sendvič” ELISA-e

Analiza koncentracije solubilnog proteina od interesa je merena „sendvič” ELISA metodom (eng. *enzyme-linked immunosorbent assay*) primenom FineTest® Human CD25 (Interleukin 2 Receptor Alpha) ELISA Kit (Wuhan Fine Biotech, Wuhan, Kina) na način preporučen od strane proizvođača (Wuhan Fine Biotech, 2022). „Sendvič” ELISA je bazirana na kolorimetrijskoj analizi promene boje supstrata od strane enzima asociranog sa reporterskim antitelom, vezanim za protein koji je prihvaćen hvatačkim antitelom. Prvi korak je vezivanje proteina za hvatačko antitelo. Optički „bunarići” su obloženi poznatom gustinom monokonalnih hvatačkih antitela specifičnih za epitop proteina od interesa, uzorci se inkubiraju sa hvatačkim antitelima i nevezani proteini bivaju isprani. U sledećem koraku se vezuju konjugovana reporterska antitela za drugi epitop proteina (u slučaju korišćenog kita antitelo je konjugovano sa biotinom), nakon inkubiranja, bunarići budu proprani zarad eliminacije nevezanih reporterskih antitela. Nakon toga, konjugovani enzim (peroksidaza rena konjugovana sa streptavidinom) se inkubira u „bunarićima”, dovodeći do vezivanja kompleksa enzima i kompleksa reporterskog antitela (jakom nekovalentnom interakcijom biotina i streptavidina), nakon toga nevezani kompleksi enzima bivaju uklonjeni ispiranjem omogućavajući da intenzitet enzimske reakcije bude proporcijalan incijalnoj količini proteina sipanoj u „bunarić”. Finalno, u bunariće sa enzimom introdukuje se supstrat enzimske reakcije (3,3',5,5'-tetrametilbenzidin) koji biva enzimski izmenjen proizvodeći obojeni produkt reakcije (peroksidaza uklanja 2 vodonika na ugljuvodoničnoj vezi između benzidinskih prstena čineći susprtat plavim), susprtat se inkubira precizno definisan vremenski period i reakcija se zaustavlja sipanjem zaustavljajućeg rastvora (u slučaju korišćenog kita kiseo rastvor koji boji plavu boju reakcione smeše u žutu). Optičke gustine obojenih „bunarića” su analizirane na spektrofotometru Perkin Elmer Wallac 1420 Victor2 Microplate Reader (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Optička gustina bunarića je analizirana na 450 nm dok je talasna dužina od 540 nm korišćena za korekciju. Pored uzoraka, analizirana je optička gustina „blanka” i serijskih razblaženja razblaženih u skladu sa instrukcijama proizvođača (Wuhan Fine Biotech, 2022). Uzorci su puštani kao 4X razblaženje. Dobijene vrednosti optičkih gustina su korigovane tako što je od njih oduzet blank, korigovane vrednosti su korišćene za izračunavanje koncentracija proteina. Blank i serijska razblaženja su rađena u duplikatu i njihove srednje vrednosti su uzete za pravljenja standardne krive, dok su uzorci rađeni u monoplukatu. Nakon dobijanja vrednosti optičkih gustina koncentracije uzoraka su izračunate internet programom MyAssays Online (www.myassays.com) primenom petoparametarske logističke regresije.

3.2.11. Statistička obrada podataka

Eksperimentalni rezultati su analizirani primenom statističkog programskog paketa Statistica verzija 8 (StatSoft, Palo Alto, CA, USA). Parametri koji su analizirani su činili kontinualne (poput ekspresije gena, starosti pri nastanku bolesti, EDSS i MSSS) i kategorijske (parametri poput genotipa, MS-a i forme bolesti) varijable. Vrednosti verovatnoće (p) manje od 0.05 su smatrane statistički značajnim osim u slučajevima kada su primenjene korekcije na veći broj poređenja (u tom slučaju statistički značajna p vrednost je određena testom kojim se vrši korekcija). Snaga asocijacije se izražava i kroz Odnos verovatnoća (eng. *Odds ratio*, OR) sa Intervalom poverenja od 95% (eng. *Confidence interval*, CI). Statistička snaga rezultata je analizirana primenom odgovarajućih testova (www.clinicalcalc.com/stats/Power.aspx).

Sledeći statistički testovi su korišćeni u analizi rezultata:

- **Pearson's χ^2 test:** je korišćen za analizu razlika u raspodeli kategorijske varijable između grupa.

- **Binomna logistička regresija:** je korišćena za analizu razlika u raspodeli kategorijske varijable između 2 grupe, korigovane efektima drugih varijabli.
- **Multinomna logistička regresija:** je korišćena za analizu razlika u raspodeli kategorijske varijable između 3 ili više grupa korigovane efektima drugih varijabli.
- **Shapiro-Wilk's W test i Kolmogorov-Smirnov test:** su korišćeni za analize normalnosti distribucije kontinualnog parametra u grupama.
- **Studentov T test:** je korišćen za poređenje vrednosti kontinualnog parametra između 2 grupe, pod uslovom da je raspodela kontinualnog parametra normalna u obe grupe.
- **Mann-Whitney U test:** je korišćen za poređenje vrednosti kontinualnog parametara između 2 grupe, pod uslovom da raspodela kontinualnog parametra u jednoj ili u obe grupe nije normalna.
- **Jednosmerna ANOVA:** je korišćena za analizu razlike u varijansi kontinualnog parametra između 3 ili više grupa, pod uslovom da je raspodela kontinualnog parametra normalna u svim grupama.
- **Fisher LSD post-hoc test:** je korišćen za utvrđivanje doprinosa statističkoj značajnosti jednosmerne ANOVA-e.
- **Kruskall-Wallis ANOVA:** je korišćena za analizu razlike u varijansi kontinualnog parametra između 3 ili više grupa, pod uslovom da raspodela kontinualnog parametra nije normalna u jednoj ili više grupa.
- **Test višestrukog poređenje srednjih rangova za sve grupe:** je korišćen za utvrđivanje doprinosa statističkoj značajnosti Kruskall-Wallis ANOVA-e.
- **Faktorijalna ANOVA:** je korišćena za analizu kombinovanog efekta dve ili više kategorijskih nezavisnih varijabli na varijansu jedne zavisne kontinualne varijable.
- **Pearson produkt-moment test korelacije:** je korišćen za analizu korelacije dve ili više kontinualnih varijabli u jednoj grupi, pod uslovom da su sve varijable u normalnoj raspodeli.
- **Spearman R test koeficijenta korelacije ranga:** je korišćen za analizu korelacije dve ili više kontinualnih varijabli u jednoj grupi, ukoliko jedna ili više varijabli nemaju normalnu distribuciju.
- **Bonferroni korekcija:** je korišćena za korekciju značajnosti rezultata koje nastaju usled višestrukog poređenja.
- **Post-hoc analiza snage rezultata:** je korišćena za analizu statističke snage rezultata primenom javno dostupnog kalkulatora, ClinCalc Post-Hoc Power Calculator (www.clincalc.com/stats/Power.aspx).

4. Rezultati

4.1. Demografske i kliničke karakteristike učesnika

Demografske i kliničke karakteristike učesnika koji su uključeni u genetičku analizu prikazane su u tabeli R1, učesnika koji su uključeni u analizu relativne ekspresije iRNK iz MČPK su prikazani u tabeli R2, a učesnika koji su uključeni u analizu koncentracije CD25 iz plazme su u tabeli R3.

Tabela R1: Demografske i kliničke karakteristike svih učesnika genetičkih analiza.

	Kontrole (n = 312)	Pacijenti (n = 461)	p	RRMS (n = 374)	SPMS (n = 87)	p
Starost (godine)	43.9 ± 11.8	38.0 ± 10.2	< 0.01 [*]	36.7 ± 9.6	44.3 ± 10.6	< 0.01 [#]
Pol, % žena	49.7	60.30	< 0.01 ^{&}	60.4	59.2	0.82 ^{&}
Starost na početku bolesti		30.3 ± 9.0		30.1 ± 8.9	31.10 ± 9.1	0.33 [*]
EDSS		3.23 ± 1.83		2.61 ± 1.24	5.98 ± 1.45	< 0.01 [#]
MSSS		4.94 ± 2.43		4.44 ± 2.25	7.05 ± 2.02	< 0.01 [#]
Interferon β terapija		70		70		

RRMS – Relapsno remitentna multipla skleroza; SPMS – Sekundarno progresivna multipla skleroza; EDSS – (eng. *Expanded Disability Status Scale*) parametar koji opisuje trenutni nivo neurološkog deficita; MSSS – (eng. *Multiple Sclerosis Severity Score*) parametar koji opisuje težinu bolesti; [&]Pearson's χ^2 test; [#]Mann-Whitney U test; ^{*}Student's T test; p < 0.05 se smatra statistički značajnim.

Tabela R2: Demografske i kliničke karakteristike učesnika koji su uključeni u analizu ekspresije iRNK.

	Pacijenti (n = 67)	Kontrole (n = 50)	p	Relaps pacijenti (n = 15)	Remisija pacijenti (n = 52)	p	IFN-β- (n = 17)	IFN-β+ (n = 35)	p
Žene/muškarci	37/30	33/17	0.23 ^{&}	9/6	28/24	0.67 ^{&}	11/6	17/18	0.27 ^{&}
Starost (godine)	39.2 ± 10.0	36.6 ± 10.2	0.13 [#]	32.2 ± 8.0	40.9 ± 9.8	0.006 [*]	42.8 ± 7.9	39.9 ± 10.5	0.32 [*]
EDSS	2.55 ± 1.22			2.29 ± 1.44	2.61 ± 1.17	0.24 [#]	2.71 ± 1.27	2.56 ± 1.13	0.73 [#]
MSSS	4.41 ± 2.12			4.10 ± 2.22	4.48 ± 2.11	0.58 [*]	4.44 ± 2.68	4.51 ± 1.79	0.91 [*]

IFN-β- – pacijenti u remisiji koji ne primaju terapiju; IFN-β+ – pacijenti u remisiji koji primaju isključivo Interferon β; EDSS (eng. *Expanded Disability Status Scale*) – parametar koji opisuje trenutni nivo neurološkog deficita; MSSS (eng. *Multiple Sclerosis Severity Score*) – parametar koji opisuje progresiju bolesti; [&]Pearson's χ^2 test; [#]Mann-Whitney U test; ^{*}Studentov T test; p < 0.05 se smatraju statistički značajnim.

Tabela R3: Demografske i kliničke karakteristike učesnika uključenih u biohemijsku analizu proteina od interesa.

	Pacijenti (n = 55)	Kontrole (n = 21)	p	IFN-β- (n = 15)	IFN-β+ (n = 33)	p
Žene/muškarci	34/21	16/5	0.24 ^{&}	10/5	19/14	0.55 ^{&}
Starost (godine)	42.6 ± 8.9	37.5 ± 11.2	0.06 [*]	45.6 ± 5.9	41.4 ± 10.0	0.14 [*]
EDSS	2.74 ± 1.26			2.83 ± 1.34	2.7 ± 1.24	0.81 [#]
MSSS	4.46 ± 2.05			4.29 ± 2.31	4.55 ± 1.95	0.73 [*]

IFN-β- – pacijenti u remisiji koji ne primaju terapiju; IFN-β+ – pacijenti u remisiji koji primaju isključivo Interferon β; EDSS (eng. *Expanded Disability Status Scale*) – parametar koji opisuje trenutni nivo neurološkog deficita; MSSS (eng. *Multiple Sclerosis Severity Score*) – parametar koji opisuje progresiju bolesti; [&]Pearson's χ^2 test; ^{*}Studentov T test; [#]Mann-Whitney U test; $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.

4.2. Asocijacija genetičkih varijanti *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs12946510 sa rizikom za nastanak multiple skleroze

Učestalosti alela i genotipova varijanti od interesa u grupi kontrola i pacijenata prikazani su u tabeli R4. Učestalosti genotipova u kontrolnoj grupi nisu odstupale od Hardy-Weinberg-ove ravnoteže (Pearson's χ^2 test: $p_{rs2104286} = 0.3$; $p_{rs11554159} = 0.33$; $p_{rs12946510} = 0.98$). Ređi alel *IL2RA* rs2104286, alel G, je statistički značajno manje zastupljen kod pacijenata (17%) nego kod kontrola (23%) (Binomna logistička regresija, $p = 0.004$, OR = 0.69, 95% CI = 0.53-0.88). Usled niske učestalosti *IL2RA* rs2104286 GG homozigota analiza asocijacije genotipova sa rizikom za nastanak MS je izvršena primenom dominantnog genetičkog modela (AA vs. AG + GG; tabela R5). *IL2RA* rs2104286 alel G (AG + GG) je po dominantom genetičkom modelu bio statistički značajno asociiran sa nižim rizikom za nastanak MS (Binomna logistička regresija, $p = 0.004$, OR = 0.64, 95% CI = 0.47-0.87; korigovan na pol $p = 0.003$, OR = 0.63, 95% CI = 0.47-0.86). Izračunata snaga rezultata je 82.8%, za p vrednost od ≤ 0.05 .

Genotipovi i aleli varijanti *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs12946510 nemaju statistički značajnu asocijaciju sa rizikom za nastanak MS po bilo kom genetičkom modelu (pojedinačni genotipovi, dominantni ili recesivni). U modelu binomijnane logističke regresije korigovanom na pol i *IL2RA* rs2104286 varijantu, TT genotip *IKZF3* rs12946510 (prema recesivnom genetičkom modelu CC + CT vs. TT) je nominalno asociiran sa povišenim rizikom za RRMS (kad poredimo RRMS grupu sa celom grupom kontrola; Binomna logistička regresija, $p = 0.033$, OR = 1.53, 95% CI = 1.03-2.27; granica p vrednosti za Bonferroni korekciju ≤ 0.008).

Tabela R4: Učestalosti genotipova i alela genetičkih varijanti *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs12946510 u grupi pacijenata sa MS i kontrolnoj grupi.

Varijanta	Genotip	Kontrola n (%)	Pacijenti n (%)	OR 95% CI	p
		n = 312	n = 461		
<i>IL2RA</i> rs2104286	AA	188 (60.3)	324 (70.3)	Ref.	
	AG	102 (32.7)	114 (24.7)	0.65 (0.47–0.89)	0.008
				0.64 (0.46–0.89)*	0.008*
	GG	22 (7.0)	23 (5.0)	0.61 (0.33–1.12)	0.11
	Alel A	0.77	0.83	Ref.	
	Alel G	0.23	0.17	0.69 (0.53–0.88)	0.004
<i>IFI30</i> rs11554159	GG	193 (61.9)	273 (59.2)	Ref.	
	GA	99 (31.7)	162 (35.2)	1.15 (0.84–1.59)	0.38
	AA	20 (6.4)	26 (5.6)	0.94 (0.50–1.76)	0.84
	Alel G	0.78	0.77	Ref.	
	Alel A	0.22	0.23	1.05 (0.83–1.34)	0.67
<i>IKZF3</i> rs12946510	CC	113 (36.2)	161 (35)	Ref.	
	CT	148 (47.4)	200 (43.3)	0.95 (0.69–1.31)	0.74
	TT	51 (16.4)	100 (21.7)	1.37 (0.90–2.07)	0.14
	Alel C	0.60	0.57	Ref.	
	Alel T	0.40	0.43	1.15 (0.93–1.41)	0.19

OR – odnos šansi; CI – interval poverenja; svi rezultati su dobijeni primenom binominalne logističke regresije; * rezultati Binomne logističke regresije korigovane na pol; vrednosti $p < 0.05$ su smatrane statistički značajnim.

Tabela R5: Asocijacija varijante *IL2RA* rs2104286 sa rizikom za nastanak MS.

Genotip <i>IL2RA</i> rs2104286	Kontrole, n (%)	Pacijenti, n (%)	OR (95% CI)	p
	n = 312	n = 461		
AA	188 (60.3)	324 (70.3)	0.64 (0.47–0.87)	0.004
AG + GG	124 (39.7)	137 (29.7)	0.63 (0.47–0.86)*	0.003*

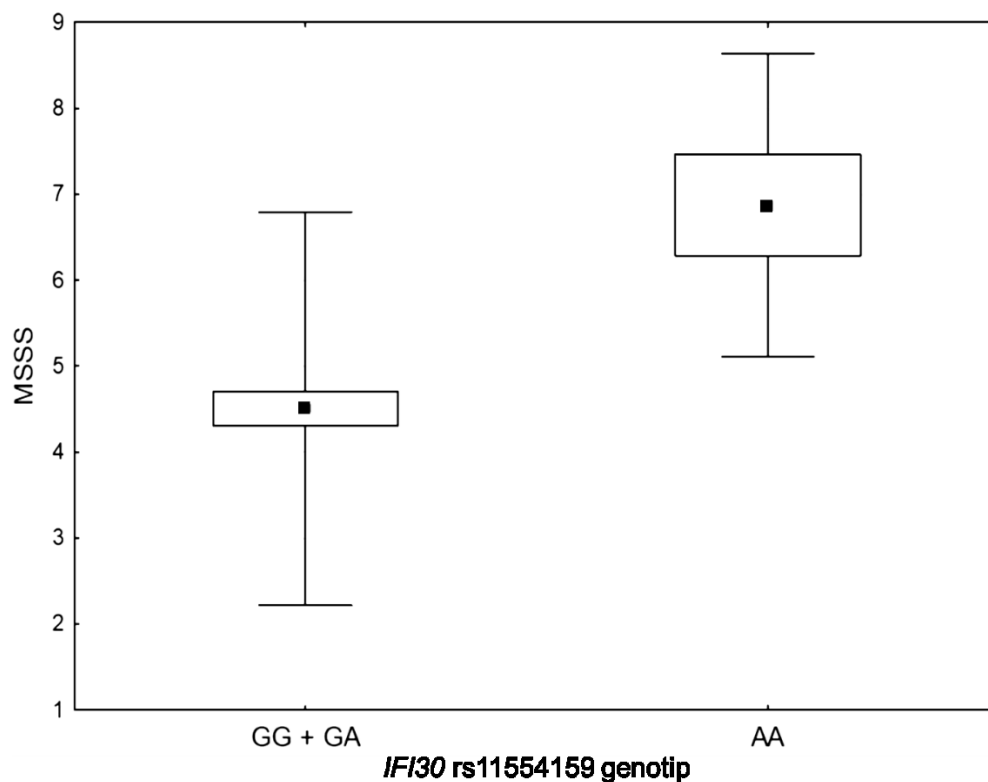
OR - odnos šansi; CI – interval poverenja; svi rezultati su dobijeni primenom binominalne logističke regresije; * rezultati Binomne logističke regresije korigovane na pol; statistička analiza izvršena po dominantnom genetičkom modelu *IL2RA* rs2104286; vrednosti $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.

4.3. Asocijacija genetičkih varijanti *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs12946510 sa kliničkim parametrima multiple skleroze

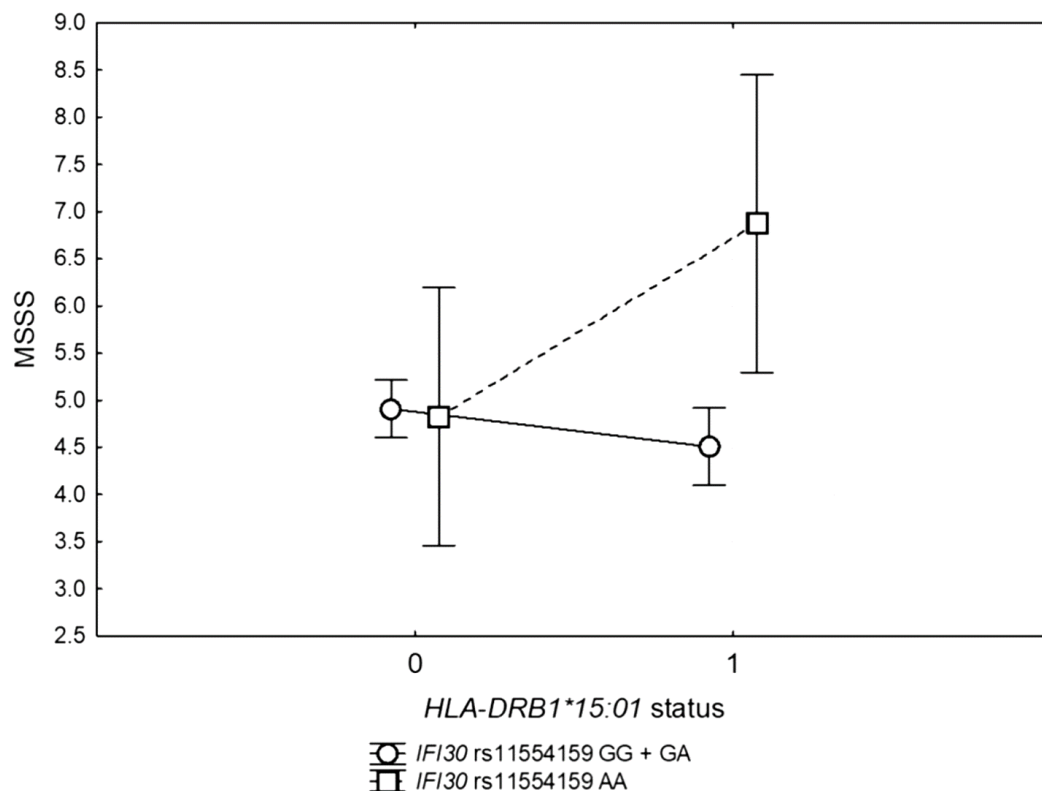
IFI30 rs11554159 AA ređi homozigot, je asociiran sa većim MSSS-om kod pacijenata nosioca *HLA-DRB1*15:01* varijante MHC II primenom recesivnog genetičkog modela (GG + GA vs. AA) u odnosu na AA homozigot (Mann-Whitney U test, $p = 0.003$, MSSS: GG + GA = 4.52 ± 2.27 , AA = 6.87 ± 1.76) (grafikon R1) (post-hoc snaga rezultata 85.3%, za p vrednost od ≤ 0.05). Zasebno smo analizirali grupu pacijenata koji ne primaju Interferon β terapiju da bi ispitali potencijalni uticaj terapije na prethodno navedeni rezultat i utvrdili smo da je asocijacija *IFI30* rs11554159 sa većim MSSS-om ostala statistički značajna (Mann-Whitney U test, $p = 0.007$). Analiza faktorijalnom ANOVA-om je pokazala asocijaciju *IFI30* rs11554159 genotipa sa vrednošću MSSS ($p = 0.037$) i kombinovan efekat *HLA-DRB1*15:01* varijante i *IFI30* rs11554159 po recesivnom modelu na vrednost MSSS (Univarijantni test značajnosti: $p = 0.026$, stepeni slobode 1; $F = 5.00$) i odsustvo statistički značajnog efekta *HLA-DRB1*15:01* varijante na vrednost MSSS (grafikon R2). Nije utvrđena interakcija između *IFI30* rs11554159 genotipa po recesivnom modelu i forme bolesti (RRMS-SPMS) na vrednost MSSS u grupi pacijenata nosilaca ređeg alela u *HLA-DRB1*15:01* (Univarijantni test značajnosti: $p = 0.077$, stepeni slobode 1, $F = 0.98$).

IKZF3 rs12946510 alel T, prema dominantnom modelu (CC vs. CT + TT), je imao nominalnu asocijaciju sa kasnijim nastankom bolesti (Mann-Whitney U test: $p = 0.035$ CC = 29.1 ± 8.1 godina, CT + TT = 31.2 ± 9.3 godina; granica p vrednosti za Bonferroni korekciju $p \leq 0.008$).

Nije utvrđena značajna asocijacija genetičke varijante *IL2RA* rs2104286 sa starošću na početku bolesti i kliničkim parametrima neurološkog deficita i progresije bolesti, EDSS, MSSS, i formom bolesti.



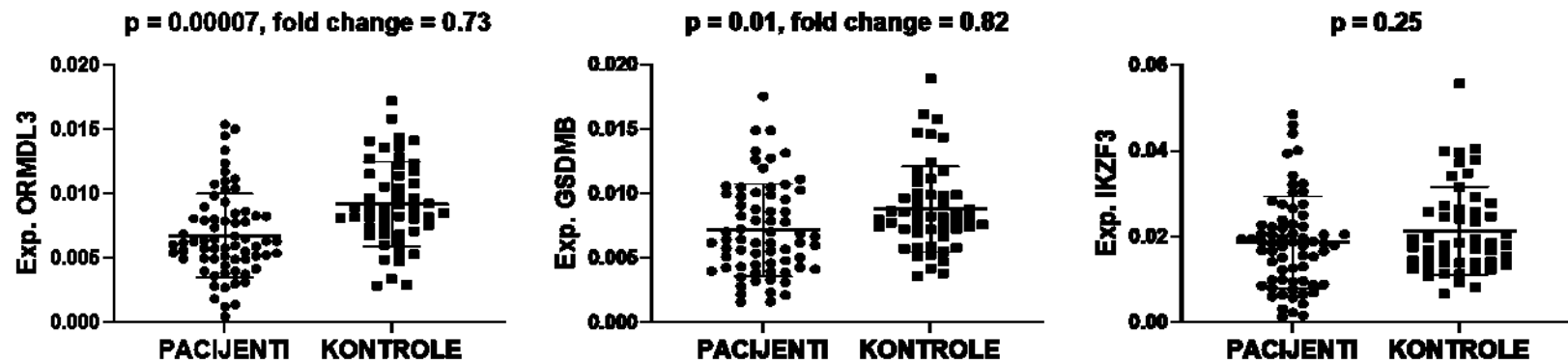
Grafikon R1: Vrednosti MSSS po *IFI30* rs11554159 recesivnom genetičkom modelu u grupi pacijenata nosilaca *HLA-DRB1:15*01* varijante MHC II. Pacijenti sa genotipom AA su imali statistički značajno veći MSSS ($n = 10$; 6.87 ± 1.76) u odnosu na pacijente nosioce alela G ($n = 134$; 4.52 ± 2.27), Mann-Whitney U test $p = 0.003$; vrednosti $p \leq 0.008$ su smatrane statistički značajnim (zbog primene Bonferroni korekcije za višestruka poređenja). Vrednosti su predstavljene kao srednja vrednost $\pm$ standardna greška (pravougaonici) i $\pm$ standardna devijacija (horizontalne crte).



Grafikon R2: Kombinovani efekat *HLA-DRB1*15:01* MHC II varijante i *IFI30* rs11554159 genetičke varijante po recesivnom genetičkom modelu na MSSS, u celoj grupi MS pacijenata. Faktorijsalna ANOVA, Univarijantni test značajnosti $p = 0.0026$ (stepeni slobode 1, $F = 5.00$). 0 - pacijenti bez *HLA-DRB1*15:01* varijante; 1 – pacijenti sa *HLA-DRB1*15:01* varijantom. Vertikalne crte označavaju 95% intervale poverenja, krugovi i kvadrati označavaju srednje vrednosti.

4.4. Asocijacija nivoa relativne ekspresije iRNK *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* iz MČPK sa MS-om

U grupi pacijenata sa RRMS nivoi ekspresije iRNK gena *ORMDL3* i *GSDMB* bile su značajno niže u odnosu na zdrave kontrole, sa fold change-om od 0.73 za *ORMDL3* (Mann-Whitney U test: $p = 7 \times 10^{-5}$) i stepenom promene od 0.82 za *GSDMB* (Mann-Whitney U test: $p = 0.01$). Nije utvrđena statistički značajna asocijacija relativne ekspresije iRNK *IKZF3* sa MS-om (Mann-Whitney U test: $p = 0.25$). Za p vrednost od ≤ 0.016 izračunata post-hoc statistička snaga studije je bila iznad 80%. Nije utvrđen statistički značajan efekat pola na asocijaciju ekspresije ciljnih gena i MS-a (Faktorijsalna ANOVA, rezultat nije prikazan). Rezultati su prikazani na grafikonu R3.



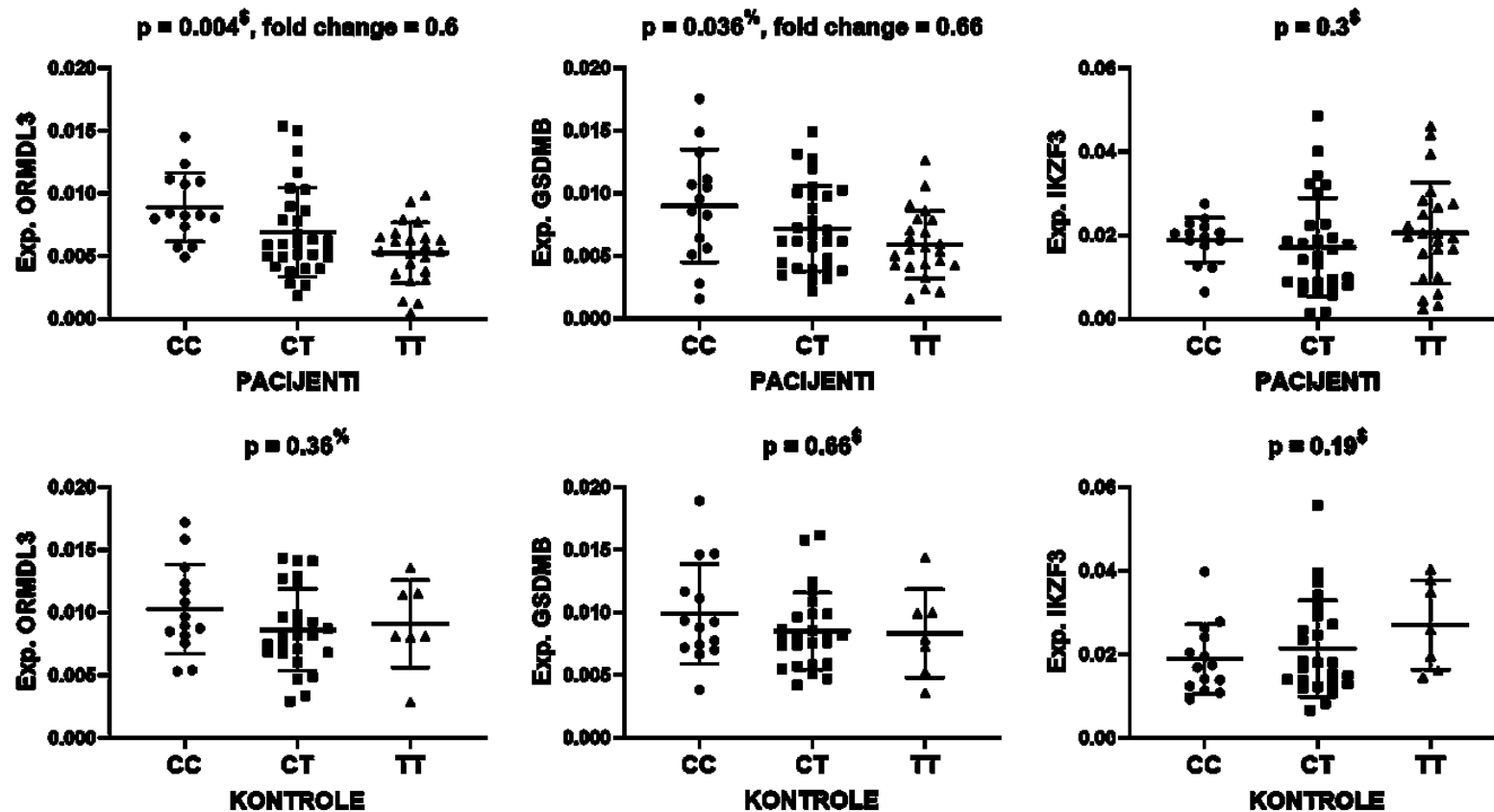
Grafikon R3: Nivoi relativne ekspresije iRNK gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* u MČPK kod RRMS pacijenata i zdravih kontrola (n: pacijenti = 67, kontrole = 50). Vrednosti nivoa ekspresije pojedinačnih uzoraka su prikazane krugovima ili kvadratima. Horizontalne crte označavaju srednje vrednosti i standardne devijacije. p vrednosti su dobijene primenom Mann-Whitney U test-a; $p < 0.05$ su smatrane statistički značajnim.

4.5. Asocijacija genotipova *IKZF3* rs12946510, *IL2RA* rs2104286 i *IFI30* rs11554159 sa relativnom ekspresijom gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* u MČPK pacijenata sa MS-om i zdravih kontrola

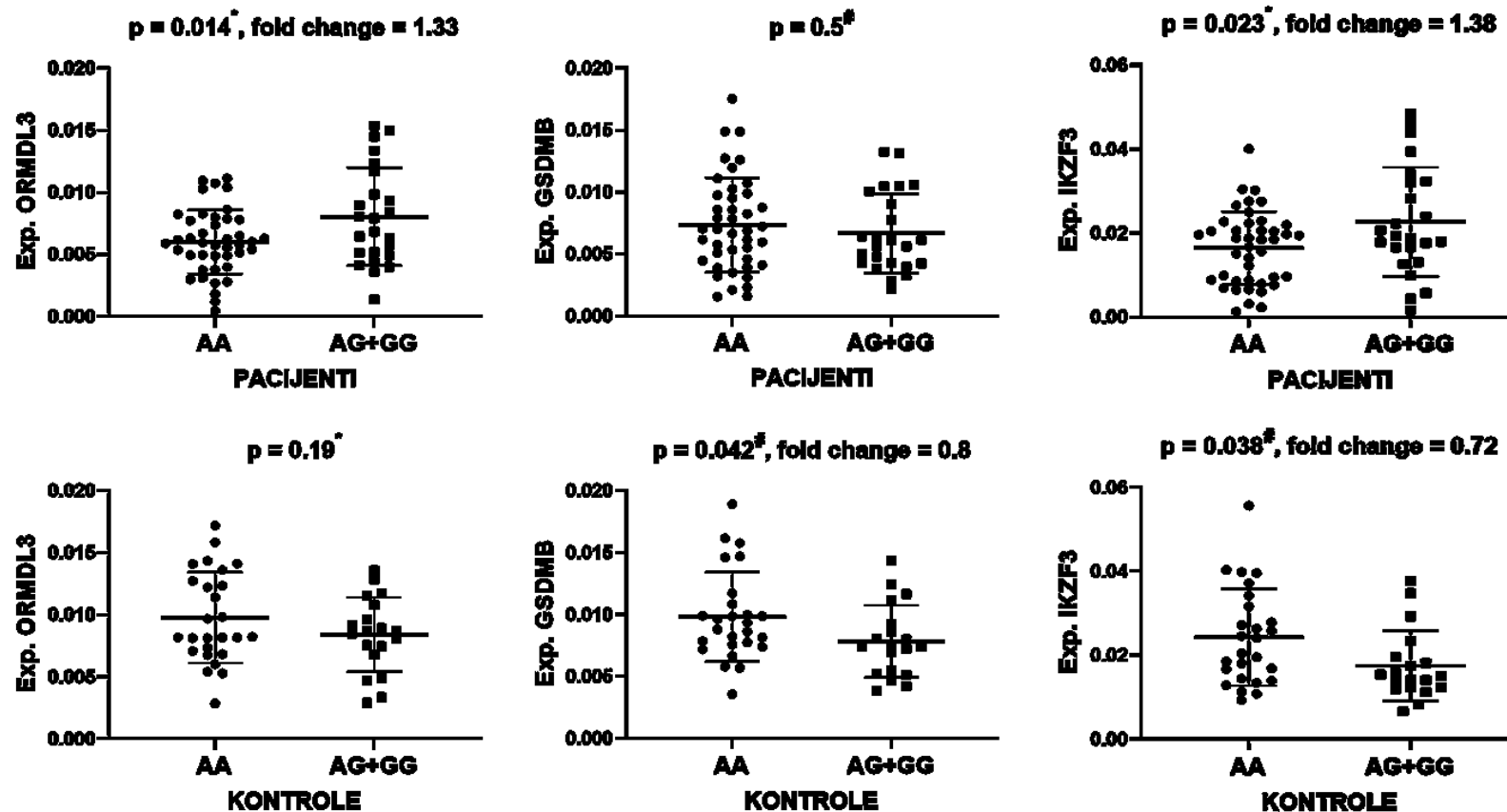
Nivo ekspresije iRNK gena *ORMDL3* bio je statistički značajno niži u grupi *IKZF3* rs12946510 homozigota TT uz odnosu na homozigote CC (Kruskall-Wallis ANOVA: $p = 0.004$) u grupi RRMS pacijenata (Test višestrukog poređenja srednjih rangova; CC vs. TT stepen promene = 0.6; post hoc statistička snaga rezultata za $p \leq 0.05$ je 99.3%). Sličan rezultat je dobijen u grupi pacijenata sa relativnom ekspresijom iRNK gena *GSDMB*, u kojoj je *IKZF3* rs12946510 homozigot TT takođe asociran sa nižom ekspresijom u odnosu na homozigote CC (Jednosmerna ANOVA: $p = 0.036$; Fisher LSD post-hoc test: CC vs. TT stepen promene = 0.66; post hoc statistička snaga rezultata za $p \leq 0.05$ je 92.2%). U grupi pacijenata sa RRMS nije utvrđena statistički značajna asocijacija genotipova *IKZF3* rs12946510 varijante i relativnog nivoa ekspresije *IKZF3* iRNK. U grupi kontrola nije utvrđena statistički značajna asocijacija *IKZF3* rs12946510 sa relativnim nivoom ekspresije ciljnih iRNK. Sve analize asocijacije ekspresije ciljnih iRNK i *IKZF3* rs12946510 varijante su prikazane na grafikonu R4.

Usled malog broja učesnika sa homozigotnim GG genotipom *IL2RA* rs2104286, nivoi ekspresije ciljnih iRNK su analiziran po dominantnom genetičkom modelu (AA vs. AG + GG). U grupi pacijenata sa RRMS alel G (AG + GG) je asociran sa višim nivoom relativne ekspresije iRNK gena *ORMDL3* (Studentov T test: $p = 0.014$, fold change = 1.33, post hoc statistička snaga rezultata za $p \leq 0.05$ je 65.4%) i *IKZF3* (Studentov T test: $p = 0.023$, fold change = 1.38, post hoc statistička snaga studije za $p \leq 0.05$ je 55%) u odnosu na homozigote AA, dok relativni nivo ekspresije iRNK *GSDMB* nije bio asociran sa *IL2RA* rs2104286 genotipom. U grupi zdravih kontrola alel G (AG + GG) je asociran sa nižim nivoom ekspresije iRNK gena *GSDMB* (Mann-Whitney U test: $p = 0.042$, fold change = 0.8, post hoc statistička snaga rezultata za $p \leq 0.05$ je 50.7%) i *IKZF3* (Mann-Whitney U test: $p = 0.038$, fold change = 0.72, post hoc statistička snaga rezultata za $p \leq 0.05$ je 59.7%) u odnosu na homozigote AA. Nije utvrđena statistički značajna asocijacija nivoa ekspresije *ORMDL3* sa *IL2RA* rs2104286 genetičkom varijantom u grupi kontrola. Sve analize asocijacije ekspresije ciljnih iRNK i *IL2RA* rs2104286 su prikazane na grafikonu R5.

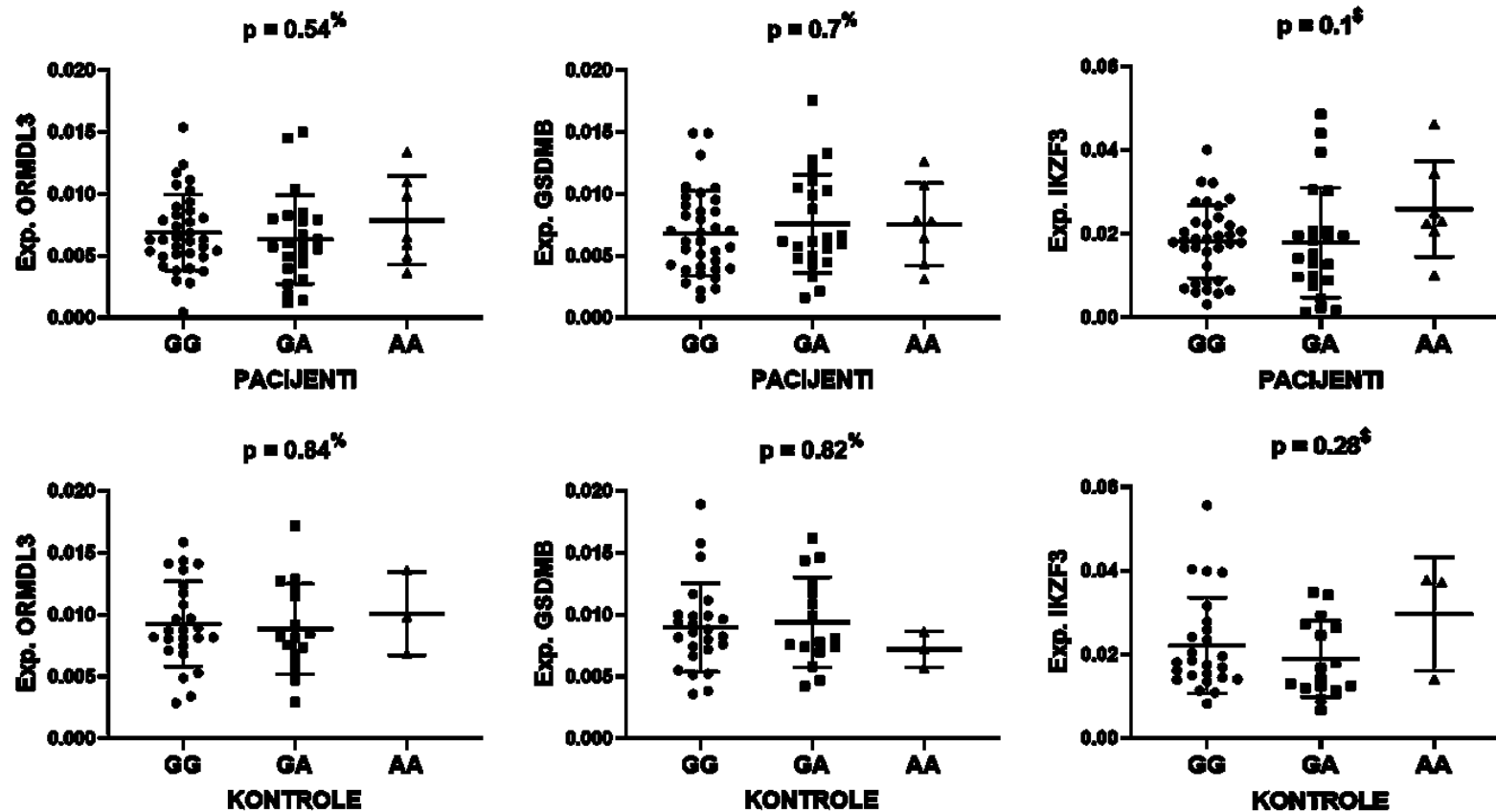
Nije utvrđena statistički značajna asocijacija *IFI30* rs11554159 genetičke varijante i ekspresije ciljnih iRNK (prikazano u grafikonu R6).



Grafikon R4: Asocijacije nivoa relativne ekspresije iRNK u MČPK ciljnih gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* sa *IKZF3* rs1294510 genotipovima u grupama pacijenata RRMS (n: CC = 14, CT = 29, TT = 23) i zdravih kontrola (n: CC = 14, CT = 25, TT = 7). Vrednosti nivoa ekspresije pojedinačnih uzoraka su prikazani krugovima, kvadratima ili trouglovima. Horizontalne crte označavaju srednje vrednosti i standardne devijacije. $^{\%}$ Jednosmerna ANOVA; § Kruskall-Wallis ANOVA; $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.



Grafikon R5: Nivoi relativne ekspresije iRNK u MČPK ciljnih gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* po *IL2RA* rs2104286 dominantnom genetičkom modelu u grupama pacijenata sa RRMS (n: AA = 42, AG + GG = 24) i zdravih kontrola (n: AA = 26, AG + GG = 19). Vrednosti nivoa ekspresije pojedinačnih uzoraka su prikazani krugovima ili kvadratima. Horizontalne crte označavaju srednje vrednosti i standardne devijacije. *Studentov T test; $^\#$ Mann-Whitney U test; $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.



Grafikon R6: Asocijacije nivoa relativne ekspresije iRNK u MČPK ciljnih gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* sa *IFI30* rs11554159 genotipovima u grupama pacijanata sa RRMS (n: GG = 35, GA = 23, AA = 7) i zdravih kontrola (n: GG = 25, GA = 16, AA = 3). Vrednosti nivoa ekspresije pojedinačnih uzoraka su prikazani krugovima, kvadratima ili trouglovima. Horizontalne crte označavaju srednje vrednosti i standardne devijacije. %Jednosmerna ANOVA; §Kruskall-Wallis ANOVA; $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.

4.6. Korelacija nivoa relativne ekspresije iRNK gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* iz MČPK sa kliničkim i demografskim parametrima u grupi pacijenata sa MS-om

Korelacije nivoa ciljnih iRNK sa kliničkim parametrima EDSS, MSSS i demografskim parametrom starosti prilikom uzorkovanja su prikazane u tabeli R6. Relativna ekspresija *IKZF3* je imala graničnu pozitivnu korelaciju sa EDSS (Spearman rank R: $p = 0.04$, koeficijent korelacije $r = 0.26$), dok je relativna ekspresija *GSDMB* imala negativnu korelaciju sa starošću prilikom uzorkovanja (Spearman rank R: $p = 2 \times 10^{-6}$, koeficijent korelacije $r = -0.56$). Nisu utvrđene druge statistički značajne korelacije nivoa ekspresije ciljnih iRNK i EDSS, MSSS, starosti prilikom uzorkovanja.

Tabela R6: Korelacija nivoa relativne ekspresije iRNK gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* iz MČPK sa EDSS, MSSS i starosti prilikom uzorkovanja.

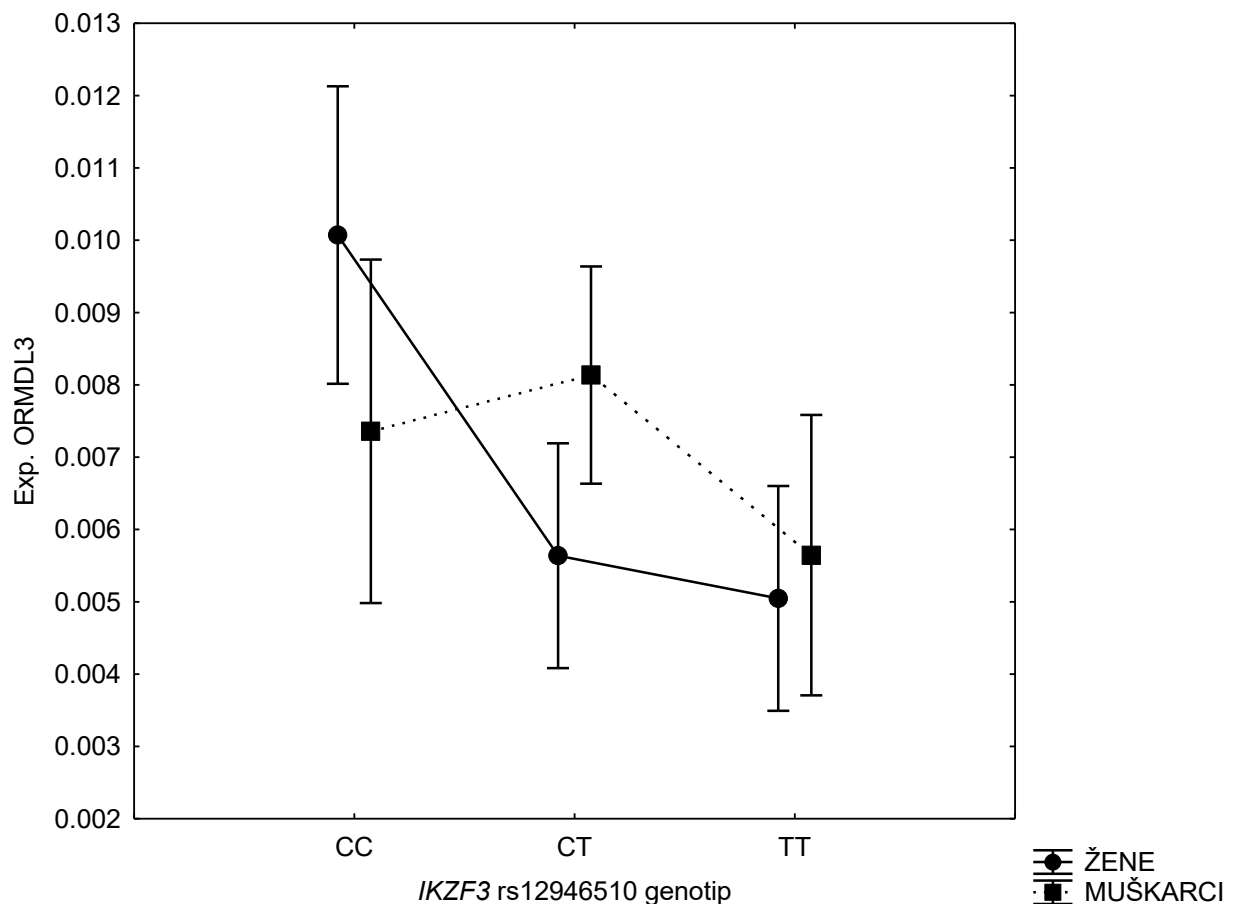
Ekspresija gena	Parametar	Pacijenti (n = 67)		Kontrole (n = 50)	
		r	p	r	p
<i>ORMDL3</i>	EDSS	0.02	0.9		
	MSSS	0.01	0.91		
	Starost pri uzorkovanju	0.02	0.91	0.16	0.34
<i>GSDMB</i>	EDSS	-0.17	0.18		
	MSSS	-0.07	0.61		
	Starost pri uzorkovanju	-0.56	2x10⁻⁶	-0.03	0.85
<i>IKZF3</i>	EDSS	0.26	0.04		
	MSSS	0.09	0.49		
	Starost pri uzorkovanju	0.19	0.13	0.18	0.27

EDSS (eng. *Expanded Disability Status Scale*) – parametar koji opisuje trenutni nivo neurološkog deficita; MSSS (eng. *Multiple Sclerosis Severity Score*) – parametar koji opisuje progresiju bolesti; Spearman rank R korelacija je korišćena za izračunavanje koeficijenta korelacije r i p vrednosti; vrednosti $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.

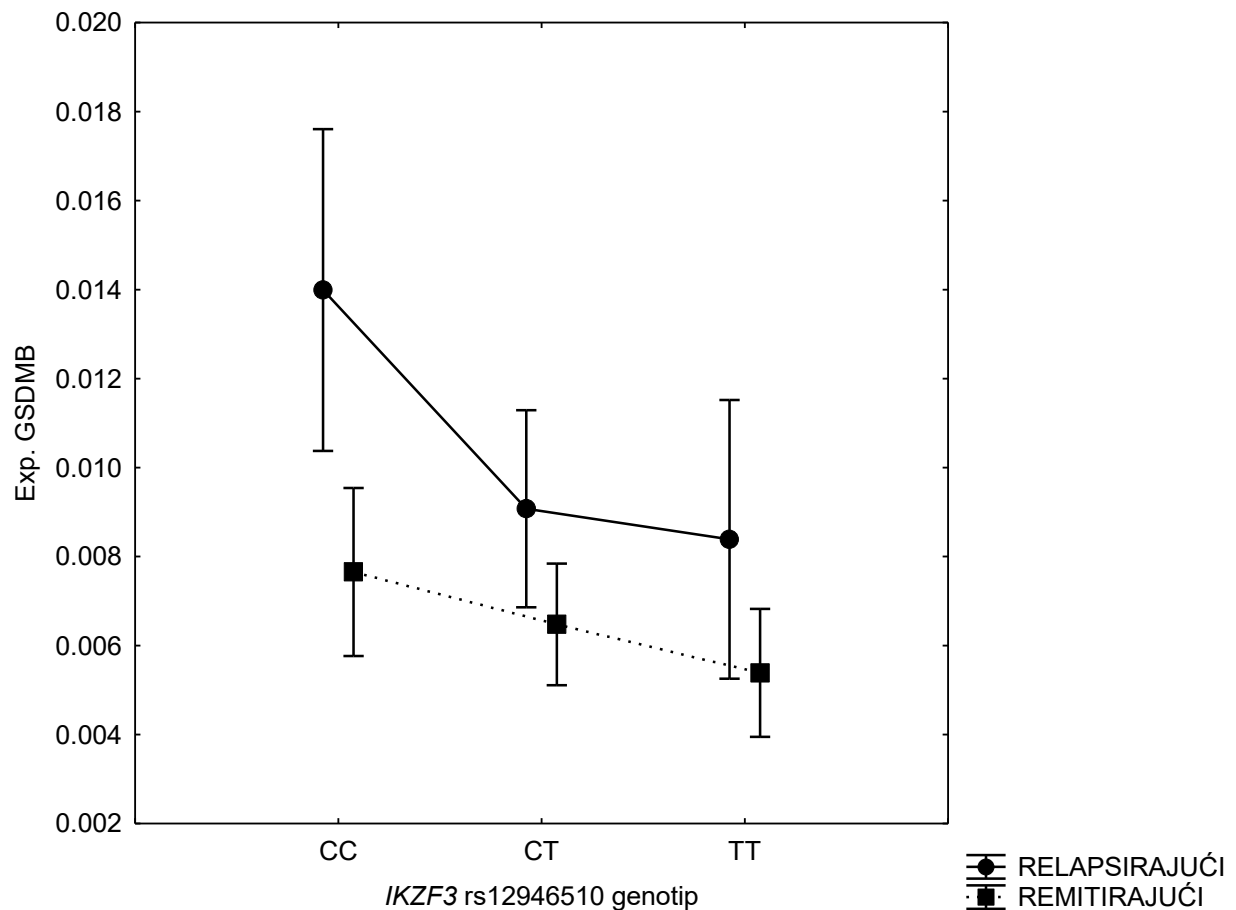
4.7. Kombinovani uticaj *IKZF3* rs12946510 genotipa, pola, faze bolesti i Interferon β terapije na nivo relativne ekspresije iRNK gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* u MČPK

Primenom Faktorijalne ANOVA-e, vrednosti nivoa relativne ekspresije iRNK analizirane su kao zavisne varijable, dok *IKZF3* rs12946510 genotip, pol, RRMS faza i primanje Interferon β terapije su analizirane kao nezavisne varijable. *IKZF3* rs12946510 genotip i pol su imali kombinovani efekat na ekspresiju iRNK gena *ORMDL3* (Univarijantni test značajnosti: $p = 0.029$, stepeni slobode 2, $F = 3.74$), genotip je imao nezavisan statistički značajan efekat na ekspresiju ($p = 0.005$), dok pol nije imao statistički značajan nezavisan efekat na ekspresiju *ORMDL3* iRNK ($p = 0.87$) (grafikon R7). RRMS faza i *IKZF3* rs12946510 genotip su imali statistički značajan nezavisni efekat na ekspresiju iRNK gena *GSDMB* ($p = 0.0002$ i $p = 0.013$ respektivno), ali bez značajnog kombinovanog efekata (Univarijantni test značajnosti: $p = 0.29$, stepeni slobode 2, $F = 1.25$) (grafikon R8). U grupi pacijenata u remisiji, Interferon β terapija i *IKZF3* rs12946510 genotip imaju kombinovani efekat na nivo relativne ekspresije iRNK *GSDMB* (Univarijantni test značajnosti: $p = 0.006$, stepeni slobode 2, $F = 5.75$), terapija ima nezavisan efekat na ekspresiju *GSDMB* ($p = 0.0004$), a genotip nema statistički značajan efekat ($p = 0.16$) (grafikon R9). Rezultati ukazuju na povišen nivo ekspresije *GSDMB* u relapsu u odnosu na remisiju i kod pacijenata koji primaju Interferon β terapiju u odnosu na one koji nisu na terapiji, u grupi koja je u fazi remisije.

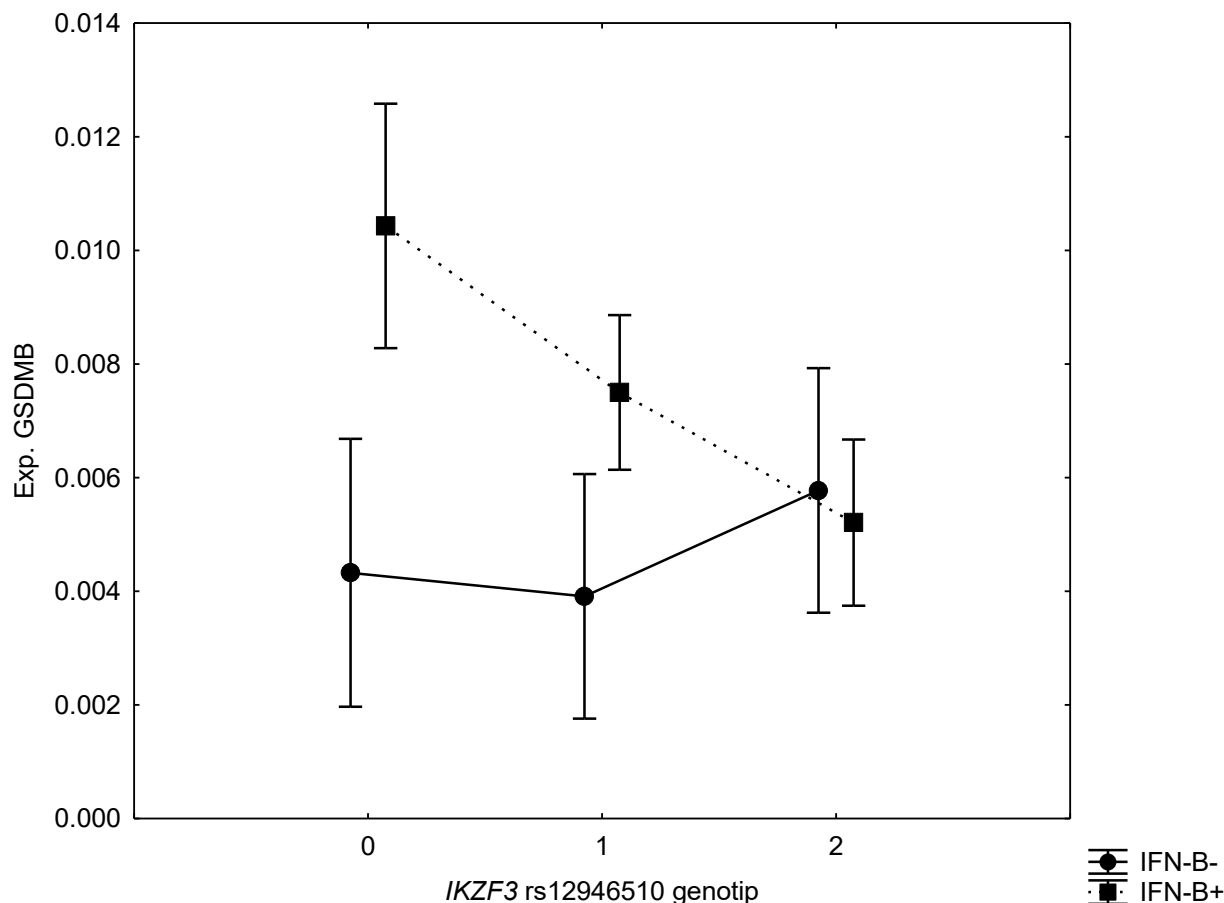
Nisu utvrđeni statistički značajni kombinovani efekti ili individualni efekti pola i *IKZF3* rs12946510 genotipa na ekspresije ciljnih gena u grupi kontrolnih ispitanika. Pol, relaps, terapija i *IKZF3* rs12946510 genotip nisu imali kombinovane ili pojedinačne efekte na ekspresiju *IKZF3* u grupi MS pacijenata.



Grafikon R7: Kombinovani efekat pola (n: žene = 36, muškarci = 30) i *IKZF3* rs12946510 genotipa (n: CC = 14, CT = 29, TT = 23) na nivo relativne ekspresije iRNK gena *ORMDL3* iz MČPK pacijenata sa RRMS. Faktorijalna ANOVA: Univarijantni test značajnosti $p = 0.029$, stepeni slobode 2, $F = 3.74$. Krugovi i kvadrati označavaju srednje vrednosti, vertikalne crte označavaju 95% intervala poverenja.



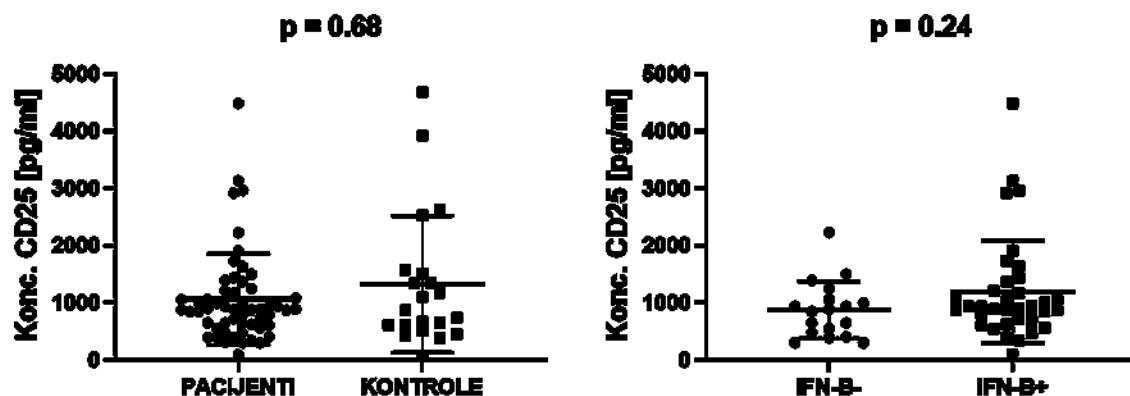
Grafikon R8: Kombinovani efekat relapsa kod RRMS pacijanata (n: relapsirajući = 15, remitirajući = 51) i *IKZF3* rs12946510 genotipa (n: CC = 14, CT = 29, TT = 23) na nivo relativne ekspresije iRNK gena *GSDMB* u MČPK pacijenata sa RRMS. Faktorijska ANOVA: Univarijantni test značajnosti $p = 0.29$, stepeni slobode 2, $F = 1.25$. Krugovi i kvadrati označavaju srednje vrednosti, vertikalne crte označavaju 95% intervala poverenja.



Grafikon R9: Kombinovani efekat primanja Interferon- β terapije (n: ne primaju terapiju = 17, na Interferon- β terapiji = 34) i genotipova *IKZF3* rs12946510 (n: CC = 11, CT = 21, TT = 19) na nivo relativne ekspresije iRNK gena *GSDMB* u MČPK MS pacijenata u fazi remisije. Faktorijsalna ANOVA: Univarijantni test značajnosti $p = 0.006$, stepeni slobode 2, $F = 5.75$. Krugovi i kvadrati označavaju srednje vrednosti, vertikalne crte označavaju 95% intervala poverenja. IFN-B-: remitirajući pacijenti koji nisu na terapiji; IFN-B+: remitirajući pacijenti na Interferon- β terapiji.

4.8. Asocijacija koncentracije CD25 u krvnoj plazmi sa MS i primanjem Interferon β terapije

Nije utvrđena statistički značajna asocijacija razlika u koncentraciji solubilnog CD25 u krvnoj plazmi između kontrola i MS pacijenata i između remitirajućih pacijenata koji primaju Interferon β terapiju i pacijenata koji ne primaju MS terapiju (grafikon R10).



Grafikon R10: Asocijacija koncentracije solubilnog CD25 (izražene kao pg/ml) iz plazme periferne krvi sa MS-om (n: pacijenti = 55, kontrole = 21) i Interferon- β terapije kod remitirajućih pacijenata (n: ne primaju terapiju = 15, na Interferon- β terapiji = 33). Vrednosti nivoa ekspresije pojedinačnih uzoraka su prikazani krugovima ili kvadratima. Horizontalne crte označavaju srednje vrednosti i standardne devijacije. IFN-B-: remitirajući pacijenti koji nisu na terapiji; IFN-B+: remitirajući pacijenti na Interferon- β terapiji. Mann-Whitney U test; $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.

4.9. Korelacija koncentracije CD25 u krvnoj plazmi sa kliničkim parametrima MS

Nije utvrđena statistički značajna korelacija između koncentracije solubilnog CD25 u krvnoj plazmi i EDSS ili MSSS kod pacijenata, kao ni sa starošću prilikom uzorkovanja u grupi pacijenata ili kontrole (tabela R7).

Tabela R7: Korelacija koncentracije solubilnog CD25 u plazmi sa EDSS, MSSS i starosti prilikom uzorkovanja.

Koncentracija proteina u plazmi	Parametar	Pacijenti (n = 55)		Kontrole (n = 21)	
		r	p	r	p
CD25	EDSS	0.12	0.48		
	MSSS	0.1	0.56		
	Starost pri uzorkovanju	0.12	0.4	-0.38	0.12

EDSS (eng. *Expanded Disability Status Scale*) – parametar koji opisuje trenutni nivo neurološkog deficita; MSSS (eng. *Multiple Sclerosis Severity Score*) – parametar koji opisuje progresiju bolesti; Spearman rank R korelacija je korišćena za izračunavanje koeficijanta korelacije r i p vrednosti; vrednosti $p < 0.05$ se smatraju statistički značajnim.

5. DISKUSIJA

Prva hipoteza koja je ispitana u ovoj doktorskoj disertaciji bazirana je na analizi individualne ili kombinovane asocijacije potencijalno uzročnih SNP-ova, određenih PICS-om, koji su povezani sa MS-om, *IL2RA* rs2104286, *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs1294651, sa rizikom za nastanak MS-a i selektovanim kliničkim parametrima bolesti u grupama pacijenata i zdravih pripadnika populacije Srbije. Testiranje druge hipoteze urađeno je uzimajući u obzir sistem prezentacije antigena, *HLA-DRB1*15:01*, kroz analizu asocijacije ekspresije gena iz imunski relevantnog 17q12-21 hromozomskog regiona *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* i ekspresijom markera aktivnosti T limfocita iz plazme sCD25. Za testiranje hipoteza definisani su ciljevi čija je svrha analiza asocijacije uzročnih varijanti kao kandidata za povećani rizik za nastanak MS-a i parametara težine kliničke slike i progresije bolesti u srpskoj populaciji i analiza regulatorne uloge uzročnih varijanti kandidata u nastanku, težini i progresiji bolesti.

MS je kompleksna bolest sa očiglednim doprinosom genetičke komponente koju definiše veći broj gena (O’Gorman i sar., 2012; Patsopoulos, 2018), ali, takođe, sa brojnim izazovima u razumevanju doprinosa gena u regulaciji molekularnih mehanizama koji su od značaja za manifestaciju bolesti. Pre GWAS ere glavni genetički markeri asocirani sa MS-om bili su geni koji kodiraju MHC I i MHC II (Bertrams i Kuwert, 1972; Compston i sar., 1976; Fogdell-Hahn i sar., 2000; Harbo i sar., 2004; Schmidt i sar., 2007). U GWAS eri, koja je omogućila relativno jednostavno pretraživanje velike količine genetičkih markera na nivou celog genoma i utvrđivanje asocijacije sa novim genetičkim varijacijama, jedan od izazova objašnjavanja asocijacije postaje pronalaženje regulatorne uloge ovih genetičkih varijanti (Farh i sar., 2015).

MS je heterogena bolest sa ekstremnom fenotipskom varijabilnošću u prezentaciji simptoma i brzini progresije bolesti, dajući širok opseg ispoljavanja individualnih kliničkih karakteristika bolesti (Kurtzke, 1983; Lublin i sar., 1996; Roxburgh i sar., 2005; Lublin i sar., 2014). Uticaj ove heterogenosti na kvalitet života pacijenata je poznat (Gil-González, i sar., 2020). Međutim, mnogo je manje poznata genetička osnova ovakve velike fenotipske varijabilnosti. Ovo je razlog zašto je deo ove doktorske disertacije fokusiran na utvrđivanje moguće asocijacije genetičkih varijanti sa parametrima kao što je težina bolesti i progresija izražene kroz EDSS, kao i trenutni neurološki deficit.

Genetička heterogenost MS-a ispoljava se i na nivou populacije. Genetičke varijante prethodno asocirane sa MS-om, mogu imati varijabilnu asocijaciju sa MS-om u odnosu na populaciju, bilo kroz prisustvo odnosno odsustvo statistički značajne asocijacije ili OR (Schmidt i sar., 2007; IMSGC 2007; Akkad i sar., 2009; IMSGC 2013; Stefanović i sar., 2020). Ovaj vid međupopulacije varijabilnosti u asocijaciji genetičkih varijanti ističe potrebu za analizom većeg broja različitih populacija zarad boljeg razumevanja genetičke osnove MS-a, bilo kroz integraciju rezultata iz većeg broja populacija u meta-analize ili analize heterogenosti asocijacije pojedinačnih varijabli. Stoga, ova asocijaciona analiza potencijalno uzročnih varijanti u do sada neispitanim populacijama, kao što je naša populacija, bitna je u cilju ispitivanja genetičke heterogenosti MS na populacionom nivou.

U okviru prvog cilja potvrdili smo asocijaciju alela G varijante *IL2RA* rs2104286 sa smanjenjem rizika za nastanak MS-a u srpskoj populaciji. Ova asocijacija je u saglasnosti sa trendom zapaženim u prvoj MS GWAS (IMSGC i sar., 2007), i naknadno, brojnim studijama slučaja i kontrola u različitim populacijama (Weber i sar., 2008; Maier i sar., 2009b; Cersaletti i sar., 2013; Xia i sar., 2018) i meta-analizama (De Jager i sar., 2009; Wang i sar., 2011; Wang i sar., 2018). Treba istaći da utvđena genetička asocijacija nije univerzalana za sve analizirane populacije. U studiji slučajeva i kontrola u nemačkoj populaciji, varijanta rs2104286 nije bila

statistički značajno asocirana sa MS-om (Akkad i sar., 2009). Studija na kanadskoj populaciji pokazuje samo statistički trend asocijacije (Traboulsee i sar., 2014). Analiza asocijacije varijante *IL2RA* rs2104286 po prvi put je urađena u našoj populaciji u ovoj doktorskoj tezi i doprinosi ukupnom saznanju o postojanju populacionih razlika u genetičkoj heterogenosti MS. Nije utvrđena statistički značajna asocijacija druge dve potencijalno uzročne varijante niti su nađene kombinovane asocijacije istih odabranih varijanti. Ograničenje ove studije, je nedovoljna statistička snaga da odbaci hipotezu da varijante *IKZF3* rs12946510 i *IFI30* rs11554159 nisu asocirane sa MS-om u srpskoj populaciji. Uzevši u obzir da su studije slučajeva za ove varijante u MS-u retke, naši rezultati poput nedostatka asocijacije *IKZF3* rs12946510 i *IFI30* rs11554159 mogu poslužiti budućim istraživanjima u meta-analizama studija slučajeva i kontrola iz različitih populacija kao što je i studija Zhou i sar, 2024 (Zhou i sar, 2024).

Osim pomenutih analiza asocijacije sa MS-om, analiza asocijacije *IKZF3* rs12946510 sa RRMS, u modelu prilagođenom dominantnom genetičkom modelu varijante *IL2RA* rs2104286 i polu, detektovali smo nominalnu asocijaciju homozigota TT varijante *IKZF3* rs12946510 sa rizikom za nastanak MS. T alel je bio ranije asociran sa rizikom za nastanak MS-a (IMSGC, 2013), ali nakon korekcije za višestruko poređenje, rezultat u našoj populaciji nije više bio statistički značajan, pa je dalje istraživanje opravdano na većoj grupi ovih pacijenata za dobijanje veće snage studije.

Nismo detektovali statistički značajne asocijacije varijanti *IL2RA* rs2104286 i *IKZF3* rs12946510 sa kliničkim parametrima MS-a, sa izuzetkom nominalne asocijacije rs12946510 alela T sa kasnijim početkom MS-a. Ovo je u skladu sa rezultatima GWAS studija, koje su analizirale asocijaciju EDSS-a u grupi od 12548 pacijenata sa MS-om (IMSGC, 2023) ili MSSS-a u studijskoj populaciji od 1470 pacijenata (IMSGC, 2011b). MSSS i EDSS nisu bili asocirani sa *IL2RA* rs2104286 (IMSGC, 2011b; IMSGC, 2023). Obe GWAS studije nisu direktno analizirale varijantu *IKZF3* rs12946510, ali varijante u lokusu 17q21 u genu *STAT3* pokazuju trend asocijacije sa MSSS (IMSGC, 2011b), dok nijedna analizirana varijanta na 17-om hromozomu ne pokazuje asocijaciju sa EDSS (IMSGC, 2023).

U okviru ove studije utvrđena je statistički značajna asocijacija ređeg homozigota AA varijante *IFI30* rs11554159 sa većim MSSS-om kod nosioca alela *HLA-DRB1*15:01*. Uzimajući u obzir da u našoj studiji varijanta *IFI30* rs11554159 nije asocirana sa rizikom za nastanak MS-a što je suprotno rezultatima IMSGC GWAS-a na nivou grupe od 14498 pacijenata sa MS-om i 24091 zdravih kontrola (IMSGC, 2013). U toj studiji je češći alel G bio asociran sa povišenim rizikom (IMSGC, 2013), pa je moguće intepretirati ovaj rezultat na više načina. Ova asocijacije može biti rezultat jakog LD-a sa varijantom rs874628 koja menja peptidnu sekvencu lociranu u genu *MPV17L2* (eng. *Mpv17-like protein 2*), koja je pokazala asocijaciju sa rizikom za nastanak MS-a u istoj i prethodnoj studiji (IMSGC i sar., 2011a; IMSGC, 2013). U meta-analizi asocijacije varijanti sa MSSS-om, koje su bile prethodno asocirane sa MS-om (IMSGC i sar., 2011a), na studijskoj grupi od 7125 bolesnika, *MPV17L2* rs874628 varijanta bila je značajno asocirana sa vrednošću MSSS (George i sar., 2016). Međutim, PICS algoritam definiše *IFI30* rs11554159 kao najverovatniju uzročnu varijantu u tom regionu, sa verovatnoćom uzročnosti većom od 10 puta u odnosu na *MPV17L2* rs874628 (Farh i sar., 2015), implicirajući da *IFI30* rs11554159 mnogo verovatnije utiče na MS nego *MPV17L2* rs874628. PolyPhen2, program koji analizira efekte promena u proteinskoj sekvenci na funkciju proteina, predviđa da varijanta rs11554159 vrši štetan efekat na strukturu i funkciju *IFI30*, dok rs874628 ne remeti značajno strukturu i funkciju *MPV17L2* prema predikciji *in silico* (Turcot i sar., 2012; genetics.bwh.harvard.edu/pph2.com). GILT, enzim kodiran od strane *IFI30*, obavlja veći broj bitnih funkcija u obradi antigena za prezentaciju (Hastings i sar., 2006; Bogunovic i sar., 2010) i regulaciji oksidoreduktivnog potencijala ćelije (Bogunovic i sar., 2008; Maric i sar., 2009).

Enzim utiče na epitopski repertoar prezentovan od strane MHC II (Bogunovic i sar., 2010), kliničku manifestaciju modela EAE modela MS-a (Bergman i sar., 2012) kao i dinamiku aktivacije T limfocita (Barjaktarević i sar., 2006). Suprotno *IFI30*, *MPV17L2* kodira protein koji je neophodan za asembliranje i stabilnost mitohondrijskog ribozoma (Dalla Rosa i sar., 2014) i ne poseduje poznatu funkciju u imunskom sistemu. U našoj studiji zapažen je kombinovani efekat alela *HLA-DRB1*15:01* i recesivnog genetičkog modela za varijantu *IFI30* rs11554159 na MSSS. Iako je teško predložiti specifičan molekularni mehanizam koji stoji iza ove asocijacije, treba naglasiti da su GILT i MHC II proteini funkcionalno povezani kao komponente puta obrade i prezentacije antigena (Bogunovic i sar., 2010). Ovo objašnjenje je delimično podržano u rezultatima objavljenih studija budući da je put „obrade i prezentacija antigena” u KEGG-u (eng. *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*) obogaćen među genima u kojima su locirane varijante koje su asociirane sa MSSS-om (IMSGC i sar., 2011b). Uočena asocijacija ispitane varijante *IFI30* rs11554159 može ukazati na zajednički efekat sa *HLA-DRB1*15:01* na MSSS kroz potencijalni uticaj na obradu i prezentaciju antigena u toj kombinaciji koja treba da bude ispitana u sledećim funkcionalnim studijama. Ograničenje u interpretaciji sadašnjeg rezultata je relativno mali broj individua koje su nosioci ove kombinacije *HLA-DRB1*15:01* varijante i *IFI30* rs11554159 homozigota AA.

U okviru drugog cilja utvrđena je značajno niža ekspresiju iRNK gena *ORMDL3* i *GSDMB* na nivou MČPK RRMS pacijenata u odnosu na zdrave individue (Stefanović i sar., 2024). Ovo je bila prva studija koja je utvrdila značajnu asocijaciju ekspresije *ORMDL3* i MS. Studija koja je urađena na pojedinačnim imunskim ćelijskim tipovima iz periferne krvi (CD4+ T, CD8+ T, B, NK ćelije i monociti) nije identifikovala statistički značajnu asocijaciju *ORMDL3* i *GSDMB* sa MS (Gresle i sar., 2020). Pokazane razlike u ove dve studije verovatno su uzorok razlika u analiziranim uzorcima. Naime Gresle i sar., su RNK sekvenciranje uradili u pojedinačnim tipovima ćelija, a ne celokupnim MČPK, i treba uzeti u obzir da su kriterijumi za inkluziju pacijenata sa MS-om u studiju bili drugačiji (Gresle i sar., 2020). Proteina *ORMDL3* je negativan regulator dinamike T ćelijske aktivacije putem svoje uloge u ćelijskom Ca²⁺ metabolizmu i regulaciji produkcije IL-2 (Carreras-Sureda i sar., 2013; Carreras-Sureda i sar., 2016; Schmiedel i sar., 2016). Prethodno istaknuto sugerise da bi niža ekspresija *ORMDL3* na nivou MČPK mogla da utiče na patogenezu MS-a kroz stimulaciju T ćelijske aktivacije i propagacije inflamacije, ali to ostaje da se dokaže u budućim funkcionalnim studijama. Rezultat nižeg nivoa ekspresije *GSDMB* je u skladu sa prethodnom studijom u kojoj je pokazana asocijacija MS i niže ekspresije na nivou MČPK (Cardamone i sar., 2017), mada na manjem broju uzoraka. Protein *GSDMB* je bitan regulator nekanonske piroptoze posredovane Granzimom A indukovane citotoksičnim CD8+ T i NK ćelijama (Zhou i sar., 2020; Gong i sar., 2022). To ukazuje na to da bi snižena ekspresije *GSDMB* na nivou MČPK mogla da utiče na patogenezu MS-a preko mehanizma inflamatorne ćelijske smrti, odnosno umanjanim kapacitetom za ubijanje autoreaktivnih limfocita. T ćelije sa CD8+ FoxP3+ eliminišu autologne mijelin specifične CD4+ T ćelije u MS-u (Correale i Villa, 2008; Correale i Villa, 2010), a NK ćelije ubijaju aktivirane autologne CD4+ T ćelije putem degranulacije citotoksičnih granula (Neilsen i sar., 2012). Međutim, u literaturi ne postoje trenutno funkcionalni dokazi koji povezuju nekanonsku piroptozu posredovanu interakcijom Granzima A sa *GSDMB* i MS. Ali postoje dokazi koji povezuju MS sa kanonskom piroptozom posredovanom inflamozomom na nivou CD4+ T limfocita i CNS-a (McKenzie i sar., 2018; Braga i sar., 2019; Malhotra i sar., 2023). Ekspresija *Nlrp3* (eng. *NLR Family Pyrin Domain Containing 3*) u CD4+ T limfocitima presađenim u *Nlrp3*^{-/-} *knockout* miševe rezultuje blažom formom EAE (Braga i sar., 2019). RRMS pacijenata koji ne odgovaraju na terapiju fingolimodom imaju disregulaciju piroptoze i aktivacije NLRP3 inflamozoma na nivou MČPK ćelija (Malhotra i sar., 2023). Komponente piroptotskog inflamozoma imaju veću ekspresiju u CNS-u pacijenata sa MS-om i oligodendrocita EAE miševa u odnosu na zdrave kontrole (McKenzie i sar., 2018). TNFα

indukuje kanonsku piroptozu u ćelijskim kulturama oligodendrocita poreklom od čoveka (McKenzie i sar., 2018). *ORMDL3* takođe može imati ulogu u piroptozu. Rezultati nedavne studije pokazali su indukciju *ORMDL3* ekspresije u bronhijalnog epitela poreklom od čoveka što dovodi do povišene ekspresije *GSDMD* i *NLRP3* implicirajući da *ORMDL3* može doprineti indukciji piroptoze u ovim ćelijama (Liu i sar., 2023). Rezultati ove disertacije sugerišu da su oba gene uključena u kaskadu inflamatornih procesa u MS, ali su neophodna dalja istraživanja da bi se definisala uloga *ORMDL3* i *GSDMB* u MS-u.

Relativni nivoi ekspresije iRNK gena *ORMDL3* i *GSDMB* u MČPK ćelijama bile su u pozitivnoj korelaciji kod RRMS pacijenata i zdravih individua, dok je pozitivna korelacije između *ORMDL3* i *IKZF3* zapažena samo kod zdravih individua. Ovo je u skladu sa prethodno objavljenim rezultatima u literaturi. U ne aktiviranim CD4+ T ćelija, CD8+ T, Th1, Th2 i Th17 polarizovanim CD4+ T ćelijama, NK ćelijama i B limfocitima zapažena je korelacija u nivou ekspresije iRNK *ORMDL3* i *GSDMB* implicirajući zajedničku regulaciju ekspresije u MČPK (Schmiedel i sar., 2016). Ovaj rezultat nije neočekivan budući da jedan od mehanizama zajedničke regulacije ekspresije je efekat genetičke varijante rs12946510.

Utvrđena pozitivna korelacija između EDSS i relativne ekspresije *IKZF3* iRNK u MČPK RRMS pacijenata, implicira potencijalni prognostički potencijal ova dva gena za progresiju MS. Ovo je prva direktna asocijacije ekspresije *IKZF3* i EDSS u naučnoj literaturi. U literaturi je opisana indirektna asocijacije trenutne neuroinflamacije i ekspresije *IKZF3* u PBMC preko miRNK koje regulišu njegovu ekspresiju. Povišena ekspresija cirkularnih RNK koje imaju efekat sunđer za miRNK koje ciljano degradiraju *IKZF3* iRNK asocirana je sa relapsom i prisustvom inflamatornih lezija u CNS-u (Zurawska i sar., 2021). Dalja istraživanja na većem uzorku su neophodna da bi se ispitala ova asocijacija.

U našoj grupi ispitanika, vrednosti koncentracije sCD25 u plazmi nisu bile asocirane sa MS-om i Interferon β terapijom u RRMS grupi. Takođe, nije detektovana korelacija između EDSS, MSSS i koncentracije sCD25. Ovo je u suprotnosti sa prethodno objavljenim studijama u kojima je viša koncentracije sCD25 u perifernoj krvi asocirana sa MS-om (Maier i sar., 2009a; Witkowska i sar., 2016; Pourakbari i sar., 2020), mada ovaj trend više koncentracije sCD25 u perifernoj krvi MS pacijenata nije univerzalno potvrđen (Buhelt i sar., 2017). Rezultati asocijacije koncentracije sCD25 u perifernoj krvi i kliničke slike MS-a su oprečni u literaturi. Neke od studija su detektovale asocijaciju sa težinom bolesti (Maier i sar., 2009a), dok druge nisu (Witkowska i sar., 2016; Pourakbari i sar., 2020). NK i CD4+ T ćelije iz pacijenata sa sistemskim lupusom eritromatosom, koje su *in vitro* tretirane sa Interferonom β imaju povišenu ekspresiju *IL2RA* na nivou transkriptoma (Kang i sar., 2018). Privremeni efekati *in vivo* terapije Interferonom β na ekspresiju membranskog CD25 u T limfocitima pacijenata sa MS-om su primećeni nedugo nakon što je ova terapija počela da se primenjuje (Ferrarini i sar., 1998). Porast u ekspresiju membranskog *IL2RA* je bio tranzijentan sa pikom u prvih mesec dana terapije i trajnom normalizacijom ekspresije na pre terapijski nivo u toku prva 3 meseca primanja terapije (Ferrarini i sar., 1998). Uzevši u obzir da su naši pacijenti bili na terapiji Interferonom β minimum 6 meseci i imajući u vidu da je solublini CD25 produkt proteolize membranskog CD25 (Sheu i sar., 2001), možda je nedostatak asocijacije sCD25 u plazmi sa formom ili tokom bolesti (EDSS, MSSS) kod pacijenata sa MS zapravo uočeni posredni efekat duže terapije na normalizaciju ekspresije membranskog CD25. Naravno, dalja istraživanja su neophodna, za donošenje zaključaka u vezi sa ekspresijom CD25, *IL2RA* i MS-om.

U okviru trećeg cilja utvrdili smo statistički značajne razlike u relativnom nivou ekspresije iRNK gena *ORMDL3* i *GSDMB* kod RRMS pacijenata u odnosu na različite genotipove varijante rs12946510 u MČPK. Niže ekspresije gena bile su asocirane sa alelom T koji je okarakterisan kao alel koji nosi povišen rizik za nastanak MS-a (IMSGC 2013). Nismo utvrdili

asocijaciju genotipa i relativne ekspresije *IKZF3*, niti asocijaciju ekspresije analiziranih iRNK sa rs12946510 u grupi zdravih individua. Rezultat u grupi RRMS pacijenata je očekivan i u skladu sa literaturom. Genetička varijanta rs12946510 okarakterisana je kao jak eQTL za ekspresiju *ORMDL3* i *GSDMB*, ali ne i za *IKZF3*, na nivou periferne krvi i slezine, sa asocijacijom alela T i niže ekspresije na nivou ovih tkiva (Hitomi i sar., 2017; www.gtexportal.org). Na nivou pojedinačnih ćelijskih tipova kod zdravih individua i pacijenata sa MS-om, alel T je asociiran sa nižom ekspresijom *ORMDL3* i *GSDMB* u NK, CD4+ T, CD8+ T i B limfocitima, dok ekspresija *IKZF3* nije asociirana sa rs12946510 na nivou bilo koje vrste MČPK (Gresle i sar., 2020). U istoj studiji, varijanta rs12946510 ispoljava efekat genotip-fenotip interakcije sa *ORMDL3* i *GSDMB* na nivou B ćelija, odnosno, asocijacija varijante i ekspresija je utvrđena kod MS pacijenata ali ne i kod zdravih kontrola (Gresle i sar., 2020). Ovo je u skladu sa našim rezultatom asocijacije nivoa ekspresije *ORMDL3* i *GSDMB* sa rs12946510 u MČPK RRMS pacijenata i odsustva iste asocijacije u našoj grupi zdravih kontrola. U literaturi su opisana barem 3 regulatorna mehanizma koja bi mogla objasniti kako rs12946510 ispoljava efekat na ekspresiju *ORMDL3* i *GSDMB* u MČPK. Alel T varijante rs12946510 menja strukturu DNK vezivnog elementa za FOXO1, negativno utičući na dinamiku vezivanja ovog transkripcionog regulatora, i potencijalno kreira vezivno mesto za MEF2C (eng. *Myocyte Enhancer Factor 2C*) transkripcioni regulator, onemogućavajući vezivanje FOXO1 kroz kompeticiju sa MEF2C, što može rezultovati nižom ekspresijom gena (Farh i sar., 2015; Hitomi i sar., 2017; Ustiugova i sar., 2019). Ovakvo objašnjenje moguće je pošto su proteini FOXO1 i MEF2C eksprimirani na visokom nivou u MČPK ćelijama i limfoidnim tkivima (www.proteomicsdb.org) i FOXO1 igra niz bitnih uloga u imunskom sistemu uključujući aktivaciju CD4+ T limfocita i B ćelija od strane antigen prezentujućih ćelija, razviću Treg ćelija i produkciji antitela (Cabrera-Ortega i sar., 2017). Pomenuta varijanta može da reguliše nivo lokalne metilacije molekula DNK koji utiče na ekspresiju *ORMDL3* i *GSDMB*. Postoje dokazi da je u CD4+ T limfocitima pacijenata sa reumatoidnim artritisom, alel T varijante rs12946510 asociiran sa višim nivoima metilacije cg18711369 i cg10909506 CpG ostrvaca što negativno utiče na ekspresiju *ORMDL3* i *GSDMB*, bez uticaja na *IKZF3* (Clark i sar., 2020), dajući moguće objašnjenje efekta varijante na ekspresiju ciljnih gena kroz metilaciju molekula DNK u CD4+ T ćelijama iz grupe ispitanika sa inflamatornom autoimunskom bolešću. Treći pretpostavljeni mehanizam baziran je na bioinformatičkim predikcijama koje su definisale potencijalni indirektni uticaj rs12946510 na degradaciju iRNK *GSDMB* posredovanu prevremenim stop kodonom (eng. *nonsense mediated decay*) kroz jak LD sa varijantama koje direktno utiču na ekspresiju transkripcionih izoformi sa prevremenim stop kodonom (Ban i sar., 2020). Treba uzeti u obzir da ova kombinacija efekata rs12946510 na ekspresije gena *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* nisu univerzalno replicirane, što ističe potrebu za dodatnim istraživanjima u kontekstu ove interakcije. Nedavna studija je na modelu CRISPR-Cas9 (eng. *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*) genetički modifikovanih CD4+ T limfocita pokazala asocijaciju alela T sa nižim nivoom ekspresije gena *ORMDL3* i *IKZF3*, bez statistički značajne asocijacije sa *GSDMB* (Ustiugova i sar., 2023). Prethodno pomenuta razlika u profilu asocijacije može biti produkt efekta genskog editovanja budući da je proces uticao na nivo ekspresije gena u CD4+ T ćelijama (Ustiugova i sar., 2023). Izučavanje cis-regulatornih efekata varijanti u hromozomskom regionu 17q12-21 uključujući efekat varijante rs12946510, bitno je za bolje razumevanje bolesti imunske preosetljivosti, budući da je pokazano da utiču na dinamiku aktivacije limfocita T (Carreras-Sureda i sar., 2016; Ustiugova i sar., 2023).

Drugi mehanizam kojim bi varijanta rs12946510 mogla uticati na MS je efekat posredovan *ORMDL3*-om na produkciju ceramida. Nedavna studija je sugerisala uticaj ove varijante na koncentracija sfingolipida u perifernoj krvi u astmi (Ono i sar., 2020). U ovoj studiji, viša koncentracija dihidroceramida i ceramida u krvi i viša produkcija sfinganin-1-fosfata je bila

asocirana sa alelom C varijante rs7216389 koji utiče na nižu ekspresiju *ORMDL3* u brojnim ćelijama i tkivima, uključujući T limfocite, slezini i plućnom tkivu (Carreras-Sureda i sar., 2016; Ono i sar., 2020; www.gtexportal.org). U našoj studiji nije ispitana ova varijanta ali je poznato da su u evropskoj populaciji varijante rs7216389 i varijanta rs12946510 ispitane u ovoj studiji u jakom LD-u (www.ldlink.nih.gov), pa se može pretpostaviti njihov zajednički efekat na produkciju ceramida. Nedavna studija je našla asocijaciju koncentracije više vrsta ceramida i dihidroceramida u perifernoj krvi pacijenata sa RRMS i većim EDSS-om (Filippatou i sar., 2021). Uzevši prethodno rečeno u obzir, može se pretpostaviti da utvrđena razlika u relativnom nivou ekspresije iRNK gena za *ORMDL3* kod RRMS pacijenata u odnosu na različite genotipove varijante rs12946510 bi mogla imati efekat i na koncentracije imunski relevantnih sfingolipida na nivou periferne krvi što bi moglo da utiče na rizik za nastanak MS-a ili klinički tok bolesti. Obzirom na to da koncentracije sfingolipida nisu bile predmet ove disertacije, ova pretpostavka ostaje da se proveriti u nekoj od sledećih studija.

U kontekstu demografskih parametara, detektovali smo negativnu korelaciju između ekspresije *GSDMB* i starosti, kao i kombinovani efekat pola i genotipova varijante rs12946510 na ekspresiju *ORMDL3*, bez individualnog efekta pola. Ovo je prva studija koja je eksperimentalno utvrdila ove asocijacije. Jedno od potencijalnih objašnjenja je da specifičan obrazac metilacije u lokusu 17q12-21 koji zavisi od pola i starosti utiče na regulatorni efekat genetičkih varijanti u lokusu. Utvrđeno je da je metilacija detektovana u okviru ovog lokusa, 17q12-21 uzvodno od *ORMDL3* i *GSDMB* bila polno i starosno specifična u MČPK (Naumova i sar., 2013). Naumova i sar., predložili su model u kome bi nivo metilacije u uzvodnom *ZBP2* (eng. *Zona Pellucida Binding Protein 2*) promotoru, koji zavisi od pola i starosti, mogao da ima efekat na ekspresiju *ORMDL3* i *GSDMB* u zavisnosti od genotipa varijante rs12936231 asocirane sa astmom (Naumova i sar., 2013). Budući da osim studije u okviru ovog doktorata ne postoje druge studije koje su ispitale sličan efekat varijante rs12946510, može se samo predložiti sličan model kao potencijalni mehanizam koji se treba ispitati u drugim studijama.

U okviru trećeg cilja analizirane su asocijacije genetičkih i molekularnih parametara sa parametrima progresije i kliničkom slikom MS-a. Naši rezultati ukazuju na višu ekspresiju *GSDMB* u MČPK pacijenata u relapsu koja je nezavisina u odnosu na genotip varijante rs12946510. Ovo je prva studija koja je utvrdila višu ekspresiju *GSDMB* u MS relapsu, ali nije prva studija koja je asocirala višu ekspresiju *GSDMB* sa inflamatornim stanjima. Leukociti pacijenata sa sepsom i uzorci debelog creva od pacijenata sa inflamatornom bolešću debelog creva imaju povišenu ekspresiju *GSDMB* proteina u odnosu na zdrave kontrole (Chen i sar., 2019). Budući da IFN γ stimuliše ekspresiju *GSDMB* na nivou nekih tumorskih ćelijskih linija (Zhou i sar., 2020), a koncentracija IFN γ je povišena u serumu pacijenata u relapsu (Slavov, 2023), možda bi se rezultat povišene ekspresije *GSDMB* u MS relapsu mogao dovesti u vezu sa IFN γ . Međutim, rezultata koji dokazuju uticaj IFN γ tretmana na ekspresiju *GSDMB* u MČPK ćelijama nema, a njegova koncentracija nije merena u ovoj studiji što ukazuje na potrebu za dodatnim istraživanjima u ekspresije *GSDMB* i relapsa u MS-u.

U grupi RRMS ispitanika, utvrđeno je da primena Interferon β terapije i prisustvo genotipa varijante rs12946510 imaju kombinovani efekat na ekspresiju *GSDMB* sa zapaženom višom ekspresijom kod primaoca terapije. Ovaj rezultat nije neočekivan, budući da je tretman Interferonom β asociran sa višom ekspresijom iRNK *GSDMB* u CD4 $^{+}$ T ćelijama kod pacijenata sa sistemskim lupusom eritromatozusom (Kang i sar., 2018). Može se pretpostaviti da je jedan od mogućih mehanizama koji stoji iza ovog efekta Interferona β indukcija aktivacije transkripcionog regulatora NF- κ B (eng. *Nuclear Factor Kappa B*) (Yang et al., 2000; Chen et al., 2019). Ovo bi bilo moguće objašnjenje budući da NF- κ B pozitivno reguliše ekspresiju *GSDMB* u ćelijskim linijama monocita, promovirajući nekanonsku piroptozu (Chen i sar., 2019), dok signalizacija indukovana Interferonom β dovodi do aktivacije NF- κ B u ćelijskoj kulturi

limfoblastoidnih B ćelija iz Burkittovog limfoma (Yang i sar., 2000). Dodatna istraživanja su neophodna za ispitivanje mehanizma potencijalne interakcije *GSDMB* ekspresije i Interferon β terapije na nivou MČPK, koja bi uzela u obzir potencijalne regulatorne i epigenetičke efekte terapije i genotipa.

Ova studija je pokazala da je sniženje ekspresije gena *ORMDL3* i *GSDMB* specifično za RRMS u odnosu na kontrole i *IKZF3* rs12946510 alel T koji je prethodno bio asociran sa rizikom za MS. Studija takođe asocira višu ekspresiju *GSDMB* sa Interferon β terapijom i relapsom u kontekstu RRMS. Rezultati potvrđuju prethodno utvrđenu asocijaciju MS-a i niže ekspresije *GSDMB* u MČPK (Cardamone i sar., 2017), kao i asocijaciju niže ekspresije *ORMDL3* i *GSDMB* sa genotipom TT *IKZF3* rs12946510 i genotip fenotip interakciju *ORMDL3* i *GSDMB* sa rs12946510 u MS-u (Gresle i sar., 2020). Ekspresije analiziranih iRNK koreliraju na način koji je bio prethodno utvrđen na nivou različitih tipova MČPK (Schmiedel i sar., 2016), dok je korelacije ekspresije *IKZF3* i EDSS paralelna prethodno utvrđenim rezultatima asocijacije ekspresije neuroinflamacije i cirkularnih RNK sa predviđenim efektom na *IKZF3* ekspresiju (Zurawska i sar., 2021). Implicirana je povišena ekspresije *GSDMB* kod RRMS pacijenata u relapsu i kod pacijenata koji primaju Interferon β terapiju, što je slično prethodnim rezultatima koji asociraju ekspresiju *GSDMB* i inflamaciju (Chen i sar., 2019) i *in vitro* studijama koje analiziraju efekat Interferona β na ekspresiju gena u T limfocitima (Kang i sar., 2018).

U našoj studiji smo utvrdili asocijaciju alela G *IL2RA* sa višom ekspresijom *ORMDL3* i *IKZF3* u MČPK RRMS pacijenata, kao i nižu ekspresiju *GSDMB* i *IKZF3* u MČPK zdravih kontrola. RNK sekvenciranjem transkriptoma mišjih aktiviranih CD4⁺ T ćelijama zapaženo je da *in vitro* tretman sa IL-2 rezultuje sa nižom ekspresijom *Ormdl3* i *Ikzf3* (Li i sar., 2017), dajući potencijalnu paralelu sa rezultatom ove doktorske disertacije u MČPK pacijenata sa RRMS formom bolesti budući da alel G *IL2RA* rs2104286 ima negativan efekat na indukciju signalizacije IL-2 (Cerosaletti i sar., 2013). Ova asocijacija je kontradiktorna prethodnoj studiji koja je pokazala da mišlje linije T ćelija tretirane sa IL-2 ne menjaju nivo ekspresije *Ikzf3* iRNK bez obzira što IL-2 dovodi do nuklearne translokacije proteina *Ikzf3* (Romero i sar., 1999). Budući da miševi nemaju *GSDMB* homolog u svom genomu nije moguće koristiti RNK sekvenciranja iz prethodno pomenute studije (Li i sar., 2017) za istraživanje ekspresije ovog gena. Osim studije na transkriptomu aktiviranih mišjih CD4⁺ T ćelija (Li i sar., 2017), trenutno u naučnoj literaturi ne postoje rezultati koji bi implicirali efekat IL-2 signalizacije na *ORMDL3* ekspresiju. Takođe u literaturi ne postoje rezultati koji bi povezali IL-2 signalizaciju i *GSDMB* ekspresiju. U GTEx bazi *IL2RA* rs2104286 je kategorisan kao tkivni eQTL za *IL2RA* na nivou slezine i jednjaka (www.gtexportal.org). U trenutnoj naučnoj literaturi ne postoji dovoljna eksperimentalna osnova da se prodiskutuju razlike u efektu *IL2RA* rs2104286 na ekspresiju *ORMDL3*, *GSDMB* i *IKZF3* kod RRMS pacijenata i zdravih kontrola. Nijedna asocijacije ekspresije *ORMDL3* i *IKZF3* sa rs2104286 nije zadovoljila konvencijalni minimalni kriterijum statističke snage studije od 80% tako da razlike u ekspresiji treba uzeti sa oprezom. Ovi rezultati ukazuju na potrebu za dodatnim istraživanjima u kontekstu ekspresije gena u 17q12-21 hromozomskom regionu i potencijalnih trans-regulatornih SNP-ova.

Rezultati ove disertacije mogu poslužiti za usmeravanje budućih studija analiza genetičke i molekularne osnove MS-a. Jedan pravac budućih istraživanja mogao bi se ticati ispitivanju uticaj rs12946510 i *ORMDL3* ekspresije na produkciju sfingolipida u MS-u, efekat metilacije i genetičkih varijanti u 17q12-21 na dinamiku aktivacije limfocita T u MS-u, uloga nekanonske piroptoze u MČPK u MS-u, uticaj *IFI30* rs11554159 i MHC II varijanti na epitopski repertoar. Takođe potrebno je uraditi replikativnu studiju na većem uzorku i ispitati asocijaciju sa dodatnim kliničkim parametrima poput lokalizacije lezija u CNS-u. Kroz diskusiju dobijenih rezultata sugerisani su mogući molekularni mehanizmi koji bi potencijalno stajali iza prezentovanih asocijacija i predloženi su pravci za buduća istraživanja. Danas, u eri „omike”,

jedan od najvećih izazova u razumevanju molekularnih osnova kompleksnih oboljenja kao što je MS je interpretacija i replikacija velikog broja informacija dobijenih GWAS studijama, sekvenciranjem RNK, metilomskim studijama i sličim moćnim pristupima koji treba da posluže za identifikaciju gena i genetičkih varijanti kao kandidata za predikciju, prevenciju i lečenje MS. Kruna uspeha bi bilo pozicioniranje nađenih varijanti ili transkripata u specifični molekularni kontekst koji se poklapa sa rizikom za nastanak ili kliničkim karakteristikama oboljenja da bi ova istraživanja imala translacioni potencijal za razvijanje novih terapija za MS.

6. ZAKLJUČCI

1. Varijante *IFI30* rs11554159 i *IKZF3* rs12946510 nisu prepoznate kao značajne za nastanak MS-a u ispitanom uzorku pacijenata i zdravih ispitanika iz populacije Srbije. Utvrđeno je da je varijanta *IL2RA* rs2104286 povezana sa nastankom MS-a, gde ređi alel ispoljava protektivan efekat.
2. Utvrđen je kombinovani efekat varijante *HLA-DRB1*15:01* i varijante *IFI30* rs11554159, ređeg homozigotnog genotipa AA, na progresiju MS-a.
3. Smanjena ekspresija iRNK gena *ORMDL3* i *GSDMB* u MČPK je marker relapsno remitetne MS, a nivo ekspresije gena *IKZF3* u MČPK pozitivno korelira sa parametrom neurološkog deficita.
4. Utvrđeno je da varijanta *IKZF3* rs12946510 ispoljava efekat modifikacije nivoa transkripcije gena *ORMDL3* i *GSDMB* u MČPK MS pacijenata sa RRMS formom bolesti.
5. Varijanta *IKZF3* rs12946510 i imunomodulatorna terapija Interferon-om β ispoljavaju kombinovani efekat na ekspresiju gena *GSDMB* u MČPK RRMS pacijenata koji su u remisiji.
6. U analiziranoj grupi pacijenata iz populacije Srbije, koncentracija sCD25 u perifernoj krvi ne predstavlja informativan marker progresije MS-a.

7. LITERATURA:

- Akkad, D.A., Hoffjan, S., Petrasch-Parwez, E., Beygo, J., Gold, R. and Epplen, J.T., 2009. Variation in the IL7RA and IL2RA genes in German multiple sclerosis patients. *Journal of autoimmunity*, 32(2), pp.110-115.
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2009.01.002>
- Albert, F.W. and Kruglyak, L., 2015. The role of regulatory variation in complex traits and disease. *Nature Reviews Genetics*, 16(4), pp.197-212.
<https://doi.org/10.1038/nrg3891>
- Applied Biosystems (2010a). Allelic Discrimination Getting Started Guide. Applied Biosystems, https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_042315.pdf pristupljen 16.03.2024.
- Applied Biosystems (2010b). Relative Quantitation Using Comparative CT Getting Started Guide. Applied Biosystems, pristupljen 16.03.2024.
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_053412.pdf
- Armas, L.A., Dowell, S., Akhter, M., Duthuluru, S., Huerter, C., Hollis, B.W., Lund, R. and Heaney, R.P., 2007. Ultraviolet-B radiation increases serum 25-hydroxyvitamin D levels: the effect of UVB dose and skin color. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 57(4), pp.588-593.
<https://doi.org/10.1016/j.jaad.2007.03.004>
- Arunachalam, B., Phan, U.T., Geuze, H.J. and Cresswell, P., 2000. Enzymatic reduction of disulfide bonds in lysosomes: characterization of a gamma-interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(2), pp.745-750.
<https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.745>
- Atlas of Multiple Sclerosis, pristupljen 26.02.2024.
<https://www.atlasofms.org>
- Bahbouhi, B., Berthelot, L., Pettré, S., Michel, L., Wiertlewski, S., Weksler, B., Romero, I.A., Miller, F., Couraud, P.O., Brouard, S. and Laplaud, D.A., 2009. Peripheral blood CD4⁺ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line. *Journal of Leukocyte Biology*, 86(5), pp.1049-1063.
<https://doi.org/10.1189/jlb.1008666>
- Balce, D.R., Allan, E.R., McKenna, N. and Yates, R.M., 2014. γ -Interferon-inducible lysosomal thiol reductase (GILT) maintains phagosomal proteolysis in alternatively activated macrophages. *Journal of Biological Chemistry*, 289(46), pp.31891-31904.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.584391>
- Barjaktarević, I., Rahman, A., Radoja, S., Bogunović, B., Vollmer, A., Vukmanović, S. and Marić, M., 2006. Inhibitory role of IFN- γ -inducible lysosomal thiol reductase in T cell activation. *The Journal of Immunology*, 177(7), pp.4369-4375.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.7.4369>
- Barrett, J.C., Clayton, D.G., Concannon, P., Akolkar, B., Cooper, J.D., Erlich, H.A., Julier, C., Morahan, G., Nerup, J., Nierras, C. and Plagnol, V., 2009. Genome-wide association study and meta-analysis find that over 40 loci affect risk of type 1 diabetes. *Nature genetics*, 41(6), pp.703-707.
<https://doi.org/10.1038/ng.381>

- Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M. and Bitton, A., 2008. Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease. *Nature genetics*, 40(8), pp.955-962.
<https://doi.org/10.1038/ng.175>
- Belaud-Rotureau, M.A., Leducq, N., de Gannes, F.M.P., Diolez, P., Lacoste, L., Lacombe, F., Bernard, P. and Belloc, F., 2000. Early transitory rise in intracellular pH leads to Bax conformation change during ceramide-induced apoptosis. *Apoptosis*, 5, pp.551-560.
<https://doi.org/10.1023/a:1009693630664>
- Belot, M.P., Castell, A.L., Le Fur, S. and Bougnères, P., 2018. Dynamic demethylation of the IL2RA promoter during in vitro CD4⁺ T cell activation in association with IL2RA expression. *Epigenetics*, 13(5), pp.459-472.
<https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1469893>
- Bergman, C.M., Marta, C.B., Maric, M., Pfeiffer, S.E., Cresswell, P. and Ruddle, N.H., 2012. A switch in pathogenic mechanism in myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis in IFN- γ -inducible lysosomal thiol reductase-free mice. *The Journal of Immunology*, 188(12), pp.6001-6009.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1101898>
- Bertrams, J. and Kuwert, E., 1972. HL-A antigen frequencies in multiple sclerosis. *European neurology*, 7(1-2), pp.74-78.
<https://doi.org/10.1159/000114414>
- Bielekova, B., Sung, M.H., Kadom, N., Simon, R., McFarland, H. and Martin, R., 2004. Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4⁺ T cells in multiple sclerosis. *The Journal of Immunology*, 172(6), pp.3893-3904.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.6.3893>
- Bogunovic, B., Srinivasan, P., Ueda, Y., Tomita, Y. and Maric, M., 2010. Comparative quantitative mass spectrometry analysis of MHC class II-associated peptides reveals a role of GILT in formation of self-peptide repertoire. *PLoS One*, 5(5), p.e10599.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010599>
- Bogunovic, B., Stojakovic, M., Chen, L. and Maric, M., 2008. An unexpected functional link between lysosomal thiol reductase and mitochondrial manganese superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, 283(14), pp.8855-8862.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M708998200>
- Boles, G.S., Hillert, J., Ramanujam, R., Westerlind, H., Olsson, T., Kockum, I. and Manouchehrinia, A., 2023. The familial risk and heritability of multiple sclerosis and its onset phenotypes: A case-control study. *Multiple Sclerosis Journal*, 29(10), pp.1209-1215.
<https://doi.org/10.1177/13524585231185258>
- Braga, T.T., Brandao, W.N., Azevedo, H., Terra, F.F., Melo, A.C.L., Pereira, F.V., Andrade-Oliveira, V., Hiyane, M.I., Peron, J.P.S. and Camara, N.O.S., 2019. NLRP3 gain-of-function in CD4⁺ T lymphocytes ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical Science*, 133(17), pp.1901-1916.
<https://doi.org/10.1042/CS20190506>
- Browne, P., Chandraratna, D., Angood, C., Tremlett, H., Baker, C., Taylor, B.V. and Thompson, A.J., 2014. Atlas of multiple sclerosis 2013: a growing global problem with widespread inequity. *Neurology*, 83(11), pp.1022-1024.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000768>

- Buhelt, S., Ratzer, R.L., Christensen, J.R., Börnsen, L., Sellebjerg, F. and Søndergaard, H.B., 2017. Relationship between soluble CD25 and gene expression in healthy individuals and patients with multiple sclerosis. *Cytokine*, 93, pp.15-25.
<https://doi.org/10.1016/j.cyto.2017.04.024>
- Buhelt, S., Søndergaard, H.B., Oturai, A., Ullum, H., von Essen, M.R. and Sellebjerg, F., 2019. Relationship between multiple sclerosis-associated IL2RA risk allele variants and circulating T cell phenotypes in healthy genotype-selected controls. *Cells*, 8(6), p.634.
<https://doi.org/10.3390/cells8060634>
- Busse, D., de la Rosa, M., Hobiger, K., Thurley, K., Flossdorf, M., Scheffold, A. and Höfer, T., 2010. Competing feedback loops shape IL-2 signaling between helper and regulatory T lymphocytes in cellular microenvironments. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), pp.3058-3063.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0812851107>
- Caballero, R., Setien, F., Lopez-Serra, L., Boix-Chornet, M., Fraga, M.F., Ropero, S., Megias, D., Alaminos, M., Sanchez-Tapia, E.M., Montoya, M.C. and Esteller, M., 2007. Combinatorial effects of splice variants modulate function of Aiolos. *Journal of cell science*, 120(15), pp.2619-2630.
<https://doi.org/10.1242/jcs.007344>
- Cabrera-Ortega, A.A., Feinberg, D., Liang, Y., Rossa Jr, C. and Graves, D.T., 2017. The role of forkhead box 1 (FOXO1) in the immune system: dendritic cells, T cells, B cells, and hematopoietic stem cells. *Critical Reviews™ in Immunology*, 37(1).
<https://doi.org/10.1615/CritRevImmunol.2017019636>
- Cai, X., Qiao, Y., Diao, C., Xu, X., Chen, Y., Du, S., Liu, X., Liu, N., Yu, S., Chen, D. and Jiang, Y., 2014. Association between polymorphisms of the IKZF3 gene and systemic lupus erythematosus in a Chinese Han population. *PloS one*, 9(10), p.e108661.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0108661>
- Cantero-Recasens, G., Fandos, C., Rubio-Moscardo, F., Valverde, M.A. and Vicente, R., 2010. The asthma-associated ORMDL3 gene product regulates endoplasmic reticulum-mediated calcium signaling and cellular stress. *Human molecular genetics*, 19(1), pp.111-121.
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddp471>
- Cardamone, G., Paraboschi, E.M., Rimoldi, V., Duga, S., Soldà, G. and Asselta, R., 2017. The characterization of GSDMB splicing and backsplicing profiles identifies novel isoforms and a circular RNA that are dysregulated in multiple sclerosis. *International journal of molecular sciences*, 18(3), p.576.
<https://doi.org/10.3390/ijms18030576>
- Carreras-Sureda, A., Cantero-Recasens, G., Rubio-Moscardo, F., Kiefer, K., Peinelt, C., Niemeyer, B.A., Valverde, M.A. and Vicente, R., 2013. ORMDL3 modulates store-operated calcium entry and lymphocyte activation. *Human molecular genetics*, 22(3), pp.519-530.
<https://doi.org/10.1093/hmg/dds450>
- Carreras-Sureda, A., Rubio-Moscardo, F., Olvera, A., Argilaguet, J., Kiefer, K., Mothe, B., Meyerhans, A., Brander, C. and Vicente, R., 2016. Lymphocyte activation dynamics is shaped by hereditary components at chromosome region 17q12-q21. *PLoS One*, 11(11), p.e0166414.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166414>

- Cencioni, M.T., Mattoscio, M., Magliozzi, R., Bar-Or, A. and Muraro, P.A., 2021. B cells in multiple sclerosis—from targeted depletion to immune reconstitution therapies. *Nature Reviews Neurology*, 17(7), pp.399-414.
<https://doi.org/10.1038/s41582-021-00498-5>
- Cerosaletti, K., Schneider, A., Schwedhelm, K., Frank, I., Tatum, M., Wei, S., Whalen, E., Greenbaum, C., Kita, M., Buckner, J. and Long, S.A., 2013. Multiple autoimmune-associated variants confer decreased IL-2R signaling in CD4⁺ CD25^{hi} T cells of type 1 diabetic and multiple sclerosis patients. *PLoS one*, 8(12), p.e83811.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0083811>
- Charil, A., Zijdenbos, A.P., Taylor, J., Boelman, C., Worsley, K.J., Evans, A.C. and Dagher, A., 2003. Statistical mapping analysis of lesion location and neurological disability in multiple sclerosis: application to 452 patient data sets. *Neuroimage*, 19(3), pp.532-544.
[https://doi.org/10.1016/s1053-8119\(03\)00117-4](https://doi.org/10.1016/s1053-8119(03)00117-4)
- Chen, Q., Shi, P., Wang, Y., Zou, D., Wu, X., Wang, D., Hu, Q., Zou, Y., Huang, Z., Ren, J. and Lin, Z., 2019. GSDMB promotes non-canonical pyroptosis by enhancing caspase-4 activity. *Journal of molecular cell biology*, 11(6), pp.496-508.
<https://doi.org/10.1093/jmcb/mjy056>
- Clark, A.D., Nair, N., Anderson, A.E., Thalayasingam, N., Naamane, N., Skelton, A.J., Diboll, J., Barton, A., Eyre, S., Isaacs, J.D. and Pratt, A.G., 2020. Lymphocyte DNA methylation mediates genetic risk at shared immune-mediated disease loci. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 145(5), pp.1438-1451.
<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2019.12.910>
- Clarke, B.A., Majumder, S., Zhu, H., Lee, Y.T., Kono, M., Li, C., Khanna, C., Blain, H., Schwartz, R., Huso, V.L. and Byrnes, C., 2019. The Ormdl genes regulate the sphingolipid synthesis pathway to ensure proper myelination and neurologic function in mice. *elife*, 8, p.e51067.
<https://doi.org/10.7554/eLife.51067>
- Compston, D.A.S., Batchelor, J.R. and McDonald, W.I., 1976. B-lymphocyte alloantigens associated with multiple sclerosis. *The Lancet*, 308(7998), pp.1261-1265.
[https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(76\)92027-4](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(76)92027-4)
- Correale, J. and Villa, A., 2008. Isolation and characterization of CD8⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, 195(1-2), pp.121-134.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.12.004>
- Correale, J. and Villa, A., 2010. Role of CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, 67(5), pp.625-638.
<https://doi.org/10.1002/ana.21944>
- Cortés, M. and Georgopoulos, K., 2004. Aiolos is required for the generation of high affinity bone marrow plasma cells responsible for long-term immunity. *The Journal of experimental medicine*, 199(2), pp.209-219.
<https://doi.org/10.1084/jem.20031571>
- Cunha, M.I., Su, M., Cantuti-Castelvetri, L., Müller, S.A., Schifferer, M., Djannatian, M., Alexopoulos, I., van der Meer, F., Winkler, A., van Ham, T.J. and Schmid, B., 2020. Pro-inflammatory activation following demyelination is required for myelin clearance and oligodendrogenesis. *Journal of Experimental Medicine*, 217(5).
<https://doi.org/10.1084/jem.20191390>
- Dalla Rosa, I., Durigon, R., Pearce, S.F., Rorbach, J., Hirst, E.M., Vidoni, S., Reyes, A., Brea-Calvo, G., Minczuk, M., Woellhaf, M.W. and Herrmann, J.M., 2014.

MPV17L2 is required for ribosome assembly in mitochondria. *Nucleic acids research*, 42(13), pp.8500-8515.

<https://doi.org/10.1093/nar/gku513>

- Davis, D.L., Gable, K., Suemitsu, J., Dunn, T.M. and Wattenberg, B.W., 2019. The ORMDL/Orm-serine palmitoyltransferase (SPT) complex is directly regulated by ceramide: Reconstitution of SPT regulation in isolated membranes. *Journal of Biological Chemistry*, 294(13), pp.5146-5156.
<https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.007291>
- De Jager, P.L., Jia, X., Wang, J., De Bakker, P.I., Ottoboni, L., Aggarwal, N.T., Piccio, L., Raychaudhuri, S., Tran, D., Aubin, C. and Briskin, R., 2009. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nature genetics*, 41(7), pp.776-782.
<https://doi.org/10.1038/ng.401>
- Di Narzo, A.F., Peters, L.A., Argmann, C., Stojmirovic, A., Perrigoue, J., Li, K., Telesco, S., Kidd, B., Walker, J., Dudley, J. and Cho, J., 2016. Blood and intestine eQTLs from an anti-TNF-resistant Crohn's disease cohort inform IBD genetic association loci. *Clinical and translational gastroenterology*, 7(6), p.e177.
<https://doi.org/10.1038/ctg.2016.34>
- Diaz-Sanchez, M., Williams, K., DeLuca, G.C. and Esiri, M.M., 2006. Protein co-expression with axonal injury in multiple sclerosis plaques. *Acta neuropathologica*, 111, pp.289-299.
<https://doi.org/10.1007/s00401-006-0045-0>
- Dombrowski, Y., O'hagan, T., Dittmer, M., Penalva, R., Mayoral, S.R., Bankhead, P., Fleville, S., Eleftheriadis, G., Zhao, C., Naughton, M. and Hassan, R., 2017. Regulatory T cells promote myelin regeneration in the central nervous system. *Nature neuroscience*, 20(5), pp.674-680.
<https://doi.org/10.1038/nn.4528>
- Du, J., Wang, X., Tan, G., Wei, W., Zhou, F., Liang, Z., Li, H. and Yu, H., 2021. Predisposition to Graves' disease and Graves' ophthalmopathy by genetic variants of IL2RA. *Journal of Molecular Medicine*, 99, pp.1487-1495.
<https://doi.org/10.1007/s00109-021-02111-0>
- Dunne, J., Lynch, S., O'Farrelly, C., Todryk, S., Hegarty, J.E., Feighery, C. and Doherty, D.G., 2001. Selective expansion and partial activation of human NK cells and NK receptor-positive T cells by IL-2 and IL-15. *The Journal of Immunology*, 167(6), pp.3129-3138.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.6.3129>
- Ebers, G.C. and Sadovnick, A.D., 1994. The role of genetic factors in multiple sclerosis susceptibility. *Journal of neuroimmunology*, 54(1-2), pp.1-17.
[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(94\)90225-9](https://doi.org/10.1016/0165-5728(94)90225-9)
- Elpek, K.G., Yolcu, E.S., Franke, D.D., Lacelle, C., Schabowsky, R.H. and Shirwan, H., 2007. Ex vivo expansion of CD4+ CD25+ FoxP3+ T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling. *The Journal of Immunology*, 179(11), pp.7295-7304.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.179.11.7295>
- Ensembl Genome Browser 111, pristupljen 14.03.2024.
<https://www.ensembl.org>
- Farh, K.K.H., Marson, A., Zhu, J., Kleinewietfeld, M., Housley, W.J., Beik, S., Shores, N., Whitton, H., Ryan, R.J., Shishkin, A.A. and Hatan, M., 2015. Genetic and

epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, 518(7539), pp.337-343.

<https://doi.org/10.1038/nature13835>

- Ferrarini, A.M., Sivieri, S., Buttarelli, M., Facchinetti, A., Perini, P. and Gallo, P., 1998. Time-course analysis of CD25 and HLA-DR expression on lymphocytes in interferon- β 1b-treated multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis Journal*, 4(3), pp.174-177.
<https://doi.org/10.1177/135245859800400316>
- Filippatou, A.G., Moniruzzaman, M., Sotirchos, E.S., Fitzgerald, K.C., Kalaitzidis, G., Lambe, J., Vasileiou, E., Saidha, S., Prince, J.L., Haughey, N. and Calabresi, P.A., 2021. Serum ceramide levels are altered in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, 27(10), pp.1506-1519.
<https://doi.org/10.1177/1352458520971816>
- Fischer, M.T., Sharma, R., Lim, J.L., Haider, L., Frischer, J.M., Drexhage, J., Mahad, D., Bradl, M., van Horssen, J. and Lassmann, H., 2012. NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain*, 135(3), pp.886-899.
<https://doi.org/10.1093/brain/aws012>
- Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Grønning, M., Hillert, J. and Olerup, O., 2000. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue antigens*, 55(2), pp.140-148.
<https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2000.550205.x>
- Ford, A.L., Foulcher, E., Lemckert, F.A. and Sedgwick, J.D., 1996. Microglia induce CD4 T lymphocyte final effector function and death. *The Journal of experimental medicine*, 184(5), pp.1737-1745.
<https://doi.org/10.1084/jem.184.5.1737>
- Frischer, J.M., Bramow, S., Dal-Bianco, A., Lucchinetti, C.F., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S. and Lassmann, H., 2009. *The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains*. *Brain*, 132(5), pp.1175-1189.
<https://doi.org/10.1093/brain/awp070>
- Gandhi, R., Kumar, D., Burns, E.J., Nadeau, M., Dake, B., Laroni, A., Kozoriz, D., Weiner, H.L. and Quintana, F.J., 2010. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nature immunology*, 11(9), pp.846-853.
<https://doi.org/10.1038/ni.1915>
- George, M.F., Briggs, F.B., Shao, X., Gianfrancesco, M.A., Kockum, I., Harbo, H.F., Celius, E.G., Bos, S.D., Hedström, A., Shen, L. and Bernstein, A., 2016. Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurology: Genetics*, 2(4), p.e87.
<https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000087>
- Gil-González, I., Martín-Rodríguez, A., Conrad, R. and Pérez-San-Gregorio, M.Á., 2020. Quality of life in adults with multiple sclerosis: a systematic review. *BMJ open*, 10(11), p.e041249.
<https://doi.org/10.1136/bmjopen-2020-041249>
- Gong, W., Liu, P., Liu, J., Li, Y., Zheng, T., Wu, X., Zhao, Y. and Ren, J., 2022. GSDMB N-terminal assembles in plasma membrane to execute pyroptotic cell death. *Genes & Diseases*, 9(6), p.1405.
<https://doi.org/10.1016/j.gendis.2021.12.022>

- Gresle, M.M., Jordan, M.A., Stankovich, J., Spelman, T., Johnson, L.J., Laverick, L., Hamlett, A., Smith, L.D., Jokubaitis, V.G., Baker, J. and Haartsen, J., 2020. Multiple sclerosis risk variants regulate gene expression in innate and adaptive immune cells. *Life science alliance*, 3(7).
<https://doi.org/10.26508/lsa.202000650>
- GTEx Consortium, 2020. The GTEx Consortium atlas of genetic regulatory effects across human tissues. *Science*, 369(6509), pp.1318-1330.
<https://doi.org/10.1126/science.aaz1776>
- Gupta, S.D., Gable, K., Alexaki, A., Chandris, P., Proia, R.L., Dunn, T.M. and Harmon, J.M., 2015. Expression of the ORMDLS, modulators of serine palmitoyltransferase, is regulated by sphingolipids in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(1), pp.90-98.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588236>
- Habbestad, A., Willumsen, J.S., Aarseth, J.H., Grytten, N., Midgard, R., Wergeland, S., Myhr, K.M. and Torkildsen, Ø., 2024. Increasing age of multiple sclerosis onset from 1920 to 2022: a population-based study. *Journal of Neurology*, 271(4), pp.1610-1617.
<https://doi.org/10.1007/s00415-023-12047-9>
- Haider, L., Zrzavy, T., Hametner, S., Höftberger, R., Bagnato, F., Grabner, G., Trattnig, S., Pfeifenbring, S., Brück, W. and Lassmann, H., 2016. *The topography of demyelination and neurodegeneration in the multiple sclerosis brain*. *Brain*, 139(3), pp.807-815.
<https://doi.org/10.1093/brain/awv398>
- Harbo, H.F., Lie, B.A., Sawcer, S., Celius, E.G., Dai, K.Z., Oturai, A., Hillert, J., Lorentzen, Å.R., Laaksonen, M., Myhr, K.M. and Ryder, L.P., 2004. Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue antigens*, 63(3), pp.237-247.
<https://doi.org/10.1111/j.0001-2815.2004.00173.x>
- Harp, C.T., Lovett-Racke, A.E., Racke, M.K., Frohman, E.M. and Monson, N.L., 2008. Impact of myelin-specific antigen presenting B cells on T cell activation in multiple sclerosis. *Clinical immunology*, 128(3), pp.382-391.
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2008.05.002>
- Hastings, K. T., Lackman, R. L., and Cresswell, P. (2006). Functional requirements for the lysosomal thiol reductase GILT in MHC class II-restricted antigen processing. *Journal of immunology*, 177(12), pp8569–8577.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.12.8569>
- Herrera-Luis, E., Espuela-Ortiz, A., Lorenzo-Diaz, F., Keys, K.L., Mak, A.C., Eng, C., Huntsman, S., Villar, J., Rodriguez-Santana, J.R., Burchard, E.G. and Pino-Yanes, M., 2021. Genome-wide association study reveals a novel locus for asthma with severe exacerbations in diverse populations. *Pediatric Allergy and Immunology*, 32(1), pp.106-115.
<https://doi.org/10.1111/pai.13337>
- Hinks, A., Ke, X., Barton, A., Eyre, S., Bowes, J., Worthington, J., UK Rheumatoid Arthritis Genetics Consortium, British Society of Paediatric and Adolescent Rheumatology Study Group, Thompson, S.D., Langefeld, C.D. and Glass, D.N., 2009. Association of the IL2RA/CD25 gene with juvenile idiopathic arthritis. *Arthritis & Rheumatism*, 60(1), pp.251-257.
<https://doi.org/10.1002/art.24187>

- Hitomi, Y., Kojima, K., Kawashima, M., Kawai, Y., Nishida, N., Aiba, Y., Yasunami, M., Nagasaki, M., Nakamura, M. and Tokunaga, K., 2017. Identification of the functional variant driving ORMDL3 and GSDMB expression in human chromosome 17q12-21 in primary biliary cholangitis. *Scientific reports*, 7(1), p.2904.
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-03067-3>
- Hjelmqvist, L., Tuson, M., Marfany, G., Herrero, E., Balcells, S. and González-Duarte, R., 2002. ORMDL proteins are a conserved new family of endoplasmic reticulum membrane proteins. *Genome biology*, 3, pp.1-16.
<https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-6-research0027>
- Huang, Q., 2015. Genetic study of complex diseases in the post-GWAS era. *Journal of Genetics and Genomics*, 42(3), pp.87-98.
<https://doi.org/10.1016/j.jgg.2015.02.001>
- Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Öhlén, C. and Goverman, J., 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8⁺ T cells in a model for multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*, 194(5), pp.669-676.
<https://doi.org/10.1084/jem.194.5.669>
- Ifergan, I., Kebir, H., Alvarez, J.I., Marceau, G., Bernard, M., Bourbonniere, L., Poirier, J., Duquette, P., Talbot, P.J., Arbour, N. and Prat, A., 2011. Central nervous system recruitment of effector memory CD8⁺ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. *Brain*, 134(12), pp.3560-3577.
<https://doi.org/10.1093/brain/awr268>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium and MultipleMS Consortium, 2023. Locus for severity implicates CNS resilience in progression of multiple sclerosis. *Nature*, 619(7969), pp.323–331.
<https://doi.org/10.1038/s41586-023-06250-x>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium*†, ANZgene, IIBDGC and WTCCC2, 2019. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science*, 365(6460), p.eaav7188.
<https://doi.org/10.1126/science.aav7188>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *New England Journal of Medicine*, 357(9), pp.851-862.
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa073493>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2011b. Genome-wide association study of severity in multiple sclerosis. *Genes and immunity*, 12(8), pp.615–625.
<https://doi.org/10.1038/gene.2011.34>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Beecham, A.H., Patsopoulos, N.A., Xifara, D.K., Davis, M.F., Kempainen, A., Cotsapas, C., Shah, T.S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., Oturai, A., Saarela, J., Fontaine, B., Hemmer, B., Martin, C., Zipp, F., D'Alfonso, S., Martinelli-Boneschi, F., Taylor, B., Harbo, H.F., Kockum, I., Hillert, J., Olsson, T., Ban, M., Oksenberg, J.R., Hintzen, R., Barcellos, L.F. Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), Agliardi, C., Alfredsson, L., Alizadeh, M., Anderson, C., Andrews, R., Søndergaard, H.B., Baker, A., Band, G., Baranzini, S.E., Barizzone, N., Barrett, J., Bellenguez, C., Bergamaschi, L., Bernardinelli, L., Berthele, A., Biberacher, V., Binder, T.M., Blackburn, H., Bomfim, I.L., Brambilla, P., Broadley, S., Brochet, B., Brundin, L., Buck, D., Butzkueven, H., Caillier, S.J., Camu, W., Carpentier, W., Cavalla, P., Celius, E.G., Coman, I., Comi, G., Corrado, L., Cosemans, L., Cournu-Rebeix, I., Cree, B.A., Cusi, D., Damotte, V., Defer, G., Delgado, S.R., Deloukas, P.,

di Sapio, A., Dilthey, A.T., Donnelly, P., Dubois, B., Duddy, M., Edkins, S., Elovaara, I., Esposito, F., Evangelou, N., Fiddes, B., Field, J., Franke, A., Freeman, C., Frohlich, I.Y., Galimberti, D., Gieger, C., Gourraud, P.A., Graetz, C., Graham, A., Grummel, V., Guaschino, C., Hadjixenofontos, A., Hakonarson, H., Halfpenny, C., Hall, G., Hall, P., Hamsten, A., Harley, J., Harrower, T., Hawkins, C., Hellenthal, G., Hillier, C., Hobart, J., Hoshi, M., Hunt, S.E., Jagodic, M., Jelčić, I., Jochim, A., Kendall, B., Kermode, A., Kilpatrick, T., Koivisto, K., Konidari, I., Korn, T., Kronsbein, H., Langford, C., Larsson, M., Lathrop, M., Lebrun-Frenay, C., Lechner-Scott, J., Lee, M.H., Leone, M.A., Leppä, V., Liberatore, G., Lie, B.A., Lill, C.M., Lindén, M., Link, J., Luessi, F., Lycke, J., Macciardi, F., Männistö, S., Manrique, C.P., Martin, R., Martinelli, V., Mason, D., Mazibrada, G., McCabe, C., Mero, I.L., Mescheriakova, J., Moutsianas, L., Myhr, K.M., Nagels, G., Nicholas, R., Nilsson, P., Piehl, F., Pirinen, M., Price, S.E., Quach, H., Reunanen, M., Robberecht, W., Robertson, N.P., Rodegher, M., Rog, D., Salvetti, M., Schnetz-Boutaud, N.C., Sellebjerg, F., Selter, R.C., Schaefer, C., Shaunak, S., Shen, L., Shields, S., Siffrin, V., Slee, M., Sorensen, P.S., Sorosina, M., Sospedra, M., Spurkland, A., Strange, A., Sundqvist, E., Thijs, V., Thorpe, J., Ticca, A., Tienari, P., van Duijn, C., Visser, E.M., Vucic, S., Westerlind, H., Wiley, J.S., Wilkins, A., Wilson, J.F., Winkelmann, J., Zajicek, J., Zindler, E., Haines, J.L., Pericak-Vance, M.A., Ivinson, A.J., Stewart, G., Hafler, D., Hauser, S.L., Compston, A., McVean, G., De Jager, P., Sawcer, S.J. and McCauley, J.L., 2013. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nature genetics*, 45(11), pp 1353–1360.

<https://doi.org/10.1038/ng.2770>

- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., Freeman, C., Hunt, S.E., Edkins, S., Gray, E., Booth, D.R., Potter, S.C., Goris, A., Band, G., Oturai, A.B., Strange, A., Saarela, J., Bellenguez, C., Fontaine, B., Gillman, M., Hemmer, B., Gwilliam, R., Zipp, F., Jayakumar, A., Martin, R., Leslie, S., Hawkins, S., Giannoulatou, E., D'alfonso, S., Blackburn, H., Martinelli Boneschi, F., Liddle, J., Harbo, H.F., Perez, M.L., Spurkland, A., Waller, M.J., Mycko, M.P., Ricketts, M., Comabella, M., Hammond, N., Kockum, I., McCann, O.T., Ban, M., Whittaker, P., Kempainen, A., Weston, P., Hawkins, C., Widaa, S., Zajicek, J., Dronov, S., Robertson, N., Bumpstead, S.J., Barcellos, L.F., Ravindrarajah, R., Abraham, R., Alfredsson, L., Ardlie, K., Aubin, C., Baker, A., Baker, K., Baranzini, S.E., Bergamaschi, L., Bergamaschi, R., Bernstein, A., Berthele, A., Boggild, M., Bradfield, J.P., Brassat, D., Broadley, S.A., Buck, D., Butzkueven, H., Capra, R., Carroll, W.M., Cavalla, P., Celius, E.G., Cepok, S., Chiavacci, R., Clerget-Darpoux, F., Clysters, K., Comi, G., Cossburn, M., Cournu-Rebeix, I., Cox, M.B., Cozen, W., Cree, B.A., Cross, A.H., Cusi, D., Daly, M.J., Davis, E., de Bakker, P.I., Debouverie, M., D'hooghe, M.B., Dixon, K., Dobosi, R., Dubois, B., Ellinghaus, D., Elovaara, I., Esposito, F., Fontenille, C., Foote, S., Franke, A., Galimberti, D., Ghezzi, A., Glessner, J., Gomez, R., Gout, O., Graham, C., Grant, S.F., Guerini, F.R., Hakonarson, H., Hall, P., Hamsten, A., Hartung, H.P., Heard, R.N., Heath, S., Hobart, J., Hoshi, M., Infante-Duarte, C., Ingram, G., Ingram, W., Islam, T., Jagodic, M., Kabesch, M., Kermode, A.G., Kilpatrick, T.J., Kim, C., Klopp, N., Koivisto, K., Larsson, M., Lathrop, M., Lechner-Scott, J.S., Leone, M.A., Leppä, V., Liljedahl, U., Bomfim, I.L., Lincoln, R.R., Link, J., Liu, J., Lorentzen, A.R., Lupoli, S., Macciardi, F., Mack, T., Marriott, M., Martinelli, V., Mason, D., McCauley, J.L., Mentch, F., Mero, I.L., Mihalova, T., Montalban, X., Mottershead, J., Myhr, K.M., Naldi, P., Ollier, W., Page, A., Palotie, A., Pelletier, J., Piccio, L., Pickersgill, T., Piehl, F., Pobywajlo,

S., Quach, H.L., Ramsay, P.P., Reunanen, M., Reynolds, R., Rioux, J.D., Rodegher, M., Roesner, S., Rubio, J.P., Rückert, I.M., Salvetti, M., Salvi, E., Santaniello, A., Schaefer, C.A., Schreiber, S., Schulze, C., Scott, R.J., Sellebjerg, F., Selmaj, K.W., Sexton, D., Shen, L., Simms-Acuna, B., Skidmore, S., Sleiman, P.M., Smestad, C., Sørensen, P.S., Søndergaard, H.B., Stankovich, J., Strange, R.C., Sulonen, A.M., Sundqvist, E., Syvänen, A.C., Taddeo, F., Taylor, B., Blackwell, J.M., Tienari, P., Bramon, E., Tourbah, A., Brown, M.A., Tronczynska, E., Casas, J.P., Tubridy, N., Corvin, A., Vickery, J., Jankowski, J., Villoslada, P., Markus, H.S., Wang, K., Mathew, C.G., Wason, J., Palmer, C.N., Wichmann, H.E., Plomin, R., Willoughby, E., Rautanen, A., Winkelmann, J., Wittig, M., Trembath, R.C., Yaouanq, J., Viswanathan, A.C., Zhang, H., Wood, N.W., Zuvich, R., Deloukas, P., Langford, C., Duncanson, A., Oksenberg, J.R., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Olsson, T., Hillert, J., Ivinson, A.J., De Jager, P.L., Peltonen, L., Stewart, G.J., Hafler, D.A., Hauser, S.L., McVean, G., Donnelly, P. and Compston, A., 2011a. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476: pp.214–219.

<https://doi.org/10.1038/nature10251>

- Jaigirdar, S.A., Benson, R.A., Elmesmari, A., Kurowska-Stolarska, M.S., McInnes, I.B., Garside, P. and MacLeod, M.K., 2017. Sphingosine-1-phosphate promotes the persistence of activated CD4 T cells in inflamed sites. *Frontiers in immunology*, 8, p.303009.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01627>
- Jelinek, D.F., Splawski, J.B. and Lipsky, P.E., 1986. The roles of interleukin 2 and interferon- γ in human B cell activation, growth and differentiation. *European journal of immunology*, 16(8), pp.925-932.
<https://doi.org/10.1002/eji.1830160809>
- Jostins, L., Ripke, S., Weersma, R.K., Duerr, R.H., McGovern, D.P., Hui, K.Y., Lee, J.C., Philip Schumm, L., Sharma, Y., Anderson, C.A. and Essers, J., 2012. Host–microbe interactions have shaped the genetic architecture of inflammatory bowel disease. *Nature*, 491(7422), pp.119-124.
<https://doi.org/10.1038/nature11582>
- Kang, H.M., Subramaniam, M., Targ, S., Nguyen, M., Maliskova, L., McCarthy, E., Wan, E., Wong, S., Byrnes, L., Lanata, C.M. and Gate, R.E., 2018. Multiplexed droplet single-cell RNA-sequencing using natural genetic variation. *Nature biotechnology*, 36(1), pp.89-94.
<https://doi.org/10.1038/nbt.4042>
- Kaskow, B.J. and Baecher-Allan, C., 2018. Effector T cells in multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(4), p.a029025.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a029025>
- Kataoka, H., Sugahara, K., Shimano, K., Teshima, K., Koyama, M., Fukunari, A. and Chiba, K., 2005. FTY720, sphingosine 1-phosphate receptor modulator, ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis by inhibition of T cell infiltration. *Cell Mol Immunol*, 2(6), pp.439-448.
- Keshari, P.K., Harbo, H.F., Myhr, K.M., Aarseth, J.H., Bos, S.D. and Berge, T., 2016. Allelic imbalance of multiple sclerosis susceptibility genes IKZF3 and IQGAP1 in human peripheral blood. *BMC genetics*, 17, pp.1-9.
<https://doi.org/10.1186/s12863-016-0367-4>
- Kirby, L., Jin, J., Cardona, J.G., Smith, M.D., Martin, K.A., Wang, J., Strasburger, H., Herbst, L., Alexis, M., Karnell, J. and Davidson, T., 2019. Oligodendrocyte precursor cells present antigen and are cytotoxic targets in inflammatory demyelination. *Nature communications*, 10(1), p.3887.

- <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11638-3>
- Klineova, S. and Lublin, F.D., 2018. Clinical course of multiple sclerosis. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(9), p.a028928.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028928>
 - Koipally, J., Renold, A., Kim, J. and Georgopoulos, K., 1999. Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *The EMBO journal*, 18(11), pp.3090-3100.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.11.3090>
 - Kruglov, A.A., Lampropoulou, V., Fillatreau, S. and Nedospasov, S.A., 2011. Pathogenic and protective functions of TNF in neuroinflammation are defined by its expression in T lymphocytes and myeloid cells. *The Journal of Immunology*, 187(11), pp.5660-5670.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1100663>
 - Kuhlmann, T., Ludwin, S., Prat, A., Antel, J., Brück, W. and Lassmann, H., 2017. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta neuropathologica*, 133, pp.13-24.
<https://doi.org/10.1007/s00401-016-1653-y>
 - Kułakowska, A., Żendzian-Piotrowska, M., Baranowski, M., Konończuk, T., Drozdowski, W., Górski, J. and Bucki, R., 2010. Intrathecal increase of sphingosine 1-phosphate at early stage multiple sclerosis. *Neuroscience letters*, 477(3), pp.149-152.
<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2010.04.052>
 - Kunkel, L.M., Smith, K.D., Boyer, S.H., Borgaonkar, D.S., Wachtel, S.S., Miller, O.J., Breg, W.R., Jones Jr, H.W. and Rary, J.M., 1977. Analysis of human Y-chromosome-specific reiterated DNA in chromosome variants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(3), pp.1245-1249.
<https://doi.org/10.1073/pnas.74.3.1245>
 - Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, 33(11), pp.1444-1444.
<https://doi.org/10.1212/wnl.33.11.1444>
 - Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C.F., Stadelmann, C., Brück, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J.E. and Lassmann, H., 2005. *Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis*. *Brain*, 128(11), pp.2705-2712.
<https://doi.org/10.1093/brain/awh641>
 - Lackman, R.L., Jamieson, A.M., Griffith, J.M., Geuze, H. and Cresswell, P., 2007. Innate immune recognition triggers secretion of lysosomal enzymes by macrophages. *Traffic*, 8(9), pp.1179-1189.
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2007.00600.x>
 - Lai, Y.P., Lin, C.C., Liao, W.J., Tang, C.Y. and Chen, S.C., 2009. CD4⁺ T cell-derived IL-2 signals during early priming advances primary CD8⁺ T cell responses. *PloS one*, 4(11), p.e7766.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007766>
 - Lassmann, H., 2018. Multiple sclerosis pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(3).
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028936>
 - Li, L., Ding, X., Wang, X., Yao, Q., Shao, X., An, X., Yan, N., Jiang, Y., Wang, W., Shi, L. and Qin, Q., 2018. Polymorphisms of IKZF3 gene and autoimmune thyroid diseases: associated with Graves' disease but not with Hashimoto's thyroiditis. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 45(5), pp.1787-1796.

- <https://doi.org/10.1159/000487870>
- Li, P., Mitra, S., Spolski, R., Oh, J., Liao, W., Tang, Z., Mo, F., Li, X., West, E.E., Gromer, D. and Lin, J.X., 2017. STAT5-mediated chromatin interactions in superenhancers activate IL-2 highly inducible genes: Functional dissection of the Il2ra gene locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(46), pp.12111-12119.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1714019114>
 - Liao, W., Lin, J.X. and Leonard, W.J., 2013. Interleukin-2 at the crossroads of effector responses, tolerance, and immunotherapy. *Immunity*, 38(1), pp.13-25.
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2013.01.004>
 - Liao, W., Lin, J.X., Wang, L., Li, P. and Leonard, W.J., 2011. Cytokine receptor modulation by interleukin-2 broadly regulates T helper cell lineage differentiation. *Nature immunology*, 12(6), p.551.
<https://doi.org/10.1038/ni.2030>
 - Liao, W., Schones, D.E., Oh, J., Cui, Y., Cui, K., Roh, T.Y., Zhao, K. and Leonard, W.J., 2008. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2-mediated induction of interleukin 4 receptor α -chain expression. *Nature immunology*, 9(11), pp.1288-1296.
<https://doi.org/10.1038/ni.1656>
 - Lin, X., Deng, F.Y., Mo, X.B., Wu, L.F. and Lei, S.F., 2015. Functional relevance for multiple sclerosis-associated genetic variants. *Immunogenetics*, 67, pp.7-14.
<https://doi.org/10.1007/s00251-014-0803-4>
 - Linkeage Disequilibrium Link, pristupljeno 25.03.2024.
<https://ldlink.nih.gov>
 - Liu, F., Sun, Y., Zhou, Y., Gao, Y., Song, Q., Yang, J., Xu, C. and Li, G., 2023. ORMDL3-mediated bronchial epithelial pyroptosis leads to lung inflammation in obese mice with asthma. *Molecular Medicine Reports*, 28(4), pp.1-13.
<https://doi.org/10.3892/mmr.2023.13073>
 - Liu, Y., Given, K.S., Harlow, D.E., Matschulat, A.M., Macklin, W.B., Bennett, J.L. and Owens, G.P., 2017. Myelin-specific multiple sclerosis antibodies cause complement-dependent oligodendrocyte loss and demyelination. *Acta neuropathologica communications*, 5(1), pp.1-13.
<https://doi.org/10.1186/s40478-017-0428-6>
 - Lublin, F.D., Reingold, S.C. and National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis*, 1996. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology*, 46(4), pp.907-911.
<https://doi.org/10.1212/wnl.46.4.907>
 - Lublin, F.D., Reingold, S.C., Cohen, J.A., Cutter, G.R., Sørensen, P.S., Thompson, A.J., Wolinsky, J.S., Balcer, L.J., Banwell, B., Barkhof, F. and Bebo Jr, B., 2014. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology*, 83(3), pp.278-286.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000000560>
 - Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M. and Lassmann, H., 2000. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 47(6), pp.707-717.
[https://doi.org/10.1002/1531-8249\(200006\)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q](https://doi.org/10.1002/1531-8249(200006)47:6<707::aid-ana3>3.0.co;2-q)

- Maier, L.M., Anderson, D.E., Severson, C.A., Baecher-Allan, C., Healy, B., Liu, D.V., Wittrup, K.D., De Jager, P.L. and Hafler, D.A., 2009a. Soluble IL-2RA levels in multiple sclerosis subjects and the effect of soluble IL-2RA on immune responses. *The Journal of Immunology*, 182(3), pp.1541-1547.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.3.1541>
- Maier, L.M., Lowe, C.E., Cooper, J., Downes, K., Anderson, D.E., Severson, C., Clark, P.M., Healy, B., Walker, N., Aubin, C. and Oksenberg, J.R., 2009b. IL2RA genetic heterogeneity in multiple sclerosis and type 1 diabetes susceptibility and soluble interleukin-2 receptor production. *PLoS genetics*, 5(1), p.e1000322.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000322>
- Malhotra, S., Hurtado-Navarro, L., Pappolla, A., Villar, L.M., Río, J., Montalban, X., Pelegrin, P. and Comabella, M., 2023. Increased NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis in patients with multiple sclerosis with fingolimod treatment failure. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 10(3), p.e200100.
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000200100>
- Maric, M., Arunachalam, B., Phan, U.T., Dong, C., Garrett, W.S., Cannon, K.S., Alfonso, C., Karlsson, L., Flavell, R.A. and Cresswell, P., 2001. Defective antigen processing in GILT-free mice. *Science*, 294(5545), pp.1361-1365.
<https://doi.org/10.1126/science.1065500>
- Maric, M., Barjaktarevic, I., Bogunovic, B., Stojakovic, M., Maric, C. and Vukmanovic, S., 2009. Cutting edge: developmental up-regulation of IFN- γ -inducible lysosomal thiol reductase expression leads to reduced T cell sensitivity and less severe autoimmunity. *The Journal of Immunology*, 182(2), pp.746-750.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.182.2.746>
- Martinez-Forero, I., Garcia-Munoz, R., Martinez-Pasamar, S., Inoges, S., Lopez-Diaz de Cerio, A., Palacios, R., Sepulcre, J., Moreno, B., Gonzalez, Z., Fernandez-Diez, B. and Melero, I., 2008. IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *European journal of immunology*, 38(2), pp.576-586.
<https://doi.org/10.1002/eji.200737271>
- Matyszak, M.K., Denis-Donini, S., Citterio, S., Longhi, R., Granucci, F. and Ricciardi-Castagnoli, P., 1999. Microglia induce myelin basic protein-specific T cell anergy or T cell activation, according to their state of activation. *European journal of immunology*, 29(10), pp.3063-3076.
[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199910\)29:10<3063::AID-IMMU3063>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199910)29:10<3063::AID-IMMU3063>3.0.CO;2-G)
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.F., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C. and Sandberg-Wollheim, M., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 50(1), pp.121-127.
<https://doi.org/10.1002/ana.1032>
- McKenzie, B.A., Mamik, M.K., Saito, L.B., Boghazian, R., Monaco, M.C., Major, E.O., Lu, J.Q., Branton, W.G. and Power, C., 2018. Caspase-1 inhibition prevents glial inflammasome activation and pyroptosis in models of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(26), pp.E6065-E6074.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1722041115>
- Miclea, A., Salmen, A., Zoehner, G., Diem, L., Kamm, C.P., Chaloulos-Iakovidis, P., Miclea, M., Briner, M., Kilidireas, K., Stefanis, L. and Chan, A., 2019. Age-dependent

variation of female preponderance across different phenotypes of multiple sclerosis: A retrospective cross-sectional study. *CNS neuroscience & therapeutics*, 25(4), pp.527-531.

<https://doi.org/10.1111/cns.13083>

- Mockus, T.E., Munie, A., Atkinson, J.R. and Segal, B.M., 2021. Encephalitogenic and regulatory CD8 T cells in multiple sclerosis and its animal models. *The Journal of Immunology*, 206(1), pp.3-10.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2000797>
- Mundt, S., Mrdjen, D., Utz, S.G., Greter, M., Schreiner, B. and Becher, B., 2019. Conventional DCs sample and present myelin antigens in the healthy CNS and allow parenchymal T cell entry to initiate neuroinflammation. *Science immunology*, 4(31), p.eaau8380.
<https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aau8380>
- Munger, K.L., Levin, L.I., Hollis, B.W., Howard, N.S. and Ascherio, A., 2006. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *Jama*, 296(23), pp.2832-2838.
<https://doi.org/10.1001/jama.296.23.2832>
- Naumova, A.K., Al Tuwaijri, A., Morin, A., Vaillancout, V.T., Madore, A.M., Berlivet, S., Kohan-Ghadr, H.R., Moussette, S. and Laprise, C., 2013. Sex-and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma. *Human genetics*, 132, pp.811-822.
<https://doi.org/10.1007/s00439-013-1298-z>
- Neumann, B., Baror, R., Zhao, C., Segel, M., Dietmann, S., Rawji, K.S., Foerster, S., McClain, C.R., Chalut, K., van Wijngaarden, P. and Franklin, R.J., 2019. Metformin restores CNS remyelination capacity by rejuvenating aged stem cells. *Cell stem cell*, 25(4), pp.473-485.
<https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.08.015>
- Ngo, S.T., Steyn, F.J. and McCombe, P.A., 2014. Gender differences in autoimmune disease. *Frontiers in neuroendocrinology*, 35(3), pp.347-369.
<https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2014.04.004>
- O’Gorman, C., Lin, R., Stankovich, J. and Broadley, S.A., 2012. Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data. *Neuroepidemiology*, 40(1), pp.1-12.
<https://doi.org/10.1159/000341902>
- Ono, J.G., Kim, B.I., Zhao, Y., Christos, P.J., Tesfaigzi, Y., Worgall, T.S. and Worgall, S., 2020. Decreased sphingolipid synthesis in children with 17q21 asthma–risk genotypes. *The Journal of clinical investigation*, 130(2), pp.921-926.
<https://doi.org/10.1172/JCI130860>
- Palanichamy, A., Apeltsin, L., Kuo, T.C., Sirota, M., Wang, S., Pitts, S.J., Sundar, P.D., Telman, D., Zhao, L.Z., Derstine, M. and Abounasr, A., 2014. Immunoglobulin class-switched B cells form an active immune axis between CNS and periphery in multiple sclerosis. *Science translational medicine*, 6(248), pp.248ra106-248ra106.
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3008930>
- Patsopoulos, N.A., 2018. Genetics of multiple sclerosis: an overview and new directions. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 8(7), p.a028951.
<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028951>
- Permanyer, M., Bošnjak, B., Glage, S., Friedrichsen, M., Floess, S., Huehn, J., Patzer, G.E., Odak, I., Eckert, N., Zargari, R. and Ospina-Quintero, L., 2021. Efficient IL-2R

signaling differentially affects the stability, function, and composition of the regulatory T-cell pool. *Cellular & Molecular Immunology*, 18(2), pp.398-414.

<https://doi.org/10.1038/s41423-020-00599-z>

- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L. and Lublin, F.D., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*, 69(2), pp.292-302.
<https://doi.org/10.1002/ana.22366>
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W. and Sandberg-Wollheim, M., 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the “McDonald Criteria”. *Annals of Neurology: Official Journal of the American Neurological Association and the Child Neurology Society*, 58(6), pp.840-846.
<https://doi.org/10.1002/ana.20703>
- Pourakbari, R., Hosseini, M., Aslani, S., Ayoubi-joshaghani, M.H., Valizadeh, H., Roshangar, L., Ahmadi, M. and Shirvani, B., 2020. Association between interleukin 2 receptor A gene polymorphisms (rs2104286 and rs12722489) with susceptibility to multiple sclerosis in Iranian population. *Meta Gene*, 25, p.100750
- PolyPhen-2 Prediction of Functional Effects of Human nsSNPs, pristupljen 03.22.2024.
<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>
- Prosperini, L., Lucchini, M., Ruggieri, S., Tortorella, C., Haggiag, S., Mirabella, M., Pozzilli, C. and Gasperini, C., 2022. Shift of multiple sclerosis onset towards older age. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 93(10), pp.1137-1139.
<https://doi.org/10.1136/jnnp-2022-329049>
- Proteomics Data Base (ProteomicsDB), pristupljen 24.03.2024.
<https://www.proteomicsdb.org>
- Putscher, E., Hecker, M., Fitzner, B., Boxberger, N. and Zettl, U.K., 2022. Genetic risk variants for multiple sclerosis are linked to differences in alternative pre-mRNA splicing. *Frontiers in Immunology*, 13, p.931831.
<https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.931831>
- Quintana, F.J., Farez, M.F., Izquierdo, G., Lucas, M., Cohen, I.R. and Weiner, H.L., 2012a. Antigen microarrays identify CNS-produced autoantibodies in RRMS. *Neurology*, 78(8), pp.532-539.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318247f9f3>
- Quintana, F.J., Jin, H., Burns, E.J., Nadeau, M., Yeste, A., Kumar, D., Rangachari, M., Zhu, C., Xiao, S., Seavitt, J. and Georgopoulos, K., 2012b. Aiolos promotes TH17 differentiation by directly silencing Il2 expression. *Nature immunology*, 13(8), pp.770-777.
<https://doi.org/10.1038/ni.2363>
- Rausch, M.P., Meador, L.R., Metzger, T.C., Li, H., Qiu, S., Anderson, M.S. and Hastings, K.T., 2020. GILT in thymic epithelial cells facilitates central CD4 T cell tolerance to a tissue-restricted, melanoma-associated self-antigen. *The Journal of Immunology*, 204(11), pp.2877-2886.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1900523>
- Rebollo, A., Ayllón, V., Fleischer, A. and Zaballos, A., 2001. The association of Aiolos transcription factor and Bcl-xL is involved in the control of apoptosis. *The Journal of Immunology*, 167(11), pp.6366-6373.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.167.11.6366>

- Reich, D.E. and Lander, E.S., 2001. On the allelic spectrum of human disease. *TRENDS in Genetics*, 17(9), pp.502-510.
[https://doi.org/10.1016/s0168-9525\(01\)02410-6](https://doi.org/10.1016/s0168-9525(01)02410-6)
- Rickert, M., Boulanger, M.J., Goriatcheva, N. and Garcia, K.C., 2004. Compensatory energetic mechanisms mediating the assembly of signaling complexes between interleukin-2 and its α , β , and γ c receptors. *Journal of molecular biology*, 339(5), pp.1115-1128.
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.04.038>
- Romero, F., Martínez-A, C., Camonis, J. and Rebollo, A., 1999. Aiolos transcription factor controls cell death in T cells by regulating Bcl-2 expression and its cellular localization. *The EMBO journal*.
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.12.3419>
- Romero-Pinel, L., Bau, L., Matas, E., León, I., Muñoz-Vendrell, A., Arroyo, P., Masuet-Aumatell, C., Martínez-Yélamos, A. and Martínez-Yélamos, S., 2022. The age at onset of relapsing-remitting multiple sclerosis has increased over the last five decades. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, 68, p.104103.
<https://doi.org/10.1016/j.msard.2022.104103>
- Roostaei, T., Klein, H.U., Ma, Y., Felsky, D., Kivisäkk, P., Connor, S.M., Kroshilina, A., Yung, C., Kaskow, B.J., Shao, X. and Rhead, B., 2021. Proximal and distal effects of genetic susceptibility to multiple sclerosis on the T cell epigenome. *Nature communications*, 12(1), p.7078.
<https://doi.org/10.1038/s41467-021-27427-w>
- Roxburgh, R.H.S.R., Seaman, S.R., Masterman, T., Hensiek, A.E., Sawcer, S.J., Vukusic, S., Achiti, I., Confavreux, C., Coustans, M., Le Page, E. and Edan, G., 2005. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology*, 64(7), pp.1144-1151.
<https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000156155.19270.F8>
- Saevarsdottir, S., Stefansdottir, L., Sulem, P., Thorleifsson, G., Ferkingstad, E., Rutsdottir, G., Glintborg, B., Westerlind, H., Grondal, G., Loft, I.C. and Sorensen, S.B., 2022. Multiomics analysis of rheumatoid arthritis yields sequence variants that have large effects on risk of the seropositive subset. *Annals of the rheumatic diseases*, 81(8), pp.1085-1095.
<https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2021-221754>
- Schaid, D.J., Chen, W. and Larson, N.B., 2018. From genome-wide associations to candidate causal variants by statistical fine-mapping. *Nature Reviews Genetics*, 19(8), pp.491-504.
<https://doi.org/10.1038/s41576-018-0016-z>
- Schmidt, H., Williamson, D. and Ashley-Koch, A., 2007. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *American journal of epidemiology*, 165(10), pp.1097-1109.
<https://doi.org/10.1093/aje/kwk118>
- Schmiedel, B.J., Seumois, G., Samaniego-Castruita, D., Cayford, J., Schulten, V., Chavez, L., Ay, F., Sette, A., Peters, B. and Vijayanand, P., 2016. 17q21 asthma-risk variants switch CTCF binding and regulate IL-2 production by T cells. *Nature communications*, 7(1), p.13426.
<https://doi.org/10.1038/ncomms13426>
- Schwab, S.R., Pereira, J.P., Matloubian, M., Xu, Y., Huang, Y. and Cyster, J.G., 2005. Lymphocyte sequestration through S1P lyase inhibition and disruption of S1P gradients. *Science*, 309(5741), pp.1735-1739.

<https://doi.org/10.1126/science.1113640>

- Schwartz, A.M., Demin, D.E., Vorontsov, I.E., Kasyanov, A.S., Putlyayeva, L.V., Tatosyan, K.A., Kulakovskiy, I.V. and Kuprash, D.V., 2017. Multiple single nucleotide polymorphisms in the first intron of the IL2RA gene affect transcription factor binding and enhancer activity. *Gene*, 602, pp.50-56.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.11.032>
- Selmaj, K., Raine, C.S., Cannella, B. and Brosnan, C.F., 1991. Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *The Journal of clinical investigation*, 87(3), pp.949-954.
<https://doi.org/10.1172/JCI115102>
- Shatrova, A.N., Mityushova, E.V., Vassilieva, I.O., Aksenov, N.D., Zenin, V.V., Nikolsky, N.N. and Marakhova, I.I., 2016. Time-dependent regulation of IL-2R α -chain (CD25) expression by TCR signal strength and IL-2-induced STAT5 signaling in activated human blood T lymphocytes. *PLoS One*, 11(12), p.e0167215.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167215>
- Sheu, B.C., Hsu, S.M., Ho, H.N., Lien, H.C., Huang, S.C. and Lin, R.H., 2001. A novel role of metalloproteinase in cancer-mediated immunosuppression. *Cancer research*, 61(1), pp.237-242.
- Singh, R. and Cresswell, P., 2010. Defective cross-presentation of viral antigens in GILT-free mice. *Science*, 328(5984), pp.1394-1398.
<https://doi.org/10.1126/science.1189176>
- Sintzel, M.B., Rametta, M. and Reder, A.T., 2018. Vitamin D and multiple sclerosis: a comprehensive review. *Neurology and therapy*, 7, pp.59-85.
<https://doi.org/10.1007/s40120-017-0086-4>
- Slavov, G., 2023. Changes in serum cytokine profile and deficit severity in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Folia Medica*, 65(4), pp.625-630.
<https://doi.org/10.3897/folmed.65.e86576>
- Smith, G.A., Uchida, K., Weiss, A. and Taunton, J., 2016. Essential biphasic role for JAK3 catalytic activity in IL-2 receptor signaling. *Nature chemical biology*, 12(5), pp.373-379.
<https://doi.org/10.1038/nchembio.2056>
- Stahl, E.A., Raychaudhuri, S., Remmers, E.F., Xie, G., Eyre, S., Thomson, B.P., Li, Y., Kurreeman, F.A., Zhernakova, A., Hinks, A. and Guiducci, C., 2010. Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nature genetics*, 42(6), pp.508-514.
<https://doi.org/10.1038/ng.582>
- Stauber, D.J., Debler, E.W., Horton, P.A., Smith, K.A. and Wilson, I.A., 2006. Crystal structure of the IL-2 signaling complex: paradigm for a heterotrimeric cytokine receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(8), pp.2788-2793.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0511161103>
- Stefanović, M., Stojković, L., Životić, I., Dinčić, E., Stanković, A. and Živković, M., 2024. Expression levels of GSDMB and ORMDL3 are associated with relapsing-remitting multiple sclerosis and IKZF3 rs12946510 variant. *Heliyon*, 10(3).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25033>
- Stefanović, M., Životić, I., Stojković, L., Dinčić, E., Stanković, A. and Živković, M., 2020. The association of genetic variants IL2RA rs2104286, IFI30 rs11554159 and IKZF3 rs12946510 with multiple sclerosis onset and severity in patients from Serbia. *Journal of Neuroimmunology*, 347, p.577346.
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577346>

- Tang, W., Cui, D., Jiang, L., Zhao, L., Qian, W., Long, S.A. and Xu, K., 2015. Association of common polymorphisms in the IL 2 RA gene with type 1 diabetes: evidence of 32,646 individuals from 10 independent studies. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 19(10), pp.2481-2488.
<https://doi.org/10.1111/jcmm.12642>
- Tanuma, N., Sakuma, H., Sasaki, A. and Matsumoto, Y., 2006. Chemokine expression by astrocytes plays a role in microglia/macrophage activation and subsequent neurodegeneration in secondary progressive multiple sclerosis. *Acta neuropathologica*, 112, pp.195-204.
<https://doi.org/10.1007/s00401-006-0083-7>
- The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Portal, pristupljen 14.03.2024.
<https://www.gtexportal.org>
- Thermo Fisher Scientific (2010). NanoDrop 1000 Spectrophotometer V3.8 User's Manual. Thermo Fisher Scientific, pristupljen 16.03.2024.
<https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/nd-1000-v3.8-users-manual-8%205x11.pdf>
- Thermo Fisher Scientific (2013). RevertAid RT Kit #K1691 Product Information. Thermo Fisher Scientific, pristupljen 16.03.2024.
https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0012955_RevertAid_RT_UG.pdf,
- Thermo Fisher Scientific (2014). Qubit® 3.0 Fluorometer. Thermo Fisher Scientific, pristupljen 16.03.2024.
https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/qubit_3_fluorometer_man.pdf,
- Thompson, A.J., Banwell, B.L., Barkhof, F., Carroll, W.M., Coetzee, T., Comi, G., Correale, J., Fazekas, F., Filippi, M., Freedman, M.S. and Fujihara, K., 2018. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *The Lancet Neurology*, 17(2), pp.162-173.
[https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(17\)30470-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(17)30470-2)
- Thornton, A.M., Donovan, E.E., Piccirillo, C.A. and Shevach, E.M., 2004. Cutting edge: IL-2 is critically required for the in vitro activation of CD4⁺ CD25⁺ T cell suppressor function. *The Journal of Immunology*, 172(11), pp.6519-6523.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.11.6519>
- Toomer, K.H., Lui, J.B., Altman, N.H., Ban, Y., Chen, X. and Malek, T.R., 2019. Essential and non-overlapping IL-2R α -dependent processes for thymic development and peripheral homeostasis of regulatory T cells. *Nature communications*, 10(1), p.1037.
<https://doi.org/10.1038/s41467-019-08960-1>
- Traboulsee, A.L., Bernales, C.Q., Ross, J.P., Lee, J.D., Sadovnick, A.D. and Vilariño-Güell, C., 2014. Genetic variants in IL2RA and IL7R affect multiple sclerosis disease risk and progression. *Neurogenetics*, 15, pp.165-169.
<https://doi.org/10.1007/s10048-014-0403-3>
- Tranah, G.J., Santaniello, A., Caillier, S.J., D'Alfonso, S., Martinelli Boneschi, F., Hauser, S.L. and Oksenberg, J.R., 2015. Mitochondrial DNA sequence variation in multiple sclerosis. *Neurology*, 85(4), pp.325-330.
<https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000001744>
- Trapp, B.D., Peterson, J., Ransohoff, R.M., Rudick, R., Mörk, S. and Bö, L., 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *New England Journal of Medicine*, 338(5), pp.278-285.
<https://doi.org/10.1056/NEJM199801293380502>

- Turcot, V., Bouchard, L., Faucher, G., Tchernof, A., Deshaies, Y., Perusse, L., Marceau, P., Hould, F.S., Lebel, S. and Vohl, M.C., 2012. A polymorphism of the interferon-gamma-inducible protein 30 gene is associated with hyperglycemia in severely obese individuals. *Human genetics*, 131, pp.57-66.
<https://doi.org/10.1007/s00439-011-1043-4>
- University of California Santa Cruz Genome Browser, pristupljeno 16.03.2024.
<https://www.genome.ucsc.edu>
- Ustiugova, A.S., Korneev, K.V., Kuprash, D.V. and Afanasyeva, M.A., 2019. Functional SNPs in the human autoimmunity-associated locus 17q12-21. *Genes*, 10(2), p.77.
<https://doi.org/10.3390/genes10020077>
- Ustiugova, A.S., Dvorianinova, E.M., Melnikova, N.V., Dmitriev, A.A., Kuprash, D.V. and Afanasyeva, M.A., 2023. CRISPR/Cas9 genome editing demonstrates functionality of the autoimmunity-associated SNP rs12946510. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, 1869(2), p.166599.
<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2022.166599>
- van Nierop, G.P., van Luijn, M.M., Michels, S.S., Melief, M.J., Janssen, M., Langerak, A.W., Ouwendijk, W.J., Hintzen, R.Q. and Verjans, G.M., 2017. Phenotypic and functional characterization of T cells in white matter lesions of multiple sclerosis patients. *Acta neuropathologica*, 134, pp.383-401.
<https://doi.org/10.1007/s00401-017-1744-4>
- Vartanian, T., Li, Y., Zhao, M. and Stefansson, K., 1995. Interferon- γ -induced oligodendrocyte cell death: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *Molecular Medicine*, 1, pp.732-743.
- Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L. and Hafler, D.A., 2004. Loss of functional suppression by CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*, 199(7), pp.971-979.
<https://doi.org/10.1084/jem.20031579>
- Vos, C.M., Geurts, J.J., Montagne, L., van Haastert, E.S., Bö, L., van der Valk, P., Barkhof, F. and de Vries, H.E., 2005. Blood–brain barrier alterations in both focal and diffuse abnormalities on postmortem MRI in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease*, 20(3), pp.953-960.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2005.06.012>
- Walton, C., King, R., Rechtman, L., Kaye, W., Leray, E., Marrie, R.A., Robertson, N., La Rocca, N., Uitdehaag, B., van Der Mei, I. and Wallin, M., 2020. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS. *Multiple Sclerosis Journal*, 26(14), pp.1816-1821.
<https://doi.org/10.1177/1352458520970841>
- Wang, H., Xu, Z., Du, W., Lin, Z. and Liu, Z., 2019. N160 of Aiolos Determines its DNA-Binding Activity. *The Anatomical Record*, 302(11), pp.2014-2019.
<https://doi.org/10.1002/ar.24213>
- Wang, J.H., Avitahl, N., Cariappa, A., Friedrich, C., Ikeda, T., Renold, A., Andrikopoulos, K., Liang, L., Pillai, S., Morgan, B.A. and Georgopoulos, K., 1998. Aiolos regulates B cell activation and maturation to effector state. *Immunity*, 9(4), pp.543-553.
[https://doi.org/10.1016/s1074-7613\(00\)80637-8](https://doi.org/10.1016/s1074-7613(00)80637-8)
- Wang, L.M., Zhang, D.M., Xu, Y.M. and Sun, S.L., 2011. Interleukin 2 receptor α gene polymorphism and risk of multiple sclerosis: a meta-analysis. *Journal of International Medical Research*, 39(5), pp.1625-1635.

- <https://doi.org/10.1177/147323001103900505>
- Wang, X.X. and Chen, T., 2018. Meta-analysis of the association of IL2RA polymorphisms rs2104286 and rs12722489 with multiple sclerosis risk. *Immunological investigations*, 47(5), pp.431-442.
<https://doi.org/10.1080/08820139.2018.1425699>
 - Weber, F., Fontaine, B., Cournu-Rebeix, I., Kroner, A., Knop, M., Lutz, S., Müller-Sarnowski, F., Uhr, M., Bettecken, T., Kohli, M. and Ripke, S., 2008. IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European populations. *Genes & Immunity*, 9(3), pp.259-263.
<https://doi.org/10.1038/gene.2008.14>
 - Witkowska, A.M., Socha, K., Kochanowicz, J., Karpińska, E., Jakoniuk, M., Zujko, M.E., Wilkiel, M., Borawska, M.H. and Mariak, Z., 2016. Serum levels of biomarkers of immune activation and associations with neurological impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis patients during remission. *Biological research for nursing*, 18(1), pp.113-119.
<https://doi.org/10.1177/1099800415583105>
 - Wuest, T.Y., Willette-Brown, J., Durum, S.K. and Hurwitz, A.A., 2008. The influence of IL-2 family cytokines on activation and function of naturally occurring regulatory T cells. *Journal of Leucocyte Biology*, 84(4), pp.973-980.
<https://doi.org/10.1189/jlb.1107778>
 - Wuhan Fine Biotech (2022), Human CD25(Interleukin 2 Receptor Alpha) ELISA Kit User Manual V4.0, Wuhan Fine Biotech, pristupljen 16.03.2024.
<https://static.fn-test.cn/product/manuals/elisa/EH0081.pdf>
 - Xia, Z.L., Qin, Q.M. and Zhao, Q.Y., 2018. A genetic link between CXCR5 and IL2RA gene polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *Neurological Research*, 40(12), pp.1040-1047.
<https://doi.org/10.1080/01616412.2018.1517110>
 - Xie, T., Liu, P., Wu, X., Dong, F., Zhang, Z., Yue, J., Mahawar, U., Farooq, F., Vohra, H., Fang, Q. and Liu, W., 2023. Ceramide sensing by human SPT-ORMDL complex for establishing sphingolipid homeostasis. *Nature Communications*, 14(1), p.3475.
<https://doi.org/10.1038/s41467-023-39274-y>
 - Yang, C.H., Murti, A., Pfeffer, S.R., Basu, L., Kim, J.G. and Pfeffer, L.M., 2000. IFN α/β promotes cell survival by activating NF- κ B. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(25), pp.13631-13636.
<https://doi.org/10.1073/pnas.250477397>
 - Yang, P.C. and Jafri, M.S., 2020. Ca²⁺ signaling in T lymphocytes: the interplay of the endoplasmic reticulum, mitochondria, membrane potential, and CRAC channels on transcription factor activation. *Heliyon*, 6(3).
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e03526>
 - Zahid, A., Ismail, H. and Jin, T., 2021. Molecular and structural aspects of gasdermin family pores and insights into gasdermin-elicited programmed cell death. *Biochemical Society Transactions*, 49(6), pp.2697-2710.
<https://doi.org/10.1042/BST20210672>
 - Zhao, C.N., Fan, Y., Huang, J.J., Zhang, H.X., Gao, T., Wang, C., Wang, T. and Hou, L.F., 2015. The association of GSDMB and ORMDL3 gene polymorphisms with asthma: a meta-analysis. *Allergy, asthma & immunology research*, 7(2), p.175.
<https://doi.org/10.4168/aaair.2015.7.2.175>
 - Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q. and Ramaraju, H., 2006. Ceramides and other

bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1758(12), pp.1864-1884.

<https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2006.08.009>

- Zhou, W., Hu, W., Tang, L., Ma, X., Liao, J., Yu, Z., Qi, M., Chen, B. and Li, J., 2024. Meta-analysis of the Selected Genetic Variants in Immune-Related Genes and Multiple Sclerosis Risk. *Molecular Neurobiology*, pp.1-13.
<https://doi.org/10.1007/s12035-024-04095-7>
- Zhou, Z., He, H., Wang, K., Shi, X., Wang, Y., Su, Y., Wang, Y., Li, D., Liu, W., Zhang, Y. and Shen, L., 2020. Granzyme A from cytotoxic lymphocytes cleaves GSDMB to trigger pyroptosis in target cells. *Science*, 368(6494), p.eaaz7548.
<https://doi.org/10.1126/science.aaz7548>
- Zhuang, Y., Lu, Y., Li, D., Sun, N. and Ju, X., 2015. Upregulation of AIOLOS induces apoptosis and enhances etoposide chemosensitivity in Jurkat leukemia cells. *Oncology Reports*, 33(3), pp.1319-1325.
<https://doi.org/10.3892/or.2014.3677>
- Živković, M., Stanković, A., Dinčić, E., Popović, M., Popović, S., Raičević, R. and Alavantić, D., 2009. The tag SNP for HLA-DRB1*15:01, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: Cost-effective high-throughput detection by real-time PCR. *Clinica Chimica Acta*, 406(1-2), pp.27-30.
<https://doi.org/10.1016/j.cca.2009.05.004>
- Zurawska, A.E., Mycko, M.P., Selmaj, I., Raine, C.S. and Selmaj, K.W., 2021. Multiple sclerosis: circRNA profile defined reveals links to B-cell function. *Neurology: Neuroimmunology & Neuroinflammation*, 8(5), p.e1041.
<https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001041>
- Zuvich, R.L., McCauley, J.L., Pericak-Vance, M.A. and Haines, J.L., 2009, December. Genetics and pathogenesis of multiple sclerosis. In *Seminars in immunology* (Vol. 21, No. 6, pp. 328-333). Academic Press.
<https://doi.org/10.1016/j.smim.2009.08.003>

BIOGRAFIJA AUTORA

Milan B. Stefanović je rođen 11.02.1993. u Beogradu gde je završio osnovnu školu i zaključio svoje srednje obrazovanje. 2012. upisuje osnovne akademske studije na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu na modulu Molekularna biologija i fiziologija. Završio je osnovne akademske studije u junu 2016-e sa prosečnom ocenom od 9.93. U oktobru 2016. je upisao master studije na modulu Humana molekularna genetika, na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. U septembru 2017. odbranio je master tezu, čiji je eksperimentalni deo urađen u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu gentiku u Insitutu za nuklearne nauke „Vinča”, i završio master studije sa prosečnom ocnom od 10. Upisao je doktorske studije na modulu Molekualrna biologija eukariota na Biološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu. Od maja 2018. do decembra 2021. Milan Stefanović je bio stipendista Ministarstva prosvete nauke i tehnološkog razvoja, Republike Srbije na projektu „Genetska osnova humanih vaskularnih i inflamatornih bolesti“ OI 175085. Od maja 2021. je u zvanju istraživač saradnik. Od januara 2022. Milan Stefanović je zaposlen u Laboratoriji za radiobiologiju i molekularnu gentiku Insituta za nuklearne nauke „Vinča”, Instituta od nacionbalnog značaja za Republiku Srbiju, Univerziteta u Beogradu. Od 2022. je angažovan na projektu finansiranom od strane Fonda za nauku Republike Srbije, u okviru poziva Ideje- „FerroReg” br. 7753406. Milan Stefanović je objavio 4 rada u međunarodnim časopisima i predstavio 2 rada u formi kongresnog saopštenja na međunarodnim, i jedan na domaćem skupu uže naučne oblasti.

образац изјаве о ауторству

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора Милан Стефановић

Број индекса М3002/2017

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом: Повезаност потенцијално регулаторних варијанти у генима *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* и експресије одабраних циљних гена са настанком и тежином мултипле склероз

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

Потпис аутора

У Београду, 25.09.2024.



образац изјаве о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Милан Стефановић

Број индекса М3002/2017

Студијски програм Молекуларна биологија еукариота

Наслов рада „Повезаност потенцијално регулаторних варијанти у генима *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* и експресије одабраних циљних гена са настанком и тежином мултипле склерозе“

Ментор др Маја Живковић, Научни саветник, Института за нуклеарне науке „Винча“, Института од националног значаја за Републику Србију, Универзитета у Београду

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

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

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

Потпис аутора

У Београду, 25.09.2024.

Милан Стефановић

образац изјаве о коришћењу

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом: „Повезаност потенцијално регулаторних варијанти у генима *IL2RA*, *IFI30*, *IKZF3* и експресије одабраних циљних гена са настанком и тежином мултипле склерозе“

која је моје ауторско дело.

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

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

1. Ауторство (CC BY)

2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)

3. Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)

4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)

5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)

6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.

Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 25.09.2024.



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

5. **Ауторство – без прерада.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. **Ауторство – делити под истим условима.** Дозвољава умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.