

Primjena genomske analize u istraživanju biomarkera razvoja multiple skleroze u bolesnika s optičkim neuritisom

Habek, Mario

Doctoral thesis / Disertacija

2010

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, School of Medicine / Sveučilište u Zagrebu, Medicinski fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:105:504685>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2025-01-25**



Repository / Repozitorij:

[Dr Med - University of Zagreb School of Medicine Digital Repository](#)





Središnja medicinska knjižnica

Habek, Mario (2010) *Primjena genomske analize u istraživanju biomarkera razvoja multiple skleroze u bolesnika s optičkim neuritisom*. Doktorska disertacija, Sveučilište u Zagrebu.

<http://medlib.mef.hr/864>

University of Zagreb Medical School Repository

<http://medlib.mef.hr/>

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mario Habek

**Primjena genomske analize u
istraživanju biomarkera razvoja
multiple skleroze u bolesnika s
optičkim neuritisom**

DISERTACIJA



Zagreb, 2010.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
MEDICINSKI FAKULTET**

Mario Habek

**Primjena genomske analize u
istraživanju biomarkera razvoja
multiple skleroze u bolesnika s
optičkim neuritisom**

DISERTACIJA

Zagreb, 2010.

Disertacija je izrađena na Klinici za neurologiju, KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta u Zagrebu i Centru za funkcijsku genomiku KBC-a Zagreb i Medicinskog fakulteta u Zagrebu.

Voditeljica rada: prof. dr. sc. Vesna Brinar, dr. med.

Zahvaljujem se prof. dr. sc. Vesni Brinar na stručnom vodstvu i poticanju na rad te doc. dr. sc. Franu Borovečkom na velikoj pomoći prilikom izrade rezultata.

Naposljetku, zahvaljujem se kolegicama s Odjela VI. neurologije, Barbari i Terezi na prijateljskoj podršci i pomoći.

SADRŽAJ

1. Uvod.....	1
1.1. Multipla skleroza.....	2
1.1.1. Klinički izolirani sindrom.....	2
1.1.2. Optički neuritis.....	2
1.1.3. Patologija multiple skleroze.....	6
1.1.4. Rizični čimbenici multiple skleroze: genetika ili okolišni čimbenici?.....	8
1.1.5. Imunopatogeneza multiple skleroze.....	10
1.1.6. Ima li klinički izolirani sindrom važnost u progresiji multiple skleroze?.....	12
1.1.7. Uloga MRI u dijagnozi klinički izoliranog sindroma i multiple skleroze.....	15
1.1.8. Dijagnostički kriteriji za multiplu sklerozu.....	18
1.2. Biomarkeri.....	22
1.2.1. Definicije.....	22
1.2.2. Biomarkeri multiple skleroze.....	23
1.2.3. Genomika.....	25
1.2.3.1. Što je do sada otkriveno genomskom analizom ekspresijskog profila moždanog tkiva u MS-u?.....	28
1.2.3.2. Što je do sada otkriveno genomskom analizom ekspresijskog profila krvi u MS-u?.....	31
1.2.4. Proteomika.....	34
1.2.5. Metabolomika.....	36
2. Hipoteza.....	37
3. Ciljevi.....	40

3.1. Opći ciljevi.....	41
3.2. Specifični ciljevi.....	41
3.3. Doprinos i očekivana primjena istraživanja.....	41
4. Ispitanici i metode.....	43
4.1. Odabir bolesnika.....	44
4.2. RNA izolacija.....	44
4.3. Analiza genske ekspresije na DNA čipovima.....	45
4.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom.....	47
4.5. Statističke metode.....	47
4.5.1. Selekcija i potvrda diferencijalno eksprimiranih gena u svojstvu biomarkera.....	48
4.5.2. Analiza genske ontologije.....	48
4.5.3. Analiza statistički značajno promijenjenih putova.....	49
4.5.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom.....	49
4.6. Odobrenja.....	50
5. Rezultati.....	51
5.1. Selekcija gena i njihova biološka obilježja.....	54
5.2. Analiza genske ontologije.....	58
5.3. Gene set enrichment analiza (GSEA).....	75
6. Rasprava.....	82
6.1. Rezultati analize ukupne genske ekspresije u krvi bolesnika s optičkim neuritisom.....	83
6.2. Rezultati analize genske ontologije.....	89

6.3. Rezultati GSEA.....	92
7. Zaključci.....	94
8. Sažetak.....	97
9. Summary.....	100
10. Literatura.....	103
11. Životopis.....	131

Popis oznaka i kratica

5-LO	5-lipoksigenaza
aCl	antikardiolipinska protutijela
ANA	anti nuklearna protutijela
ANCA	anti-neutrofilna citoplazmatska protutijela
CCR3	“chemokine (C-C motif) receptor 3”
CIS	klinički izolirani sindrom
CLEC16A	„C-type lectin domain family 16, member A”
CSF	cerebrospinalni likvor
CT	kompjutorizirana tomografija
CXCL13	kemokin (C-X-C motiv) ligand 13
CXCR4	kemokin (C-X-C motiv) receptor 4
DAVID	“Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery“
DNA	deoksiribonukleinska kiselina
EBV	Epstein-Barr virus
EDMUS	„European Database for Multiple Sclerosis“
EIF2AK2	„eukaryotic translation initiation factor 2-alpha kinase 2”
ENA	„Anti-Extractable Nuclear Antigen” protutijela
FDR	„false discovery rate“
GABA	gama-aminobutirična kiselina
GSEA	„Gene set enrichment analysis“
HIAP	humani IAP
HIV	virus humane imunodeficijencije

IAP	geni koji inhibiraju apoptozu
IFI44	interferonom inducirani protein 44
IFI44L	protein sličan interferonom induciranom proteinu 44
IFI6	interferonom alfa inducirani protein 6
IFIH1	interferon inducirani helikazom C, domena 1
IFIT1	„interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1”
IFIT2	„interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2”
IgG	imunoglobulin G
IgM	imunoglobulin M
IL12A	interleukin 12A
IL2RA	interleukin 2 receptor alfa
IL4	interleukin 4
IL6	interleukin 6
IL7RA	interleukin 7 receptor alfa
IRF8	interferon regulatorni faktor 8
ISG15	„ISG15 ubiquitin-like modifier”
ISG15	interferonom stimulirani gen 15
ITGA4	“integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)”
LCK	leukocitima specifična protein tirozin kinaza
LPXN	“Leupaxin”
MBP	mijelin bazični protein
MHC	kompleks tkivne podudarnosti
MOG	mijelin oligodendrocitni protein

MPHOSPH9	fosfoprotein 9, M faze
MR	magnetska rezonanca
MS	multipla skelroza
MX1	protein rezistencije na Myxovirus 1
NAIP	“NLR family, apoptosis inhibitory protein”
NAWM	bijela tvar normalnog izgleda („normal appearing white matter“)
NES	„normalized enrichment score“
NMO	optički neuromijelitis
NO	dušični oksid
OASL	„2'-5'-oligoadenylate synthetase-like”
OCB	oligoklonske vrpce
OCT	„Optical coherence tomography”
OLIG3/TNFAIP3	oligodendrocitni transkripcijski faktor 3/tumorski faktor nekroze alfa inducirani
ON	protein 3
ONTT	optički neuritis
PCR	„Optic Neuritis Treatment Trial“
PTGER4	reakcija lančane polimeraze
PTPRC	prostanglandin E receptor 4
RGS1	„protein tyrosine phosphatase, receptor type, C“
RIS	regulator signalizacije G proteina 1
RNA	radiološki izolirani sindrom
RSAD2	ribonukleinska kiselina
SLAMF7	„radical S-adenosyl methionine domain containing 2”

SLC11A1	“SLAM family member 7” “solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1”
SLPI	“secretory leukocyte peptidase inhibitor”
STRL22	„seven transmembrane domain orphan receptor 22”
SŽS	središnji živčani sustav
TGF	tumorski čimbenik rasta
TNF	„tumor necrosis factor“
TNFRSF1A	„Tumor necrosis factor receptor superfamily member 1A”
XAF1	„XIAP associated factor 1”
XIAP	X-vezani IAP
ZMIZ1	„zinc finger, MIZ-type containing 1”

1. UVOD

1.1. Multipla skleroza

1.1.1. Klinički izolirani sindrom

Multipla skleroza (MS) je česta kronična bolest središnjeg živčanog sustava (SŽS) koja je patohistološki obilježena područjima upalne demijelinizacije koja se širi SŽS-om. Iako je MS kako patološki tako i klinički heterogena bolest, u 85% bolesnika bolest počinje s akutnom ili subakutnom epizodom neurološkog deficita koja se može pripisati jednoj ili više demijelinizacijskih lezija. Ovakvu prezentaciju nazivamo klinički izoliranim sindromom (CIS).

U 21% pacijenata CIS se prezentira s optičkim neuritisom, u 46% sa mijelopatijom, u 10% sa simptomima moždanog debla te u 23% s multifokalnim simptomima. (1) Jedno od glavnih obilježja MS-a je visok stupanj varijabilnosti u konačnom ishodu između bolesnika, sa spektrom bolesti koji varira od benignog, pa čak i asimptomatskog pa do malignih slučajeva. Stoga određivanje laboratorijskih i kliničkih čimbenika koji bi pouzdano predvidjeli dugoročni ishod bolesti u ranoj fazi bolesti je neophodno.

1.1.2. Optički neuritis

Akutni demijelinizirajući optički neuritis je najčešći uzrok unilateralnog, bolnog gubitka vida u mlađoj životnoj dobi. U SAD-u, incidencija akutnog optičkog neuritisa je 5 slučajeva na 100 000, a prevalencija 15 na 100 000, što vrlo vjerno prati podatke o MS-u. (2) Također se češće javlja kod žena, u omjeru 2:1. Klasičan trijas upalnog optičkog neuritisa se sastoji od gubitka vida, periokularne boli i diskromatopsije. Klinički je karakteriziran relativno brzim nastupom gubitka vida (s ili bez edema optičkog diska) koji je najčešće praćen bolovima prilikom

pokretanja očnih jabučica (Tablica 1). Dijagnoza se potvrđuje dokazivanjem postojanja skotoma, gubitka sposobnosti raspoznavanja boja na zahvaćenom oku te tipičnim nalazom vidinih evociranih potencijala. Kako se iza optičkog neuritisa mogu skrivati i druge bolesti osim MS-a, postavljanje točne dijagnoze je jako bitno zbog različitih načina liječenja. Dijagnoza demijelinizirajućeg optičkog neuritisa se obično postavlja klinički, no danas je neizostavno učiniti MR optičkih živaca i mozga zbog dokazivanja demijelinizacijskih lezija.

Akutni ili subakutni nastanak – progresija od nekoliko dana do 2 tjedna
Mladi odrasli bolesnik, tipično mladi od 45 godina, ali se može javiti u bilo kojoj dobi
Periokularna bol (90%), osobito prilikom pomicanja očnih jabučica – nastaje prije ili za vrijeme gubitka vida
Unilateralan gubitak vidne oštrine – varijabilne težine
Smanjen kontrastan vid te raspoznavanje boja – nije srazmjerno gubitku vidne oštrine
Pogoršanje simptoma kod povišene tjelesne temperature (Uhthoffov fenomen)
Ipsilateralni relativni aferentni pupilarni defekt
Normalan nalaz optičkog diska (65%) ili edem optičkog diska (35%)
Blagi periflebitis
Ispadi vidnog polja

Spontani oporavak vida u više od 90% slučajeva, koja počinje unutar 2-3 tjedna, bez obzira na liječenje
Nema pogoršanja vida nakon što se izostave kortikosteroidi
Blijedoća optičkog diska unutar 4-6 tjedana od nastanka

Tablica 1. Obilježja tipičnog demijelinizacijskog optičkog neuritisa kod odraslih. Modificirano prema Shams et al (3).

Bilateralni, simultani optički neuritis se vrlo rijetko može javiti u sklopu MS-a, iako ovakva prezentacija uvijek treba pobuditi sumnju na neku drugu bolest. Bilateralni optički neuritis u sklopu MS-a se najčešće javlja kod hijzmatškog optičkog neuritisa. (4) Na seriji od 235 bolesnika s optičkim neuritisom, 15 bolesnika (6.4 %) je imalo bilateralni optički neuritis, od kojih su tri slučaja bila postinfektivna, a jedan slučaj je bio vezan uz sarkoidozu. (5)

Inflamatorne optičke neuropatije drugih uzroka osim MS-a su puno rijede i imaju lošiju prognozu. Poseban problem predstavlja optički neuromijelitis (NMO) koji je povezan uz postojanje specifičnog serumskog protutijela na akvaporin-4 vodene kanale (NMO-IgG protutijelo). (6) Kako danas postoji kvantitavni radioimunoprecipitacijski esej kojim se ovo protutijelo lagano može dokazati u serumu, moguće je relativno lagano postaviti dijagnozu NMO-a kod bolesnika s recidivirajućim optičkim neuritisima. Kako se uz NMO često javljaju i druge autoimune bolesti, danas se smatra da su svi slučajevi autoimunog optičkog neuritisa (koji se nazivaju autoimunim zbog postojanja ili NMO-IgG protutijela ili nekog drugog autoimunog protutijela) trebaju smatrati dio NMO spektruma te tako i liječiti. (6,7) Bolesnici s autoimunim

optičkim neuritisom zahtjevaju drukčiji postupak od pacijenata s tipičnim demijelinizacijskim optičkim neuritisom, prvenstveno jer zahtjevaju dugotrajnu imunosupresivnu terapiju za indukciju i održavanje remisije te je rana dijagnoza ovih bolesnika od presudne važnosti. Od ostalih autoimunih bolesti ON se može susresti kod bolesnika sa sistemskim lupusom eritomasusom, sarkoidozom i Behcetovom bolesti kada uz simptome optičkog neuritisa moraju biti prisutni i znakovi zahvaćanja ostalih organskih sustava. (8)

Iako je dobar oporavak vidne funkcije gotovo pravilo optičkog neuritisa vezanog uz MS, ireverzibilno aksonalno oštećenje se događa vrlo rano u tijeku bolesti. Studije koje su koristile „Ocular coherence tomography“ (OCT) su pokazale da je aksonalno oštećenje često kod bolesnika s optičkim neuritisom te su pokazale stanjenje sloja retinalnih živčanih vlakana u 74% bolesnika unutar 3 mjeseca od akutnog optičkog neuritisa. (9)

Dijagnoza demijelinizacijskog optičkog neuritisa se postavlja klinički. Neuro-oftalmološkom obradom se smanjuje mogućnost pogreške i ona je neophodna zbog procjene oporavka vida, koje je jedan od dijagnostičkih obilježja, kao što je navedeno u Tablici 1. Svakao MRI mozga ima poseban značaj zbog procjene proširenosti demijelinizacijskih oštećenja. Od oftalmoloških testova velik značaj imaju ispitivanje vidne oštrine niskog kontrasta (Sloan tablice) i kontrastna osjetljivost (Pelli-Robson test). Oba testa imaju dobru korelaciju s nalazom MRI-a i mjerenjem debljine sloja retinalnih živčanih vlakana OCT-om. (10,11) Oba testa se mogu provesti uz krevet bolesnika, te je pokazano da mogu razlikovati pacijente s MS-om od zdravih pojedinaca. (12,13) Oporavak vidne funkcije se događa spontano te počinje unutar 2-3 tjedna od nastanka simptoma, stabilizira se tijekom nekoliko mjeseci te se nastavlja popravljati do godine dana. (14)

1.1.3. Patologija multiple skelroze

Postoji vrlo mali broj patoloških studija kod bolesnika s klinički izoliranim sindromom. Većina objavljenih istraživanja je učinjena u pacijenata s neuobičajenom kliničkom prezentacijom ili u pacijenata koji su na MR-u imali lezije koje su diferencijalno dijagnostički odgovarale tumorskom procesu, tako da su podatci dobiveni vrlo ograničene vrijednosti. (15) Histopatološki pregled ovih akutnih lezija je pokazao hipercelularnost, pretežno zbog makrofaga koji sadržavaju lipide i perivaskularnih nakupina limfocita. Rubovi akutne lezije ne moraju biti prepoznatljivi zbog demijelinizacije koja je u tijeku. Kroz cijelu leziju prisutna je parenhimska i perivaskularna infiltracija, a centar lezije može biti edematozan. Tijekom aktivne demijelinizacije broj oligodendrocita je tipično smanjen, ali mogu biti prisutni u dijelovima koji se remijeliniziraju. (16) Zajedničko svim demijelinizacijskim bolestima je da se javljaju u pozadini upalne reakcije koja je sastavljena od limfocita i aktiviranih makrofaga i mikroglije te pokazuju demijelinizaciju u kojoj su aksoni barem djelomično očuvani. Vjeruje se da je upravo ovaj upalni proces (vjerojatno autoimune prirode) odgovoran za tkivnu ozljedu u MS-u. (17) Predpostavlja se da je u ranoj, relapsno-remitirajućoj fazi bolesti upala glavni pokretač oštećenja, dok je kasnija progresivna faza bolesti obilježena neurodegeneracijom, koja je barem djelomično neovisna od upalne faze. (18) Kao što je već rečeno upalne stanice koje dominiraju u MS plakovima su T stanice i aktivirani makrofazi ili mikroglia. U aktivnim lezijama ovaj proces prati i težak poremećaj krvno moždane barijere te lokalna eksoresija proinflamatornih citokina i kemokina kao i njihovih receptora. (19,20) Potpuna demijelinizacija je praćena različitim stupnjem akutne ozljede aksona te njihovim gubitkom te kasnije remijelinizacijom. (21) S druge strane patološke promjene kod bolesnika sa sekundarno-progresivnim i primarno-progresivnim oblikom bolesti su drukčije. Većina starih plakova pokazuje znakove sporog i postupnog širenja rubova što je

povezano s umjerenim upalnim infiltratom, uglavnom T-staničnim, te aktivacijom mikroglije.

(22) Uz navedeno postoje i značajne promjene u bijeloj tvari koja nije zahvaćena plakovima (normal appearing white matter NAWM). Promjene u NAWM uključuju astrogliozu, aktivaciju mikroglije, vaskularnu hijalinizaciju, poremećaj krvno-moždane barijere, smanjenu gustoću mijelina, remijelinizaciju, gubitak neurona i formaciju mikroplakova. (23,24) Jedno od važnijih otkrića u sekundarno progresivnim oblicima MS-a je otkriće limfoidnih struktura sličnih folikulima koji sadržavaju B, T i plazma stanice te mrežu folikularnih dendritičnih stanica koje stvaraju CXCL13 u meningama. (25) Isti autori su također pokazali da su proliferirajuće B stanice prisutne u navedenim intrameningealnim folikulima, nalaz koji upućuje na formiranje germinalnih centara. Ovakvo otkriće da se ektopički limfoidni folikuli mogu razviti unutar meningealnih ovojnica, dijela središnjeg živčanog sustava koji je imunološki privilegiran, pokazuje da su događaji koji se odvijaju u ciljnom tkivu važni u patogenezi autoimunih bolesti. Jedno od najvažnijih istraživanja koje je pokazalo kako je MS heterogena bolesti je učinila Claudia Lucchinetti s koautorima. (26) Navedeni autori su pokazali da postoje 4 vrste histopatološka uzorka MS lezija. Uzorak I i II dijele nekoliko zajedničkih karakteristika: dominira T-limfocitni i makrofagni upalni infiltrat, a glavna karakteristika koja ih razlikuje je prominentna depozicija imunoglobulina (pretežno IgG) i komplementa na mjestima aktivne destrukcije mijelina isključivo u uzorku II. Oba uzorka su tipično centrirana oko malih vena i venula te imaju oštre rubove. Uzorak III se također sastoji od upalnog infiltrata koji se pretežno sastoji od T limfocita i makrofaga te aktivirane mikroglije, ali za razliku od uzorka I i II, u uzorku III demijelinizacija nije bila koncentrirana oko vena i venula već je bio prisutan očuvan prsten mijelina oko upaljenih žila unutar demijelinizacijskog plaka. Rubovi lezije nisu oštri. Jedno od glavnih obilježja uzorka III je selektivan gubitak MAG-a. Također je prisutan gubitak

oligodendrocita na rubu aktivnog plaka te u centru inaktivnog plaka. Uzorak IV je također karakteriziran infiltratom koji se sastoji o T limfocita i makrofaga, a demijelinizacija je vezana uz smrt oligodendrocita. I za tip III i tip IV je karakteristična odsutnost remijelinizacije. Ovi uzorci demijelinizacijskih lezija se razlikuju među bolesnicima, homogeni su u svakog pojedinog bolesnika, ali ne utječu na kliničku prezentaciju niti tijekom bolesti. (27) Iz svega navedenog može se zaključiti da je MS heterogena bolest nepredvidiva tijekom, te da su neophodno potrebni markeri koji bi omogućili bolji postupak s bolesnicima.

1.1.4. Rizični čimbenici multiple skleroze: genetika ili okolišni čimbenici?

Uzrok MS-a je još uvijek nerazjašnjen. Smatra se da su genetski, okolišni i imunološki čimbenici uključeni u etiologiju ove kompleksne, multifaktorijalne i heterogene bolesti. Postoje vrlo uvjerljivi dokazi za okolišne rizične čimbenike. Istraživanja su pokazala da EBV igra vrlo važnu ulogu, međutim sam EBV ne može objasniti neke aspekte epidemiologije MS-a, uključujući smanjenje rizika u migranata iz područja s visokim u područja s niskim rizikom. (28) S druge strane postoje snažni dokazi o ulozi vitamina D u MS-u, a upravo vitamin D može razjasniti prije navedene nepodudarnosti. (29)

Međutim geografske varijacije u incidenciji MS-a se djelomično mogu objasniti i genetskim čimbenicima. Prva istraživanja koja su pokazala utjecaj genetskih čimbenika u MS su pokazala da je prevalencija MS-a među srodnicima bolesnika prvog koljena 20-40 puta veća od prevalencije u općoj populaciji. (30) Kako se smatra da je MS autoimuna bolest, od samog početka se smatralo da klasa II kompleksa tkivne poduarnosti (MHC) igra važnu ulogu kod bolesnika s MS-om. Specifični haplotip koji je tada otkriven je HLA-DR2 (HLA-DRB1*1501-DQB*0602), ali on može objasniti samo oko 30% genetske komponente MS-a. (31,32) Novija

istraživanja su pokazala i da varijacije u DR1 kompleksu utječu na sklonost MS-u i to na vrlo složen način te da je HLA-DRB1*15 zapravo samo dio haplotipa koji povećava sklonost MS-a. To zahtjeva ili epistatičke interakcije, ili epigenetičke modifikacije ili okolne strukturne varijacije. (33,34) Također je pokazana i povezanost s HLA-C genom. (35)

Dva su glavna pristupa otkrivanju gena kandidata koji nose povećan rizik od MS-a: pretraživanje cijelog genoma ili istraživanje specifičnih gena kandidata. Jedno od najvećih i najvažnijih istraživanja cijelog genoma je provedeno od strane Multiple Sclerosis Genetic Consortium je pokazalo da su aleli za interleukin 2 receptor (IL2RA) i interleukin 7 receptor (IL7RA) oni aleli unutar HLA lokusa koji su odgovorni za povećani rizik od MS-a. (36) Iako je do sada objavljeno preko 100 gena kandidata za MS, niti jedan od njih nije pokazao konzistentnost u ponovljenim istraživanjima, osim zadnja dva gena. (37). Novija istraživanja na velikom broju ispitanika su ove lokuse na kromosomu 12q13-14 te uzvodno od CD40 na kromosomu 20q13. (38) Također je studija na preko 2500 bolesnika i preko 7000 kontrola otkrila nove lokuse TNFRSF1A, IRF8 i CD6. (39) Posebno je zanimljiv alel IRF8 koji kodira za transkripcijski čimbenik koji sudjeluje u signalizaciji tip I za interferon te je upleten u putu odgovora na interferone.

Unatoč ovim uspjesima, postoji potreba za dizajniranjem studija koje bi identificirale najvjerojatnije biološke kandidate upletene u nastanak MS-a pomoću koncepta genske konvergencije. (40) Ova metodologija prvo identificira gene kandidate s promjenjenom genskom ekspresijom u bolesnika s MS-om ili životinjskih modela, zatim se lista suzi na gene za koje je poznato da su vezani uz automuni proces te na koncu da se navedeni geni nalaze na mjestima koja su identificirani u ranije opisanim studijama.

Na kraju, kada se 16 gena (CD58, RGS1, CXCR4, IL12A, IL7R, PTGER4, HLA B, HLA DRB1, OLIG3/TNFAIP3, IL2RA, ZMIZ1, CD6, TNFRSF1A, MPHOSPH9, CLEC16A, IRF8) koji su do sada pokazali najveći stupanj povezanosti s MS-om poveže u tako zvani zbroj genetskog rizika i kada mu se dodaju poznati okolišni čimbenici (pušenje i izloženost EBV infekciji) dobije se zbroj koji umjereno može predvidjeti rizik od MS-a te pokazuje konzistentnu diskriminativnu sposobnost u neovisnim uzorcima. (41) Međutim, takav zbroj i dalje ne može predvidjeti konverziju od klinički izoliranog sindroma u klinički definitivnu MS.

1.1.5. Imunopatogeneza multiple skleroze

Za MS se smatra da je klasična T-stanični posredovna autoimuna bolest s kompleksnom genetskom podlogom. Međutim postalo je jasno kako je patogeneza MS-a zapravo mnogo složenija. (42) Autoreaktivne T stanice koje prepoznaju mijelinske antigene su prisutne i u bolesnika s MS-om i u zdravoj populaciji. Aktivacija ovih T stanica je ključna u započinanju MS-a. Što aktivira te stanice je nepoznato. Molekularna mimikrija je jedan od mogućih mehanizama, gdje virusni proteini (primjerice EBV) mogu započeti autoimunu patogenezu pomoću mijelin reaktivnih T stanica. (43) Tako je pokazano da miševi koji razvijaju eksperimentalni alergijski encefalomijelitis (EAE) nakon injekcije jednog epitopa mijelinskog proteina MBP-a, razvijaju CD4+ T stanični odgovor na injicirani peptidni antigen, ali i na ostale epitope MBP-a. (44) Ovaj fenomen se naziva „širenje epitopa“ te se smatra da se također događa u MS-u. Smatra se da je CD4+ T stanična reaktivnost najjača za encefalitogene epitope te je ona ograničena HLA II molekulama koje su povezane s MS-om. (45) Moguće je da navedene HLA molekule pridonose ekspanziji T stanica i „antigenskom širenju“ jer se vežu za određene mijelinske epitope nakon inicijalnog mijelinskog oštećenja. S druge strane, smanjeno HLA

vezanje ili manjak ekspresije određenih mijelinskih peptida u timusu se može prevesti u negativnu selekciju i veći udio perifernih T stanica s navedenim obilježjima. (42) Osim mijelinskih peptida, nađeno je i da drugi, nemijelinski antigeni, kao npr. mali heat-shock protein alfa-B kristalin igraju važnu ulogu. (46)

Akutne lezije MS-a se aktiviraju pomoću CD4⁺ T pomoćnih stanica tipa 1 (Th1 stanica), što se podudara i s genetskim rizikom koji je većinom povezan s HLA molekulama klase II.

Istraživanja su pokazala da su T stanice ključne u nastanku mišjeg modela MS-a (EAE) te da su obilježene stvaranjem interleukina 17 (IL17). (47) IL23 koji pripada podobitelji IL12 s kojim i dijeli p40 podjedinicu je ključan u razvoju TH-17 stanica. Miševi koji su deficijenti za IL-23 ne mogu razviti EAE, dok miševi deficijentni za IL12 imaju veću mogućnost razviti EAE. (42) S druge strane uloga IL6 i TGF beta u diferencijaciji TH-17 stanica je poznata te se bolest može zaustaviti pomoću protutijela na IL6. (48) I istraživanja na ljudima su pokazala važnost IL17 u razvoju MS-a, pa su tako studije genomske analize ekspresijskog profila pokazale višak IL17 mRNA u krvi, likvoru te u moždanom tkivu u MS bolesnika. (49) Međutim kako je ranije navedeno u MS lezijama se nalaze i CD8⁺ T stanice te se stoga smatra da CD4⁺ T stanice odgovorne za započinjanje MS lezije, ali je njeno održavanje i stvarno oštećenje zapravo posredovano CD8⁺ T stanicama. Ova pretpostavka je poduprta otkrićem da se CD8⁺ stanice mogu vezati za aksone. (50) Također je pokazano da mijeloidne dendritičke stanice igraju važnu ulogu u prezentaciji antigena efektornim stanicama i T stanicama, te se smatra da pridonose antigenskom širenju u sazrijevanju TH-17 stanica. (51)

Međutim, T-stanična reaktivnost na mijelinske ili druge antigene je samo jedan od potrebnih koraka. Fokalne promjene u propusnosti krvno-moždane barijere ili fokalno povećanje u

ekspresiji molekula koje sudjeluju u staničnoj adheziji također mogu sudjelovati u patogenezi MS-a. (42)

Međutim, u nekoliko posljednjih godina, koncept MS- kao autoimune bolesti koja je posredovana mijelin rekativnim T stanicama je dovedena u pitanje, posebice nakon nekoliko ključnih otkrića vezanih uz B stanice. (52, 53, 54) Među njima je već ranije spomenuto otkriće B-staničnih folikulima sličnih struktura u menigama pacijenata s MS-om. (25, 55) Zatim da je znatna proporcija B stanica ili plazma stanica koje se nakupljaju u navedenim folikulima i u bijeloj tvari zaraženo EBV-om. (56) Te na kraju, možda i najuvjerljiviji, su rezultati kliničkog ispitivanja rituksimaba, protutijelo na CD20 koji se nalazi na B limfocitima, koje je dalo klinički dokaz o prominentnoj ulozi B stanica u patogenezi MS-a. (57)

Također postoje brojna istraživanja koja povezuju MS s defektima imune regulacije. Možda i najuvjerljiviji dokaz u prilog navedenom je klinička studija koja je pokazala da daklizumab, monoklonsko protutijelo na CD25 antigen, dovodi do smanjenja aktivnosti bolesti prema nalazima MR-a. (58)

Unatoč velikom napretku, još uvijek postoji velik broj neodgovorenih pitanja u patogenezi MS-a: pitanje inicijacije MS lezije, događaji koji doprinose oštećenju krvno-moždane barijere, važnost imunoregulatornih procesa i mehanizmi koji dovode do aksonalnih oštećenja. (42)

1.1.6. Ima li klinički izolirani sindrom važnost u progresiji multiple skleroze?

Brojna su istraživanja pokazala da prva klinička prezentacija MS-a, dakle CIS, ima vrlo važnu ulogu na tijek bolesti i prognozu.

Istraživanje provedeno u sklopu European Database for Multiple Sclerosis (EDMUS) je pokazalo da je srednji interval od početka bolesti do progresije definirane EDSS-om značajno duži kod bolesnika ženskog spola, u bolesnika kod kojih je bolest počela u mlađoj životnoj dobi, u bolesnika s relapsno-remitirajućim oblikom MS-a, u bolesnika s potpunim oporavkom nakon CIS-a te u bolesnika s dužim vremenom do drugog kliničkog događaja. Također je srednji interval bio duži u bolesnika koji su se prezentirali s optičkim neuritisom za razliku od bolesnika koji su se prezentirali mijelopatijom ili cerebralnim simptomima. (59) Slične su rezultate pokazale i studije na manjem broju bolesnika. Studija na 308 bolesnika je pokazala da CIS u vidu optičkog neuritisa u usporedbi s CIS-om u vidu mijelopatije ili simptoma moždanog debla ili CIS koji je posljedica oštećenja aferentnih puteva ima značajno niži rizik od razvoja klinički definitivnog MS-a kao i razvoja sekundarno progresivnog oblika bolesti. (60) Pacijenti koji su imali potpuni oporavak neurološkog deficita nakon CIS-a su također imali niži rizik od razvoja sekundarno progresivnog oblika bolesti. (60) Međutim nakon dovoljno dugačkog praćenja (20 godina) klinički definitivna MS se razvije u podjednakom broju bolesnika sa CIS-om bez obzira na kliničku prezentaciju (65% bolesnika s optičkim neuritisom, 60% bolesnika s CIS-om koji se prezentirao simptomima moždanog debla i 61% bolesnika s mijelopatijom). (61) Ova nepodudarnost u rezultatima se može objasniti činjenicom da bolesnici s optičkim neuritisom, kao grupa, imaju veću vjerojatnost da im MR mozga bude uredan od pacijenta s CIS-om drugih prezentacija, te je tima i vjerojatnost razvoja klinički definitivne MS kao i progresije invaliditeta manja. (62)

Već su ranija istraživanja pokazala da MRI igra važnu ulogu u predviđanju razvoja MS-a nakon optičkog neuritisa. Tako je jedno od prvih istraživanja na ovu temu pokazalo da je prisutnost demijelinizacijskih lezija na MRI-u značajno vezano uz kasniju progresiju u klinički definitivnu

MS. (63) Kasnije je najveće istraživanje bolesnika s optičkim neuritisom Optic Neuritis Treatment Trial (ONTT) pokazalo agregatnu kumulativnu vjerojatnost za razvoj MS-a unutar 15 godina od 50% (95% CI, 44%-56%).(64) Ta vjerojatnost iznosi 25% (95% CI, 18%-32%) za bolesnike koji nemaju demijelinizacijskih plakova na MR mozga i 72% (95% CI, 63%-81%) za bolesnike s jednim ili više demijelinizacijskih plakova u MR-u mozga. Rizik od razvoja MS-e je najviši u prvih pet godina te se nakon toga smanjuje. Međutim, rizik i dalje perzistira tijekom svih 15 godina praćenja u bolesnika koji su imali oštećenja na inicijalnom MR-u mozga.

MR igra važnu ulogu i u ostalim oblicima CIS-a. Klinički definitivni MS se razvije u 19% bolesnika s normalnim prvim MR-om, a u 88% s patološkim prvim MR-om; štoviše klinički ishod bolesnika ovisi o broju i volumenu lezija u prvom MR-u. (65) Međutim 10-ogodišnje praćenje bolesnika iz ONTT istraživanja je pokazalo da većina bolesnika s optičkim neuritisom koji razviju MS ima benigni tijek bolesti u navedenom razdoblju neovisno o nalazu inicijalnog MR-a. (66) S druge strane, neovisno o kliničkoj prezentaciji, nakon 20 godina praćenja bolesnika s CIS-om, nalazi MR-a imaju prediktivnu vrijednost u predviđanju razvoja klinički definitivne multiple skleroze, a volumen lezija te njihova promjena tijekom vremena su u korelaciji s invaliditetom nakon 20 godina. (61) Slično ovim rezultatima nedavno objavljeno istraživanje isključivo na bolesnicima s optičkim neuritisom je pokazalo da lezije u kralježničkoj moždini, infratentorijske lezije, te lezije koje se imbibiraju kontrastom unutar tri mjeseca od nastanka optičkog neuritisa te nove T2 lezije nakon 3 mjeseca imaju prediktivnu vrijednost za invalidnost nakon 6 godina. (67)

Drugi, vrlo važan paraklinički kriterij za dijagnozu MS-a je cerebrospinalna tekućina (CSF), s povišenim IgG indeksom i pozitivnim oligoklonskim vrpčama (OCB). Inicijalna istraživanja su pokazala da je rizik od MS-a povišen u bolesnika s optičkim neuritisom koji imaju intratekalnu

sintezu IgG-a neovisno o nalazu MR-a, međutim navedeni trend nije dostigao statističku značajnost vjerojatno zbog relativno malog broja pacijenata. (68) Kasnije studije su međutim pokazale da nalaz CSF-a s mononuklearnom pleocitozom i/ili OCB-om značajno povećava rizik za razvoj MS-a, 49% (CI 38%–65%) u usporedbi s 23 % (CI 12%–44%) za pacijente s normalnim CSF-om, $p=0.02$. (69) Također, CSF MRZ (Morbili, Rubela, Zoster) reakcija u bolesnika s ON ima dijagnostičku osjetljivost od 61%, i dijagnostičku specifičnost od 72% u predviđanju razvoja MS-a. (70).

1.1.7. Uloga MR-a u dijagnozi klinički izoliranog sindroma i multiple skleroze

MR je možda i najvažniji paraklinički kriterij za postavljanje dijagnoze MS-a. Ova metoda nam omogućuje definiranje kriterija diseminacije u prostoru već u prvoj prezentaciji MS-a, dakle CIS-a, te ubrzava postavljanje dijagnoze klinički definitivnog MS-a kada bolesnik nema drugog kliničkog događaja, dakle diseminacije u vremenu. Ovdje je neizostavno spomenuti Brakhoffove kriterije te njihovu modifikaciju iz 2000. godine koji nam govore da je kriterij diseminacije u prostoru zadovoljen onda ako bolesnik ima zadovoljena 3 od slijedeća 4 kriterija (Tablica 2): Najmanje jednu aktivnu leziju (leziju u T1 vremenu koja se imbibira kontrastom) ili 9 lezija hiperintenzivnih u T2 vremenu od kojih jedna mora biti infratentorijska, jedna jukstakortikalna te 3 paraventrikularne lezije. (71, 72) Novost u modifikaciji kriterija je da se lezija u kralježničkoj moždini može smatrati ekvivalentom infratentorijskoj leziji, a lezija koja se imbibira kontrastom se može smatrati ekvivalentom leziji koja se imbibira u mozgu, te svaka lezija u kralježničkoj moždini može doprinijeti zbroju lezija u mozgu kako bi se dosegao potreban zbroj T2 lezija. (72)

Moraju biti zadovoljena 3 od slijedeća 4 kriterija:
1. Najmanje jedna lezija koja se imbibira kontrastom ili devet T2 hiperintenzivnih lezije ako nema aktivnih lezija
2. Najmanje jedna infratentorijska lezija
3. Najmanje jedna jukstakortikalna lezija
4. Najmanje tri periventrikularne lezije
Napomena: Lezija u kralježničkoj moždini se može smatrati ekvivalentom infratentorijskoj leziji: lezija koja se imbibira kontrastom se smatra ekvivalentom leziji koja se imbibira u mozgu, svaka lezija u kralježničkoj moždini može doprinijeti zbroju lezija u mozgu kako bi se dosegao potreban zbroj T2 lezija.

Tablica 2. MRI kriteriji za diseminaciju u prostoru

Glavna zamjerka ovim kriterijima je bila što su razvijeni na relativno malom broju bolesnika. Kasnije provedene multicentrične studije na velikom broju bolesnika su pokazale da bolesnici koji zadovoljavaju Barkhof/Tintore kriterije imaju stopu konverzije od oko 45% u usporebi s 10% kod bolesnika koji nemaju lezija. (73) Prema ovom istraživanju točnost navedenih kriterija je 68% (osjetljivost 49%, specifičnost 79%) u predviđanju konverzije u MS. Ova studija je potvrdila prognostičku vrijednost MR-a: bolesnici s negativnim MR-om imaju najbolju prognozu, bolesnici koji imaju pozitivan MR, ali ne zadovoljavaju Barkhof/Tintore kriterije imaju srednju prognozu, dok bolesnici koji zadovoljavaju Barkhof/Tintore kriterije imaju najlošiju prognozu. Također, ovi kriteriji imaju prihvatljivu specifičnost, no nešto nižu osjetljivost no što se prije mislilo. Ograničenje svih ovih ispitivanja je što nisu uključivali nalaz

likvora i nalaz magnetske rezonance kralježničke moždine. Manja studija koja je uključila nalaze MRI-a kralježničke moždine je pokazala da dodatak ove pretrage povećava vjerojatnost postavljanja kriterija diseminacije u prostoru, ali nema utjecaja na diseminaciju u vremenu. (74) Pokušaj da se poveća osjetljivost Brakhof/Tintore kriterija na inicijalnom MR-u nije uspjela bez uvođenja kontrolnog MR-a s kontrastom. (75)

Godine 2006. jednocentrična studija na bolesnicima s klinički izoliranim sindromom je predložila nove MR kriterije za MS. (76). Prema navedenim kriterijima diseminacija u prostoru je postignuta s najmanje jednom T2 lezijom na najmanje dvije od 4 lokalizacije (juktakortikalno, periventrikularno, infratentorijsko, spinalno). Diseminacija u vremenu zahtjeva drugi MR neovisno o vremenu inicijalnog MRI-a. U usporedbi s McDonaldovim kriterijima iz 2001. godine, ovi kriteriji su slične visoke specifičnosti, ali bolje osjetljivosti. Kada se usporede do sada korišteni kriteriji specifičnost svih je visoka (2001 McDonald, 91%; 2005 McDonald, 88%; Swanton, 87%), dok je osjetljivost Swanton i 2005 McDonald kriterija viša od 2001 kriterija (2001 McDonald, 47%; 2005 McDonald, 60%; Swanton, 72%). (77). Međutim samo Swanton kriteriji imaju neovisan učinak na rizik od konverzije u klinički definitivnu MS. Međutim MR se uvijek treba promatrati u kontekstu kliničke slike. Možda najbolji primjer za navedeno su rezultati studije koja je pokazala da je u bolesnika koji se prezentiraju s monofokalnim klinički izoliranim sindromom rizik od konverzije u klinički definitivnu MS značajno viši u bolesnika koji imaju više od 9 T2 lezija ili najmanje jednu leziju koja se imbibira kontrastom, dok se navedeni učinak ne vidi u bolesnika s multifokalnim klinički izoliranim sindromom. (78) Ovi podaci pokazuju da je nalaz MR samo uz pažljivu anamnezu i klinički pregled važan u definiranju rizika od konverzije u klinički definitivnu MS. Najnovija istraživanja pokazuju da je samo jedan MR koji pokazuje diseminaciju u prostoru (prema ranije

opisanim kriterijima) i pokazuje i leziju koja se imbibira kontrastom i T2 lezije koje se ne imbibiraju kontrastom što sugerira diseminaciju u vremenu, dovoljan za predviđanje ranog razvoja klinički definitivnog MS-a ako se MR učini unutar prva tri mjeseca od početka simptoma. (79)

Širokom uporabom MR-a primjećeno je da neki pacijenti koji nemaju kliničke simptome karakteristične za MS imaju promjene na mahnetu koje su vrlo tipične za MS na temelju njihove lokalizacije i morfologije (periventrikularni smještaj, zahvaćenost korpus kalozuma, ovoidne, dobro ograničene lezije). Kao što je već ranije naglašeno bolesnici s klinički izoliranim sindromom imaju rizik od razvoja MS-a djelomično ovisan o nalazu MRI-a, pa se postavlja pitanje koliki je rizik bolesnika koji se prezentiraju sa slučajnim nalazom tipičnih demijelinizacijskih lezija na MR-u, tzv. radiološki izoliranim sindromom (RIS). Na seriji od 44 bolesnika s RIS-om nađeno je da u njih 59% dolazi do radiološke progresije, a u 23% do razvoja klinički izoliranog sindroma ili klinički definitivnog MS-a. (80) Prisutnost lezija koje se imbibiraju kontrastom na inicijalnom MRI-u je prediktor diseminacije u vremenu.

Iako je MRI vrlo važan u predviđanju razvoja MS-a nakon klinički izoliranog sindroma, još uvijek postoji potreba za markerima koji bi s većom specifičnošću i osjetljivošću mogli predvidjeti razvoj klinički definitivnog MS-a nakon klinički izoliranog sindroma.

1.1.8. Dijagnostički kriteriji za multiplu sklerozu

Sve do 1983. godine nisu postojali dijagnostički kriteriji za MS. Iste godine doneseni su prvi dijagnostički kriteriji za MS, koji se nazivaju Poserovim kriterijima prema inicijatoru i vođi tadašnjeg ekspertnog tipa C.M. Poseru. (81) Prema navedenim kriterijima klinički definitian MS

se može postaviti u bolesnika koji ima dva relapsa te klinički dokaz o dvije odvojene lezije ili u bolesnika s dva relapsa, klinički dokaz jedne lezije i paraklinički dokaz druge odvojene lezije. Dva relapsa moraju zahvatiti dva različita dijela CNS-a, moraju se javiti u razmaku najmanje od 30 dana te moraju trajati najmanje 24 sata. U parakliničke dokaze spadaju evocirani potencijali, CT ili MR. Drugi pojam koji se spominje u ovim kriterijima je laboratorijski utvrđen definitivni MS. Pod pojmom laboratorijski utvrđen smatra se nalaz likvora koji pokazuje oligoklonske vrpce ili povišen IgG indeks. Dakle laboratorijski utvrđen definitivni MS ima onaj bolesnik koji ima dva relapsa, te ili klinički ili paraklinički dokaz jedne lezije i pozitivne oligoklonske vrpce ili pozitivan IgG indeks. Također oni bolesnici koji imaju jedan relaps, klinički dokaz o dvije odvojene lezije i pozitivne oligoklonske vrpce ili IgG indeks te bolesnici koji imaju jedan relaps, klinički dokaz jedne lezije i paraklinički dokaz druge odvojene lezije i pozitivne oligoklonske vrpce ili IgG indeks. Treći pojam koji se uvodi ovim kriterijima je klinički vjerojatan MS. Tu spadaju bolesnici koji imaju dva relapsa i klinički dokaz o jednoj leziji, jedan relaps i klinički dokaz o dvije odvojene lezije, jedan relaps, klinički dokaz o jednoj leziji i paraklinički dokaz o drugoj, odvojenoj leziji. Četvrti pojam je laboratorijski utemeljen vjerovatan MS u koji spadaju bolesnici s dva relapsa i pozitivnim oligoklonskim vrpcama i li IgG indeksom. Ovi kriteriji su vrijedili slijedećih 20 godina te su uvelike pomogli u boljem razumjevanju patofiziologije kao i liječenja MS-a. Prve randomizirane studije koje su dovele do registracije interferona kao lijeka prvog izbora u liječenju relapsno remitirajućeg oblika MS-a su temeljene na bolesnicima koji zadovoljavaju Poserove kriterije.

Uvođenjem i sve većom dostupnošću MR-a pokazala se potreba novih dijagnostičkih kriterija koji su objavljeni 2001. godine. (82). Dvije glavne novosti u ovim kriterijima je uključivanje MRI-a te postavljanje dijagnostičkih kriterija za primarno rprogresivan oblik MS-a. Također u

parakliničke kriterije se sada ubrajaju nalaz MR-a, pozitivne oligoklonske vrpce u likvoru te produžene latencije vala P100 u vidnim evociranim potencijalima. Što se tiče nalaza MRI-a više je rečeno u prethodnom poglavlju jer su u McDonaldove kriterije uključeni Barkhof/Tintore MR kriteriji. McDonaldovi kriteriji su prikazani u tablici 3.

Klinička prezentacija	Dodatni kriteriji potrebni za postavljanje dijagnoze
Dva ili više relapsa, objektivni klinički dokaz 2 ili više lezija	Ne
Dva ili više relapsa, objektivni klinički znak 1 lezije	Diseminacija u vremenu pokazana MRI-om <i>ili</i> Dvije ili više lezija na MRI-u plus pozitivan likvor <i>ili</i> Čekati slijedeći relaps koji zahvaća drugu lokalizaciju
Jedan relaps; objektivni klinički znak 2 ili više lezija	Diseminacija u vremenu pokazana MRI-om

	<i>ili</i> Drugi klinički događaj
Jedan relaps, objektivan klinički znak 1 lezije (monosimptomatska prezentacija; klinički izolirani sindrom)	Diseminacija u vremenu pokazana MRI-om <i>ili</i> Dvije ili više lezija na MRI-u plus pozitivan likvor <i>i</i> Diseminacija u vremenu, pokazana MRI-om <i>ili</i> Drugi klinički događaj

Tablica 3. McDonaldovi kriteriji iz 2001. i 2005. godine za relapsno remitirajući oblik MS-a

Navedeni kriteriji su se vrlo brzo proširili te su postali prihvaćeni od većine neurologa koji se bave MS-om. Pet godina kasnije objavljeni su revidirani McDonaldovi kriteriji. (83) Većina novosti se ponovno odnosi na nalaz MR-a o čemu je već ranije diskutirano, ali je ponovno potrebno naglasiti važnost MR-a kralježničke moždine u dijagnozi MS-a. Diseminacija u vremenu pomoću MR-a se može postići na dva načina. Prvi način je ako se pokaže nova lezija u T1 vremenu koja se imbibira kontrastom najmanje 3 mjeseca nakon početka simptoma, ali da se

ne nalazi na mjestu inicijalnog događaja. Drugi način je ako se pokaže nova T2 lezija u bilo kojem MR-u koji se učini nakon inicijalnog MR-a koji mora biti učinjen najmanje 30 dana nakon nastupa inicijalnog kliničkog događaja.

1.2. Biomarkeri

1.2.1. Definicije

Biomarkeri su vrlo važni indikatori normalnih i abnormalnih bioloških procesa. Po definiciji, biološki markeri ili biomarkeri su obilježja koja se objektivno mogu izmjeriti, a služe kao pokazatelj normalnog biološkog procesa, patološkog procesa ili farmakološkog odgovora na terapijsku intervenciju. (84) Biomarkeri imaju mnoge korisne primjene, primjerice u otkrivanju i praćenju bolesti te procjeni rane učinkovitosti liječenja. Oni su od neprocijenjive koristi u otkrivanju, određivanju stupnja ili klasifikaciji proširenosti, prognozi bolesti te procjeni i praćenju kliničkog odgovora na liječenje.

MS je bolest heterogena u stopi progresije, kliničkim simptomima, specifičnosti imunološkog odgovora te patologiji lezija, što je posljedica različitih čimbenika na patološki autoimuni odgovor. (85) U tako kompleksnoj bolesti s različitim patogenetskim mehanizmima, pojedini biomarker će najvjerojatnije biti posljedica samo jednog od mnogih patogenih mehanizama. Stoga će stratifikacija pacijenata biti moguća samo korištenjem definirane skupine biomarkera kako bi se odredio relativan doprinos svakog od različitih patogenetskih mehanizama. (86) Svaki od mogućih biomarkera bi se trebao validirati u različitim skupinama bolesnika u prospektivnim, multicentričnim studijama. Validacijski kriteriji za biomarker se definiraju prema svrsi za koju je

pojedini biomarker namijenjen te se treba standardizirati u različitim populacijama sa slijedećim ciljevima:

- 1) Klinička važnost: biomarker ima sposobnost da prati promjene patološkog procesa i/ili terapijske intervencije u relativno kratkom vremenskom periodu.
- 2) Osjetljivost: mogućnost da se biomarker izmjeri sa zadovoljavajućom preciznošću i da promjena biomarkera odražava promjenu određenog kliničkog cilja.
- 3) Specifičnost: sposobnost biomarkera da identificira osobe koje boluju od određene bolesti ili odgovor na određenu intervenciju
- 4) Vjerojatnost lažno pozitivnih i lažno negativnih slučajeva: koja se definira situacijom u kojoj promjena biomarkera ne odražava promjenu određenog kliničkog cilja.
- 5) Točnost, preciznost, reproducibilnost i varijabilnost laboratorijskog testa kojim se biomarker mjeri. (86)

Potrebno je naglasiti da trenutno ne postoji niti jedan biomarker za MS koji zadovoljava sve navedene kriterije. (87)

1.2.2. Biomarkeri multiple skleroze

Jedna od najčešćih metoda koja se koristi u praćenju aktivnosti bolesti i progresije kod bolesnika s MS-om je MR. Međutim, iako ova metoda ima brojne prednosti, kako je već i ranije rečeno, poznato je da broj i volumen lezija vrlo slabo korelira sa stupnjem invalidnosti, tzv. kliničko-radiološki paradoks, te se MRI ne može smatrati dobrom zamjenom za klinički ishod. (88)

Jedini biomarker koji se koristi u postavljanju dijagnoze MS-a je kvalitativno i kvantitativno određivanje imunoglobulina IgG u likvoru. Prisutnost oligoklonskih IgG vrpca u likvoru, a odsutnost u serumu se pokazala vrlo osjetljiv, ali nedovoljno specifičan biomarker za MS. Do danas nije otkrivena povezanost oligoklonskih vrpca s niti jednim specifičnim antigenom te se smatra da je intratekalna sinteza usmjerena protiv različitih protutijela. Međutim nedavno objavljeno istraživanje u kojem je korištena proteinska analiza ekspresije s više od 37000 obilježenih proteina, je identificirala dva epitopa EBV virusa kao važna antigena za formiranje oligoklonskih vrpca. (89)

Dugo se smatralo da je prisustvo anti-mijelinskih (anti-MOG i anti-MBP) protutijela važan biološki marker u prognozi i progresiji MS-a. No do sada objavljena istraživanja su dala kontradiktorne rezultate tako da je upotreba ovih protutijela kao biomarkera i dalje upitna.

Kompletno sekvencioniranje ljudskog genoma je omogućilo brzi razvoj systemske biologije koja se naziva i „omika“. Ovaj pojam označava sveobuhvatnu analizu bioloških sistema te je do sada razvijeno nekoliko „omika“ poddisciplina: genomika, proteomika, metabolomika. Ovim postupcima mogu se definirati velike skupine biomarkera u određenim biološkim uzorcima te one omogućuju analitički pristup pomoću kojega se analiziraju svi produkti genoma na razini mRNA ili proteina odjednom. (90) Ove se metode uglavnom koriste u istraživačkim laboratorijima te omogućuju otkrivanje multiplih biomarkera koji su promijenjeni vrlo rano u tijeku bolesti te se mijenjaju s njenom progresijom ili kao odgovor na djelovanje lijeka. Važnost ovih metoda je njihova mogućnost razvoja biomarkera za bolesti koje imaju asimptomatsku fazu, kao što je na primjer MS. (91)

1.2.3. Genomika

Nedavni razvoj genomike je omogućio po prvi puta da se premoste brojni od gore navedenih problema u razvoju biomarkera za MS. Genomska analiza ekspresijskog profila zapravo predstavlja profil ili otisak svih gena u određenom tkivu ili staničnoj populaciji u određenom vremenu. Kako je humani genom u potpunosti poznat, omogućena je potpuna analiza svakog ljudskog gena u bilo kojem kontekstu te je time omogućeno razumijevanje kompleksnih molekularnih interakcija te otkrivanje biomarkera koji koreliraju s kliničkim znakovima kao i otkrivanje novih terapijskih mogućnosti. (92) Genomska analiza se provodi pomoću mikročipova koji se sastoje od oligonukleotida poznatog sastava koji su pričvršćeni na podlogu po određenom redu, vrlo velike gustoće. DNA mikročipovi se mogu podijeliti u dvije skupine na temelju vrste DNA. Oligo čipovi se sastoje od sintetiziranih oligonukleotida, dok se cDNA čipovi sastoje od klonirane ili PCR-om amplificirane komplementarne DNA molekule. (93, 94) Glavna zamjerka ovoj metodi je što nije vezana uz hipotezu već je okrenuta otkriću. U ovom tipu istraživanja, istraživač prepoznaje poteškoće koje se javljaju pri pokušaju analize kompleksnih interakcija pomoću relativno jednostavnijih studija, pa koristi ekspresijske studije mnogih gena kako bi dobio odgovor na eksperimentalno pitanje. Zbog genske kompleksnosti i heterogenosti MS, smatra se da genomska analiza ekspresijskog profila daje jasnu prednost te da će dovesti do stvaranja novih hipoteza na koje se ne bi moglo pomisliti na temelju dosadašnjeg znanja te koje su prekompleksne da bi se mogle istraživati konvencionalnim istraživanjima. (92)

Glavni potencijali genomske analize ekspresijskog profila u MS-u su:

1. Identificirati transkripcijske razlike između MS bolesnika i normalnih kontrola te između različitih kliničkih oblika bolesti
2. Identificirati promjene u stanicama koje predviđaju klinički odgovor na liječenje

3. Identificirati nove biomarkere koji bi se mogli koristiti u dijagnozi, prognozi i liječenju MS-a
4. Identificirati gene kandidate za genetske studije
5. Identificirati ekspresijske profile gena ili stanične puteve koji su povezani s različitim fenotipovima bolesti koji se temelje na nalazu MRI-a ili histopatoloških nalaza (92)

Potrebno je naglasiti da ova metoda ima i neka ograničenja. Neki od glavnih uzroka varijabilnosti u rezultatima studija koje su koristile genske čipove u MS-u su:

1. Intraindividualne i interindividualne varijacije (95)
2. Korištenje mikročipova od različitih proizvođača
3. Različitosti u metodama koje se koriste u procesiranju mikročipova: amplifikacija cDNA, obilježavanje proba, uvjeti hibridizacije.
4. Korištenje različitih kriterija i statističkih metoda za analiziranje podataka (92)

Specifičnosti koje mogu utjecati na rezultate vezane uz gensomske analize ekspresijskog profila pune krvi su:

1. Korištenje različitih tehnika sakupljanja uzoraka (npr. cijela krvi ili samo mononuklearne stanice periferne krvi)
2. Postupanje sa stanicama ex vivo prije njihove separacije ili ekstrakcije RNA: pokazano je da je ekspresija mnogih gena osjetljiva na ex vivo uvjete (96)
3. Promjene u staničnom udjelu pojedinih stanica krvi, odnosno promjene u postotku mononuklearnih stanica u perifernoj krvi

4. Varijacije vezane uz stadij bolesti: grupiranje bolesnika s različitim formama bolesti ili uključivanje bolesnika s različitom aktivnošću bolesti (npr. pacijenata s aktivnom bolesti nasuprot pacijenata u kliničkoj remisiji)
5. Pojava relapsa, infekcije ili primjena nekog lijeka neposredni prije sakupljanja uzorka (92)

Nedavno su objavljene smjernice koje bi trebale poboljšati pouzdanost rezultata dobivenih mikročipovima (92):

1. Rezultati dobiveni genskim mikročipovima se trebaju provjeriti alternativnim metodama (npr. RT-PCR-om). Potrebno je naglasiti da nedostatak podataka dobivenih konfirmatornim metodama ne umanjuje vrijednost podataka dobivenih mikročipovima, ako su podatci dobiveni kvalitetno provedenim eksperimentom.
2. Zbog heterogenosti bolesti rezultati bi se trebali replicirati u nezavisnoj skupini bolesnika. Kao alternativa mogu poslužiti biostatističke metode.
3. Potrebno je standardizirati vrijeme dana kada su uzorci izvađeni te vremenski prozor između sakupljanja uzorka i njegova procesiranja.
4. Analizirati distribuciju glavnih mononuklearnih populacija u ukupnom broju leukocita.
5. Osigurati da relaps, infekcije ili uzimanje lijekova ne utječe na rezultate.
6. Osigurati standardiziranu metodu sakupljanja uzorka.
7. Uključiti u analizu i one gene koji u blizini „cut-off“ vrijednosti.

8. Pomoću ove metode se dobiva velika količina podataka, te je potrebno stvoriti repozitorije dobivenih podataka tako da i ostali istraživači imaju pristup dobivenim rezultatima. Ovakvi repozitoriji bi trebali biti u skladu s MIAME (Minimum Information About a Microarray Experiment) smjericama. (97)
9. Donijeti zajednički standard za objavljivanje podataka dobivenim mikročipovima.

1.2.3.1. Što je do sada otkriveno genomskom analizom ekspresijskog profila moždanog tkiva u MS-u?

Prva studija koja je koristila genske mikročipove na moždanom tkivu bolesnika s MS-om je objavljena 1999. godine. (98) U tom istraživanju monitorirao se ekspresijski uzorak više od 5000 gena te se uspoređivala njihova razlika između normalnog tkiva i akutnog MS plaka. Nađena je razlika u ekspresiji 62 gena među kojima su Duffy kemokinski receptor, interferon regulatorni faktor-2 i receptor2 za TNFalfa. Nakon ove studije provedeno je više istraživanja s ciljem ili otkrivanja biomakera (99, 100) ili molekularnih mehanizama patofiziologije MS-a ili otkrivanja mogućih terapijskih ciljeva. (95, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108)

Većina ovih studija je ograničeno na postmortem analizu jer se biopsije mozga u bolesnika s MS-om vrlo rijetko izvode. RNA propada relativno brzo nakon smrti, tako da je potrebno vrlo brzo procesirati moždano tkivo kako bi se dobila RNA dovoljne kvalitete za mikročipove. Unatoč tome RNA se može izolirati iz postmortem uzoraka i do 20 sati nakon smrti, iako kratko vrijeme ne garantira kvalitetu RNA. (109) Unatoč svim manama postmortem tkivo je vađan izvor za istraživanje genske ekspresije mikročipovima, posebice u istraživanju patogenetskih mehanizama te otkrivanja mogućih terapijskih ciljeva. (109) Vrlo je važno pažljivo

okarakterizirati tkivo koje će koristiti za izolaciju RNA, imunohistokemijska karakterizacija tkiva pomoću markera za demijelinizaciju, infiltraciju i gliozu je neophodna za kvalitetni interpretaciju podataka. Ove zahtjeve je gotovo nemoguće upotpunosti ispuniti, ali ih je potrebno uzeti u obzir prilikom interpretacije podataka.

Kako bi identificirali gene koji dopridonose patologiji MS lezija, Whitney i suradnici su uspoređivali gensku ekspresiju u MS lezijama i mozgovima miševa s EAE s onom u normalnoj bijeloj tvari. (95) U ovom istraživanju korišteni su genski mikročipovi s 2798 ljudskih gena. Jedno od važnijih otkrića u ovom istraživanju je da je 5-lipokisgenaza (5-LO), ključni enzim u biosintezi proinflammatoryh leukotriena, povišeno eksprimirana u MS lezijama i mozgovima EAE miševa. Iako ovaj nalaz nije specifičan za MS, on podupire važnost proinflammatory aktivnosti u demijelinizacijskom procesu te sugerira moguću ulogu protuinflammatory terapije u MS-u.

Tajouri i suradnici su uspoređivali ekspresiju RNA između kroničnih aktivnih i akutnih MS lezija međusobno te u usporedbi s normalnom bijelom tvari. (101) Autori su identificirali 139 gena koji su različito regulirani u MS plaku u usporedbi s normalnim tkivom. Od navedenog broja, 69 gena je pokazalo zajednički predznak ekspresije i u kroničnim aktivnim i u akutnim lezijama, dok je njih 70 bilo različito eksprimirano između akutnih i kroničnih aktivnih lezija. Od navedenih gena ističu se već poznati geni koji su upleteni u MS kao što su mijelin bazični protein, glutation-S-transferaza M1 te različiti faktori rasta. Kako su i kronični i akutni plak imali većinu gena slično eksprimiranih, zaključeno je da kvantitativne, više nego kvalitativne, razlike u genskoj ekspresiji definiraju progresiju akutnog u kronični aktivni plak. Daljnja istraživanja su potvrdila razliku u genskoj ekspresiji između kroničnih aktivnih i inaktivnih lezija, i u njihovim rubovima i u centralnim dijelovima. (102) Od promijenjenih gena ističu se geni upleteni u upalni

odgovor, apoptozu, te geni indukcije stresa. Glavne razlike su nađene u genskoj ekspresiji između ruba i centra aktivnih lezija (57 i 69 gena), dok je puno manja razlika nađena između ruba i centra inaktivnih lezija (samo 11 i 2 gena koji su različito eksprimirani). (103)

Analiza genske ekspresije mikročipovima na MS lezijama dobivenim autopsijom je također pokazala različitu razinu ekspresije gena koji kodiraju upalne citokine, osobito interleukin 6 i 17, interferon gama te ostale nizvodne puteve. Usporedba akutnih (karakteriziranih upalom) s „tihim“ lezijama (koje nisu karakterizirane upalom) je također našla različito eksprimirane gene. (104) Neki od ovih gena su odabrani kao meta za terapiju u mišjem modelu MS-a, EAE te su ovi rezultati potvrdili važnost ovakvih istraživanja u MS-u.

Istraživanja na biopsijskim uzorcima bolesnika sa sekundarno progresivnim oblikom MS-a su pokazala da je proces između bijele tvari koja se čini normalna (NAWM) i MS lezija zapravo kontinuum te ovi rezultati podupiru koncept MS patogeneze kao generaliziranog procesa koji zahvaća cijeli SŽS. (105) Kada se uspoređivala genska ekspresija NAWM u postmortem mozgovima MS-a nađena je povišena ekspresija gena vezanih uz održavanje stanične homeostaze i zaštitnim neuralnim mehanizmima za koje se zna da su inducirani nakon ishemijskog prekondicioniranja. (106) Kada se uspoređivala ekspresijska razina 33000 gena u postmortem dobivenoj motoričkoj kori bolesnika s MS-om i kontralama, nađeno je ukupno 488 gena sa smanjenom ekspresijom i 67 gena s povećanom ekspresijom u motoričkom korteksu bolesnika s MS-om. Od važnijih gena nađena je smanjena ekspresija 26 nuklearno kodiranih mitohondrijskih gena te gena mitohondrijskog respiratornog lanca kompleks I i III, što je bilo specifično za neurone. Također je pronađena smanjena ekspresija gena vezanih uz GABA neurotransmisiju. (107) Ovi rezultati upućuju da smanjeno stvaranje ATP-a u demijeliniziranim segmentima gornjeg motoričkog puta doprinosi invaliditetu MS bolesnika.

Jedna od prednosti genomike je da se mogu analizirati samo geni vezani uz određeno usko specifično područje. Tako je studija koja je istraživala različitu ekspresiju gena vezanih uz funkciju krvno moždane barijere kod MS bolesnika pokazala 52 gena s različitom ekspresijom u lezijama u usporedbi s NAWM i kontrolama. (108)

Zaključno se može reći kako je analiza RNA ekspresije pomoću genskih mikročipova u tkivu mozga MS bolesnika dala važna otkrića vezana uz patogenezu MS-a. Identifikacija endogenih protektivnih mehanizama u mozgu MS bolesnika može dovesti do otkrića novih lijekova koji bi mogli usporiti progredivan gubitak neurološke funkcije koji je neizbježan u MS-u. (109) Buduće studije s većim brojem dobro definiranih bolesnika dat će bolji uvid u molekularnu osnovu heterogenosti koja se vidi kod MS-a.

1.2.3.2. Što je do sada otkriveno genomskom analizom ekspresijskog profila krvi u MS-u?

Jedan od glavnih problema koji se treba razmotriti u studijama koje koriste genomsku analizu ekspresijskog profila krvi su velike interindividualne i vremenske varijacije u genskoj ekspresiji u zdravih pojedinaca. (110, 111) Ove varijacije ovise o staničnoj kompoziciji krvi, ali i spolu, dobi i vremenu uzimanja uzorka. Ove djelomično intrinzičke sistemske varijacije mogu bi uzrokovane razlikama u genotipu, epigenetskim fenomenima ili okolišnim i prehrambenim čimbenicima. Zbog toga je potrebno kontrolirati što je više moguće varijabli pri procesiranju uzoraka za genomsku analizu.

Genomska analiza ekspresijskog profila krvi ima više prednosti: uzorak za analizu je lako dostupan tako da je moguće uliniti analizu na većem broju bolesnika nego u genomskoj analizi moždanog tkiva. Rezultati dobiveni ovom metodom mogu dati ranije informacije o učinku

lijekova, jer je to jedan od prvih organa s kojim je lijek u doticaju. Međutim treba naglasiti da krv ima i velike nedostatke, prvenstveno što reflektira utjecaj raznih faktora koji nisu vezani uz bolest. (112)

Dvije su mogućnosti izolacije RNA. Jedna je iz uzoraka mononuklearnih stanica periferne krvi koje se odvoje pomoću Ficoll gradijenta, a druga iz uzoraka pune krvi (Paxgene epruvete). Oba postupka imaju svoje metodološke nedostatke.

Genomska analiza ekspresijskog profila krvi se do sada koristila u MS-u u više svrha: dijagnostičkoj (razlikovanje MS bolesnika od zdravih kontrola; razlikovanje različitih podskupina MS-a; razlikovanje liječenih od ne liječenih bolesnika), prognostičkoj (razlikovanje bolesnika u relapsu i remisiji) te terapijskoj (razlikovanje bolesnika koji reagiraju na terapiju nasuprot onih koji ne reagiraju na liječenje). Jedna od prvih studija koja je koristila ovu metodu u krvi na 4000 testiranih gena pokazala je da u 34 gena postoji značajna razlika između bolesnika sa relapsno remitirajućim oblikom MS-a i zdravih kontrola. Od važnijih gena koji su bili značajno više eksprimirani izdvajaju se P protein, LCK, IL-7 receptor, matriks metaloproteinaza-19, M130 antigen i peptidil-prolil izomeraza. Od značajno sniženo eksprimiranih gena izdvajaju se SAS transmembranski 4 superobitelj protein, STRL22, AFX protein, faktor-45 DNA fragmentacije i imunoglobulin gama 3. (113) Bomprezzi i suradnici su pokazali da 53 gena mogu razlikovati bolesnike s MS-om od zdravih kontrola, te su nalazi ovoga istraživanja podržali koncept da je aktivacija autoreaktivnih T stanica od primarne važnosti u patogenezi MS-a. (99) Analizom genskog profila krvi ne samo da se mogu razlikovati bolesnici s MS-om od zdravih ispitanika, već se mogu razlikovati bolesnici koji su u relapsu od onih koji su u remisiji. Tako su Achiron i suradnici pokazali da 721 gena koji sudjeluju u aktivaciju stanica, širenje epitopa te

bijegu od regulatornog imunskog nadzora, identificira MS bolesnika u akutnom relapsu od onih koji su u remisiji. (114)

Analiza genske ekspresije krvi mikročipovima se puno koristila u istraživanju odgovora na imunomodulacijsko liječenje. Tako je analiza genske ekspresije u krvi bolesnika koji su liječeni interferonom pokazala da njegovo djelovanje nije samo protuupalno. (115) Daljnja istraživanja su pokazala da liječenje interferonom beta značajno mijenja gensku ekspresiju 21 od 1263 analizirana gena nakon 3 i 6 mjeseci terapije. Od promijenjenih gena, 9 ih je imalo promotore koji odgovaraju na interferon, no nije bilo promjene u Th1 ili Th2 markerima. (116) Ove studije su pokazale da je genski odgovor na liječenje interferonom kompleksan i uključuje utjecaj na staničnu migraciju, degradaciju matriksa, proliferaciju, kontrolu staničnog ciklusa, staničnu diferencijaciju, procesiranje i prezentaciju stanica, apoptozu te regulaciju citokina i kemokina. Drugo pitanje na koje se pokušalo odgovoriti ovom metodom je kako prepoznati koji bolesnici će odgovoriti na liječenje interferonom, a koji neće. Nađeno je da interleukin 8 potencijalno može razlikovati one bolesnike koji će reagirati na terapiju. (117) Također je nađeno da interferon beta djeluje na gensku ekspresiju selektivno i ovisno o vremenu što također može poslužiti kao monitoriranje terapijskog odgovora. (118) To se prvenstveno događa s genima koji sudjeluju u antiviralnom odgovoru, a koji se induciraju već 1 – 4 sata nakon primjene lijeka. Slično se događa i s genima koji sudjeluju u signalizaciji interferona beta, kao i markerima limfocitne aktivacije.

Nakon analize više objavljenih studija te nedavno objavljenim potvrdnim istraživanjem došlo se do zaključka da 15 markera koji su različito eksprimirani tijekom cijelog liječenja interferonom beta mogu poslužiti kao najbolji biomarkeri odgovora na ovaj lijek: EIF2AK2, IFI6, IFI44,

IFI44L, IFIH1, IFIT1, IFIT2, IFIT3, ISG15, MX1, OASL, RSAD2, SN, XAF1 i marker 238704_at. (119)

Iz navedenog je vidljivo da je korištenje DNA mikročipova dovelo do nekoliko značajnih otkrića vezanih i uz patogenezu MS-a, ali i načinu djelovanja interferona. Kako je MS heterogena bolest potrebno je uzeti mnogo čimbenika u obzir kako bi se povećala pouzdanost i reproducibilnost podataka dobivenih ovim istraživanjima. Trenutno nema niti jednog istraživanja koje je koristilo gensku ekspresiju mikročipovima u bolesnika s prvim simptomom MS-a, klinički izoliranim simptomom. Ovakvo istraživanje moglo bi dati važne podatke o genima koji su upleteni u najranijim fazama bolesti.

1.2.4. Proteomika

Proteini koje kodiraju geni su odgovorni za nastanak autoimunih bolesti, tako da direktno mjerenje njihove ekspresije i funkcije može dati vrlo važne podatke u monitoriranju bolesti. Nedavni napredak u proteomici je omogućio profiliranje velikog broja proteina u tkivima ili serumu. Primjena ove tehnologije na autoimune bolesti omogućuje identifikaciju proteinskih biomarkera za dijagnozu i monitoriranje bolesti u kliničkom okruženju. Slično kao i genomika, proteomika može služiti u procjeni težine bolesti, progresiji invalidnosti, te odgovoru na terapiju. Unatoč navedenom, pouzdani markeri koji bi zadovoljili ranije navedene ciljeve još uvijek nedostaju. (120)

Proteomika se puno koristila u istraživanju MS-a, pretežno u otkrivanju novih patogenetskih mehanizama, u istraživanju uloge okolišnih čimbenika, te karakterizaciji autoimunog odgovora. (121)

Jedno od najvažnijih otkrića u otkrivanju novih patogenetskih mehanizama je vezano uz koagulacijsku kaskadu. Han i suradnici su pomoću proteomike identificirali proteine koji su jedinstveni za tri glavna tipa MS lezija: akutni plak, kronični aktivni plak i kronični plak. (122) Tkivni faktor i protein C inhibitor su identificirani unutar kroničnih aktivnih plakova, nalaz koji sugerira da disregulacija molekula vezanih uz koagulaciju ima važnu ulogu u MS-u. Ovo istraživanje je nadalje pokazalo da primjena hirudina ili rekombinantnog aktiviranog proteina C smanjuje težinu bolesti u EAE modelu te suprimira Th1 i Th17 citokine u astrocitima i imunim stanicama. Primjena mutiranih oblika rekombinantnog aktiviranog proteina C je pokazala da su oba njegova svojstva (antikoagulantno i funkcija signalizacije) neophodna kako bi se smanjila težina bolesti. Ovo istraživanje je možda najbolji primjer kako ovakva istraživanja mogu dovesti do otkrića specifičnih patogenetskih mehanizama. Već ranije je opisana uloga proteomike u otkrivanju EBV-a kao mogućeg okidača MS-a. (89)

Kako se smatra da je MS autoimuna bolest za pretpostaviti je da istraživanje imunog odgovora korisno u ranoj dijagnozi, prognozi i praćenju MS bolesnika. Antigenski mikročipovi su uspjeli pokazati promjene u spektru protutijela koje su posljedica antigensko širenje koje prati EAE progresiju, što je dovelo do razvoja cjepiva protiv MS-a. (123) Također podatci dobiveni proteomikom sugeriraju da antigenski mikročipovi mogu identificirati spektar protutijela koji je povezan s različitim oblicima MS-a te identificirati patogene mehanizme i terapijske ciljeve. To je nedavno i potvrđeno te je pokazano da svaki oblik MS-a (relapsno remitirajući, sekundarno progresivni i primarno progresivni) ima jedinstveni spektar protutijela koji ih razlikuje ne samo međusobno već i od zdravih kontrola i ostalih autoimunih bolesti. (124)

Iz navedenog se može zaključiti kako su antigenski mikročipovi obećavajuća tehnologija u otkrivanju bolesnika koji imaju povećan rizik za razvoja MS-a, čak i prije nastanka simptoma. (125)

1.2.5. Metabolomika

Metabolom se definira kao ukupan skup malih molekula metabolita (kao što su hormoni i druge signalne molekule) koji se nalaze unutar određenog biološkog uzorka. Nekoliko skupina istraživača koristi metabolomiku u istraživanju MS-a. Tako je pokazano da tijekom MS-a makrofazi i astrociti stvaruju NO, metabolit za koji se smatra da doprinosi nekoliko aspekata MS-a kao što je poremećaj krvno-moždane barijere, oštećenju oligodendrocita i demijelinizaciju, te aksonalnu degeneraciju. (126)

Drugi metabolom za koji je otkriveno da igra važnu ulogu u MS-u je N-acetil-aspartat (NAA). Novija istraživanja su pokazala da precizno mjerenje razine NAA specifičnom metodom MRI spektroskopije može identificirati bolesnike s relapsno remitirajućem oblikom MS-a u njihovom prijelazu u sekundarno progresivni oblik bolesti. (127) Ovi podatci sugeriraju da metabolomiti mogu biti vrlo osjetljivi biomarkeri neurodegenerativne i upalne faze patogeneze MS-a. (128)

2. HIPOTEZA

Rezimirajući podatke navedene u Uvodu, znanstvena i stručna utemeljenost našeg istraživanja ogleda se u slijedećem:

1. Jedno od glavnih obilježja MS-a je visok stupanj varijabilnosti u konačnom ishodu između bolesnika, sa spektrom bolesti koji varira od benignog, pa čak i asimptomatskog pa do malignih slučajeva. Stoga određivanje laboratorijskih i kliničkih čimbenika koji bi pouzdano predvidjeli dugoročni ishod bolesti u ranoj fazi bolesti je neophodno.
2. MS heterogena bolest nepredvidiva tijekom, te su neophodno potrebni markeri koji bi omogućili bolji postupak s bolesnicima.
3. Iako su likvor i MRI vrlo važni u predviđanju razvoja MS-a nakon klinički izoliranog sindroma, još uvijek postoji potreba za markerima koji bi s većom specifičnošću i osjetljivošću mogli predvidjeti razvoj klinički definitivnog MS-a nakon klinički izoliranog sindroma.
4. Trenutno ne postoji niti jedan biomarker za MS koji zadovoljava kriterije dobrog biomarkera.

Stoga je cilj ovog istraživanja pomoću genomske analize ekspresijskog profila pune krvi otkriti gene koji su upleteni najranijoj fazi multiple skleroze, klinički izoliranom sindromu.

HIPOTEZA:

Genomskom analizom ekspresijskog profila pune krvi u pacijenata s optičkim neuritisom, klinički izoliranim sindromom, moguće je odrediti diferencijalno eksprimirane gene koji mogu poslužiti kao potencijalni genski markeri za dijagnosticiranje i praćenje razvoja multiple skleroze.

3. CILJEVI

3.1. Opći ciljevi

1. Odrediti genske markere koji bi poslužili za bolju dijagnozu i praćenje bolesnika s klinički izoliranim sindrom i multiplom sklerozom.

3.2. Specifični ciljevi

1. Provesti analizu genske ekspresije pomoću genskih čipova koristeći uzorke pune krvi uzete od bolesnika s optičkim neuritisom.
2. Odrediti značajno promjenjenu ekspresiju mRNA u uzorcima krvi pacijenata s optičkim neuritisom u usporedbi sa zdravim kontrolama.

3.3. Doprinos i očekivana primjena istraživanja

Multipla skleroza je kronična upalna bolest središnjeg živčanog sustava koja većinom zahvaća osobe mlađe životne dobi te dovodi do značajnog invaliditeta. Kada se javi prvi simptom, dijagnoza multiple skleroze se ne može postaviti jer prema kriterijima mora postojati diseminacija bolesti u vremenu i prostoru.

Iako postoje paraklinički kriteriji kojima se povećava rizik od razvoja multiple skleroze nakon klinički izoliranog sindroma (npr. optičkog neuritisa), još uvijek ne postoje dovoljno precizni biomarkeri koji bi predvidjeli razvoj MS-a nakon CIS-a.

Cilj ovog istraživanja je odrediti značajno promijenjenu ekspresiju mRNA u uzorcima krvi bolesnika s optičkim neuritisom u usporedbi sa zdravim kontrolama. Tako promijenjena mRNA mogla bi poslužiti kao genski marker koji je direktno vezan uz patofiziologiju demijelinizacijskih bolesti središnjeg živčanog sustava. Otkrivanje genskih markera bi imalo posljedicu u ranom započinjanju i praćenju imunomodulacijskog liječenja, što je od presudne važnosti u bolesnika s MS-om.

4. ISPITANICI I METODE

4.1. Odabir bolesnika

Uzorci periferne krvi su prikupljeni od bolesnika s akutnim optičkim neuritisom i odgovarajućeg broja zdravih bolesnika usklađenih prema po dobi i spolu, koji su činili kontrolnu skupinu. Uzorci krvi su skupljeni unutar 4 tjedna od nastanka prvih simptoma bolesti.

Svim bolesnicima je učinjen MR mozga i MR vratne kralježnice, a sekundarni uzroci demijelinacijskih oštećenja su isključeni odgovarajućim laboratorijskim pretragama koje uključuju: analizu cerebrospinalne tekućine – broj stanica, IgG indeks i oligoklonske vrpce, imunološki testovi (ENA, ANA, ANCA, aCl IgG and IgM), IgM i IgG potutijela na Borreliu burgdorferi u serumu i likvoru, HIV test, serumska razima vitamina B12 i hormoni štitnjače.

4.2. RNA izolacija

Uzorci su skupljeni od bolesnika s optičkim neuritisom te odgovarajućih kontrolnih bolesnika u jutranjim satima. Periferna krv je izvađena u PAXgeneTM epruvete (Preanalytix, Qiagen), koje su specijalno proizvedene za dobivanje visoko kvalitetne RNA iz ljudske krvi. Nakon vađenja, epruvete su stavljene u okomiti položaj te su ostvljene 24 sata na sobnoj temperaturi. Nakon toga su spremljene na -80°C dok se nije pristupilo RNA izolaciji.

Ukupna RNA iz uzoraka izolirana je uz primjenu RNA kita za izolaciju RNA (PaxGene, Preanalytix). Svi uzorci tretirani su DNA-zom (RNase-free DNase set, Qiagen). Koncentracija dobivene RNA određena je mjerenjem absorbancije razrijeđenog uzorka pri valnoj duljini od 260

nm na spektrofotometru BioPhotometer (Eppendorf), a kvaliteta izolirane RNA određena je uporabom RNA 6000 Nano LabChip kita na 2100 Bioanalyzeru (Agilent Technologies).

4.3. Analiza genske ekspresije na DNA čipovima

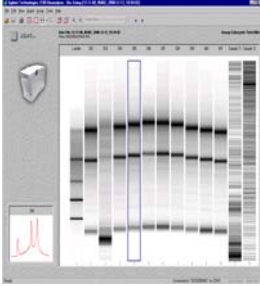
Genska ekspresija je analizirana uporabom DNA čipa za analizu cjelokupnog humanog genoma (Human Genome U133 PLUS 2.0 GeneChip, Affymetrix) koji sadrži 54 675 25-baznih proba.

Analiza ekspresije obavljen je prema postupniku Affymetrix koji uključuje sintezu cDNA iz visoko kvalitetne RNA, pročišćavanje dobivene cDNA, in vitro transkripcije u biotinom označenu cRNA, hibridizacije pročišćene cRNA na čipove te kemiluminiscencijske detekcije. Svi genski čipovi su očitani na Affymetrix GeneChip sustavu 3000 koristeći ciljni intenzitet mjerenja od 100. Prigodom pokusa primjenjivale su se uobičajene mjere za provjeru kvalitete i normalizaciju (omjer 3' i 5' razine ekspresije gena te standardna normalizacija prema Affymetrix postupniku).

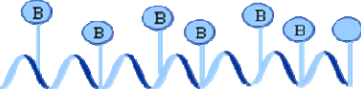
Svi genski čipovi obrađeni su u Centru za funkcionalnu genomiku Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu.

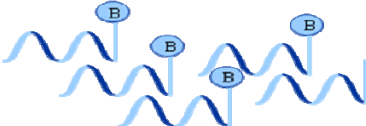
-  Uzimanje uzoraka u PaxGene™ epruvete

- Izolacija RNA

-  Provjera RNA kvalitete

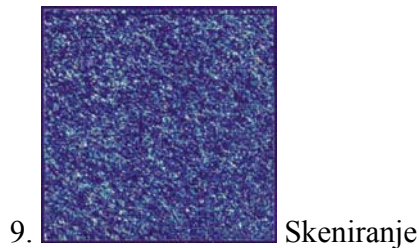
-  Sinteza cDNA

-  *In vitro* transkripcija i obilježavanje biotinom

-  Fragmentiranje cRNA

- Hibridizacija

- Pranje i bojanje



Slika 1. Pregled metode analize genskih mikročipova

4.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Za qRT-PCR analizu, dva mikrograma ukupne RNA visoke kvalitete dobivene iz pune krvi reverzno su prepisane uporabom SuperScript™ First-Strand Synthesis sustava za reverznu transkripciju prema postupniku proizvođača (Invitrogen). Ekspresije gena od interesa mjerena je pomoću LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green kita (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) uz uporabu LightCycler instrumenta (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

4.5. Statističke metode

Dobiveni podaci su analizirani uz uporabu slijedećih softwareskih programa: Affymetrix Gene Chip Operating System (GCOS) 1.2, S-plus, R, DChip. GCOS 1.2 koristila se za detekciju i izračunavanje razine ekspresije pojedinih gena na Affymetrix Human Genome U133 PLUS 2.0 genskim čipovima. Lista statistički značajno promijenjenih gena se pred-filtrirala temeljem slijedećih parametara: razina genske ekspresije u makar jednom uzorku iznad 100, omjer

promjene u odnosu na kontrolnu skupinu od 1.8 ili 0.6, te statistička P vrijednost promjene manja od 0.01.

4.5.1. Selekcija i potvrda diferencijalno eksprimiranih gena u svojstvu biomarkera

Postupak selekcije potencijalnih biomarkera uključivao je uporabu odabranih progama unutar slobodno dostupnog softverskog paketa R, te Principal Component Analysis u sklopu programa S-Plus. Za odabir diferencijalno ekprimiranih gena (tzv “feature selection”) na osnovu čijeg izražaja se najbolje mogu razlučiti bolesnici s optičkim neuritisom od kontrola koristio se algoritam Stanford PamR, koji omogućuje nenadgledani odabir kandidatskih gena. Selektirane skupine gena su dodatno validirane statistički pomoću algoritama „Linear Discriminant Analysis“ i „Support Vector Machines“. Dodatno, kako bismo na što bolji način mogli vizualizirati razliku između bolesnika i kontrola u ekspresiji odabranog biomarkerskog seta, koristili smo Principal Component Analysis. Konačno biomarkerski geni su validirani pomoću kvantitativne lančane reakcije polimeraze (QRT-PCR) u originalnoj skupini bolesnika s optičkim neuritisom.

4.5.2. Analiza genske ontologije

Kako bi se značajno eksprimirano geni mogli klasificirati na temelju njihovih svojstava genske ontologije, koristili smo “Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery” (DAVID). Koristeći “Functional Annotation Clustering” alat u DAVID-u identificirali smo klastere genskih skupina sa značajno sličnim ontologijama te smo ih testirali nasuprot cijele liste gena.

4.5.3. Analiza statistički značajno promijenjenih signalnih putova

U svrhu određivanja statistički značajno promijenjenih funkcijskih i signalnih putova, rezultati analize ekspresije genskim čipovima dodatno smo obradili GSEA 1.0 software-skim paketom. Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) jest statistička metoda razvijena u svrhu obrade podataka dobivenih analizom ekspresije na razini cjelokupnog genoma. Algoritam se temelji na principu rangiranja gena na osnovu korelacije između njihove ekspresije te pripadanja funkcionalnim skupinama, koristeći pri tome metriku omjera signala i buke. U analizi podataka koristili smo softwareski paket GSEA-P i set sa 522 predefinirane skupine gena. Rezultati statističkom metodom GSEA omogućili su prepoznavanje najznačajnije promijenjenih funkcionalnih i signalnih skupina gena. GSEA nam je istodobno omogućila potanji uvid u patofiziološku podlogu nastanka bolesti.

4.5.4. Kvantitativna lančana reakcija polimerazom

Za relativnu kvantifikaciju genske ekspresije uporabljena je komparativna $2^{-\Delta\Delta C_t}$ metoda, u kojoj C_t označava „cycle treshold“, frakcionirani broj ciklusa kada fluorescentni signal dostiže prag detekcije. Ekspresija četiriju „housekeeping“ gena (eucaryotic translation elongation factor 1 gamma, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, beta-2-micoglobulin i beta-actin) analizirana je pomoću geNorm 3.3 softwareskog paketa kojim se određuje najstabilniji „housekeeping“ gen. Gen sa najstabilnijom ekspresijom korišten je za normalizaciju rezultata. Rezultati su prikazani u „fold change“ u odnosu na komparabilnu razinu ekspresije.

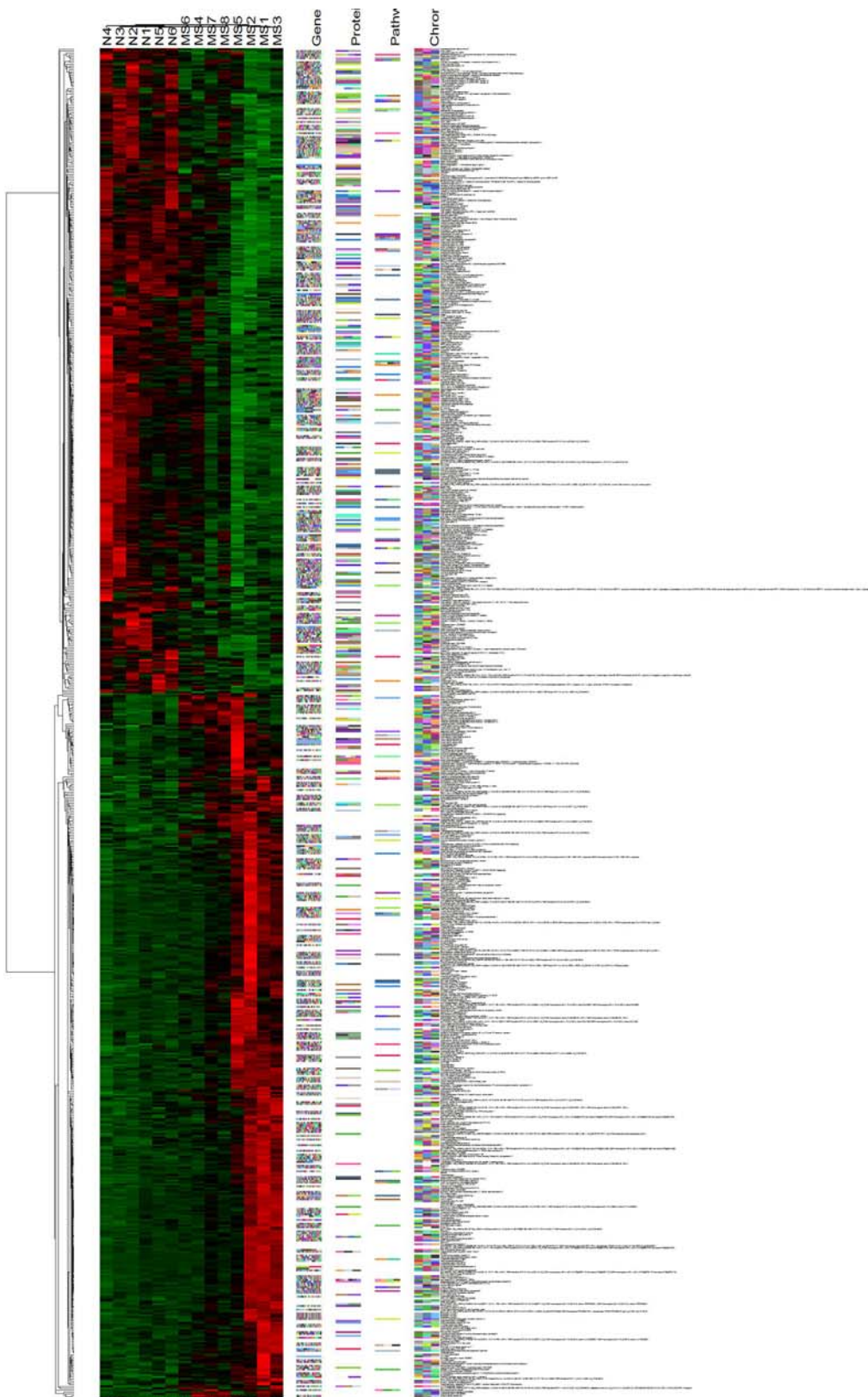
4.6. Odobrenja

Istraživanje je odobrilo Etičko povjerenstvo Kliničkog bolničkog centra Zagreb i Etičko povjerenstvo Medicinskog fakulteta sveučilišta u Zagrebu. Ovo istraživanje je dio projekta 108-1081874-1988 Molekularne i biološke osnove demijelinizacijskih bolesti živčanog sustava. Svaki bolesnik potpisao je informirani pristanak.

5. REZULTATI

U istraživanje je ukupno uključeno 15 bolesnika s optičkim neuritisom i 10 zdravih ispitanika. Svi bolesnici s optičkim neuritisom su imali barem jednu demijelinizacijsku leziju na MR-u mozga i svi su imali pozitivne oligoklonske IgG vrpce u likvoru.

Analizom na Affymetrixovim genskim čipovima na 8 bolesnika s optičkim neuritisom i 6 zdravih ispitanika nađeno je 722 značajno ($p < 0.05$; ekspresijska razina > 100 . omjer promjene > 1.8 ili < 0.6) promijenjenih gena. Od 722 promijenjena gena 377 ih je pokazalo povišenu razinu ekspresije, a 345 smanjenu razinu ekspresije u bolesnika s optičkim neuritisom u usporedbi sa zdravim kontrolama (Slika 2).



Slika 2. Promijenjena genska ekspresija u krvi bolesnika s optičkim neuritisom. Geni su izabrani od 8 bolesnika s optičkim neuritisom i 6 zdravih ispitanika prema p- vrijednosti ($p < 0.05$) i ekspresijskom maksimumu većem od 100, te omjeru promjene > 1.8 ili < 0.6 . Svaki stupac predstavlja uzorak, a svaki red predstavlja gen. Crvena boja predstavlja povišenu ekspresiju, a zelena boja predstavlja sniženu ekspresiju (N1-N6 su zdravi ispitanici, a MS1-MS8 su bolesnici s optičkim neuritisom).

5.1. Selekcija gena i njihova biološka obilježja

Kako se rezultati analize genskim mikročipovima trebaju potvrditi drugom neovisnom metodom, mi smo koristili kvantitativni RT-PCR. Ova metoda ima lošiju osjetljivost od genskih mikročipova tako da smo odabrali 9 gena, 5 s povišenom i 4 sa smanjenom ekspresijom prema „cut-of“ vrijednosti ekspresijskog omjera > 1.8 ili < 0.6 te isključivanjem gena s nepoznatom funkcijom. Ovih 9 gena smo testirali u 15 bolesnika s optičkim neuritisom i 10 zdravih kontrola. Izabrani su slijedeći geni:

PTPRC (protein tyrosine phosphatase, receptor type, C)

Protein kodiran ovim genom je član protein tirozin fosfataza obitelji, za koje je poznato da su signalne molekule koje reguliraju različite stanične procese, uključujući stanični rast, diferencijaciju, mitotski ciklus i onkogenu transformaciju. Za PTPCR se pokazalo da je neophodan u regulaciji T i B staničnog signaliziranja. Funkcionira putem direktne interakcije s

komponentama antigen-receptor kompleksa ili putem aktivacije različitih kinaza iz Src obitelji koje su potrebne za signalizaciju antigen receptor. (129)

SLC11A1 (solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1)

Ovaj gen je član “solute carrier family 11” (proton-coupled transporter divalentnih metalnih iona) te kodira za višeprolazni membranski protein. Ovaj protein funkcionira kao transporter divalentnih metala (željeza i magnezija) te je upleten u metabolizam željeza i otpornost domaćina na određene patogene. Mutacije ovog gena su povezane s pojačanom osjetljivošću na infekcije (npr. tuberkulozu) te inflamatorne bolesti kao što su reumatoidni artritis i Crohnova bolest. (129)

SLPI (secretory leukocyte peptidase inhibitor)

Ovaj gen kodira sekretorni inhibitor koji štiti epitelna tkiva od serinskih proteaza. Nalazi se u različitim izlučevinama kao što su sjemena tekućina, cervikalna sluz, bronhijalni sekret te pokazuje visoki afinitet za tripsin, leukocitnu elastazu i katepsin G. Njegov inhibitorski učinak doprinosi imunološkom odgovoru štiteći epitelne površine od napada endogenih proteolitičkih enzima. (129)

NAIP (NLR family, apoptosis inhibitory protein)

Ovaj gen je dio 500 kb invertirane duplikacije kromosoma 5q13. Ova regija sadrži najmanje 4 gena i ponavljajuća elementa što je čini podložnom preraspodjelama i delecijama. Smatra se da je NAIP modifikator spinalne mišićne atrofije koja je uzrokovana mutacijom u susjednom SMN1

genu. Protein kodiran ovim genom pokazuje visoku homologiju s genima koji sudjeluju u inhibiciji apoptoze. (129)

LPXN (Leupaxin)

Produkt kodiran ovim genom je najjače eksprimiran u hematopoetskim stanicama te pripada paxillin obitelji proteina. Slično i drugim članovima ove obitelji protein, sastoji se od 4 leucinom bogata motiva u N-kraju i 4 LIM domene u C-kraju. Ovaj protein funkcionira u stanično specifičnoj signalizaciji preko PYK2, koji je član obitelji fokalnih adhezijskih kinaza. Kao supstrat tirozin kinaze u limfoidnim stanicama, djeluje i kao regulator aktivnosti tirozin kinaze. (129)

CCR3 (chemokine (C-C motif) receptor 3)

Protein kodiran ovim genom je receptor C-C tipa kemokina. Pripada obitelji 1 G-protein vezanih receptora. Na ovaj receptor se veže nekoliko različitih kemokina uključujući eotaxin (CCL11), eotaxin-3 (CCL26), MCP-3 (CCL7), MCP-4 (CCL13), and RANTES (CCL5). Jako je eksprimiran u eozinofilima i bazofilima, ali se nalazi i u TH1 i TH2 stanicama. (129)

ITGA4 (integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor))

Produkt ovog gena pripada obitelji protein integrin alfa lanca. Integrini su heterodimerni integralni membranski protein koji se sastoje od alfa i beta lanca. Ovaj gen kodira alfa 4 lanac. (129)

CD28 molekula

CD28 kostimulacija je neophodna za CD4 pozitivnu T staničnu proliferaciju, preživljenje, stvaranje interleukina 1 te razvoj TH2 odgovora. (129)

SLAMF7 (SLAM family member 7)

Ovaj gen kodira membranski protein koji sudjeluje u staničnoj adheziji. (129)

Simbol gena	Affymetrix	Opis gena	Omjer	p-vrijednost
PTPRC	1552480_s_at	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	4.316954	0.008133
SLC11A1	217507_at	Solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), member 1	4.24988	0.033451
SLPI	203021_at	Secretory leukocyte peptidase inhibitor	2.841743	0.038785
NAIP	204860_s_at	NLR family, apoptosis inhibitory protein	2.78565	0.049564
LPXN	242778_at	Leupaxin	2.101067	0.000502
CCR3	208304_at	Chemokine (C-C motif) receptor 3	0.40323	0.009491

ITGA4	205884_at	Integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)	0.521894	0.013865
CD28	206545_at	CD28 molecule	0.553633	0.003298
SLAMF7	219159_s_at	SLAM family member 7	0.456093	0.022967

Tablica 4. Detalji 9 promijenjenih gena.

5.2. Analiza genske ontologije

Analiza genske ontologije jest statistički pristup koji omogućava određivanje zastupljenosti pojedinih strukturnih i funkcionalnih pojmova unutar diferencijalno ekspresirane skupine gena kako bi se odredila statistički značajna aktivnost pojedinih genskih skupina u ispitivanoj populaciji bolesnika. Genska ontologija ima za svrhu nekoliko ciljeva. Kao prvo, da se odradi točan popis atributa za pojedine gene i genske produkte. Zatim, da se poboljša anotacija za sve gene i točno odrede sve poznate informacije od sekvence DNA, preko proteinskog produkta, do potencijalne funkcije pojedinog gena. Konačno, svrha je genske ontologije da omogući što bolju analizu i uvid u generalne biološke mehanizme u koje su pojedini geni uključeni, te omogući istraživački pristup na razini sustavne biologije.

Ontologija pokriva tri glavna područja i to: „cellular component“ koji se odnosi na informaciju za koji dio stanice ili ekstracelularnog prostora je vezana funkcija pojedinog gena; „molecular function“ koji se odnosi na molekularni proces u koji je pojedini gen uključen; „biological process“ koji se odnosi na funkcije gena u skupinama povezanih bioloških procesa koji se odvijaju u većim integriranim organskim jedinicama poput tkiva, organa ili organizama.

Kako bismo odredili pojmove genske ontologije najviše zastupljene u skupini statistički značajno promijenjenih gena, koristili smo statistički paket „Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)“. Stoga smo analizirali odvojeno skupinu statistički značajno promijenjenih gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS i skupinu gena sa sniženom ekspresijom u bolesnika s MS-om.

Analiza genske ontologije u skupini gena sa statistički značajno povišenom ekspresijom u bolesnika s MS, pokazala je značajnu zastupljenost pojmova za fosforilirane proteine, proteinsko vezivanje, alternativni splicing, posttranslacijsku modifikaciju, staničnu smrt i programiranu staničnu smrt.

U skupini gena sa statistički značajno sniženom ekspresijom u bolesnika s MS-om, analiza je pokazala značajnu zastupljenost ontoloških pojmova za negativnu regulaciju programirane stanične smrti, anti-apoptozu, negativnu regulaciju apoptoze, regulaciju staničnog transporta, stanični razvoj, te stanični ciklus.

S namjerom da analiziramo ne samo zastupljenost pojedinih ontoloških pojmova, već i njihovu međusobnu funkcionalnu povezanost, proveli smo i tzv. „Gene Ontology Functional Annotation Clustering“. Ovakav pristup omogućava sustavni uvid u povezanost većih skupina pojmova genske ontologije.

U skupini gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS-om, funkcionalno klasteriranje pokazalo je 3 skupine ontološki pojmova s faktorom obogaćenja većim od 2.

U prvoj skupini pojmova genske ontologije prevladavali su geni uključeni u proteinsko vezivanje, vezivanje te staničnu jezgru. Prikaz prve skupine može se vidjeti u slici 3.

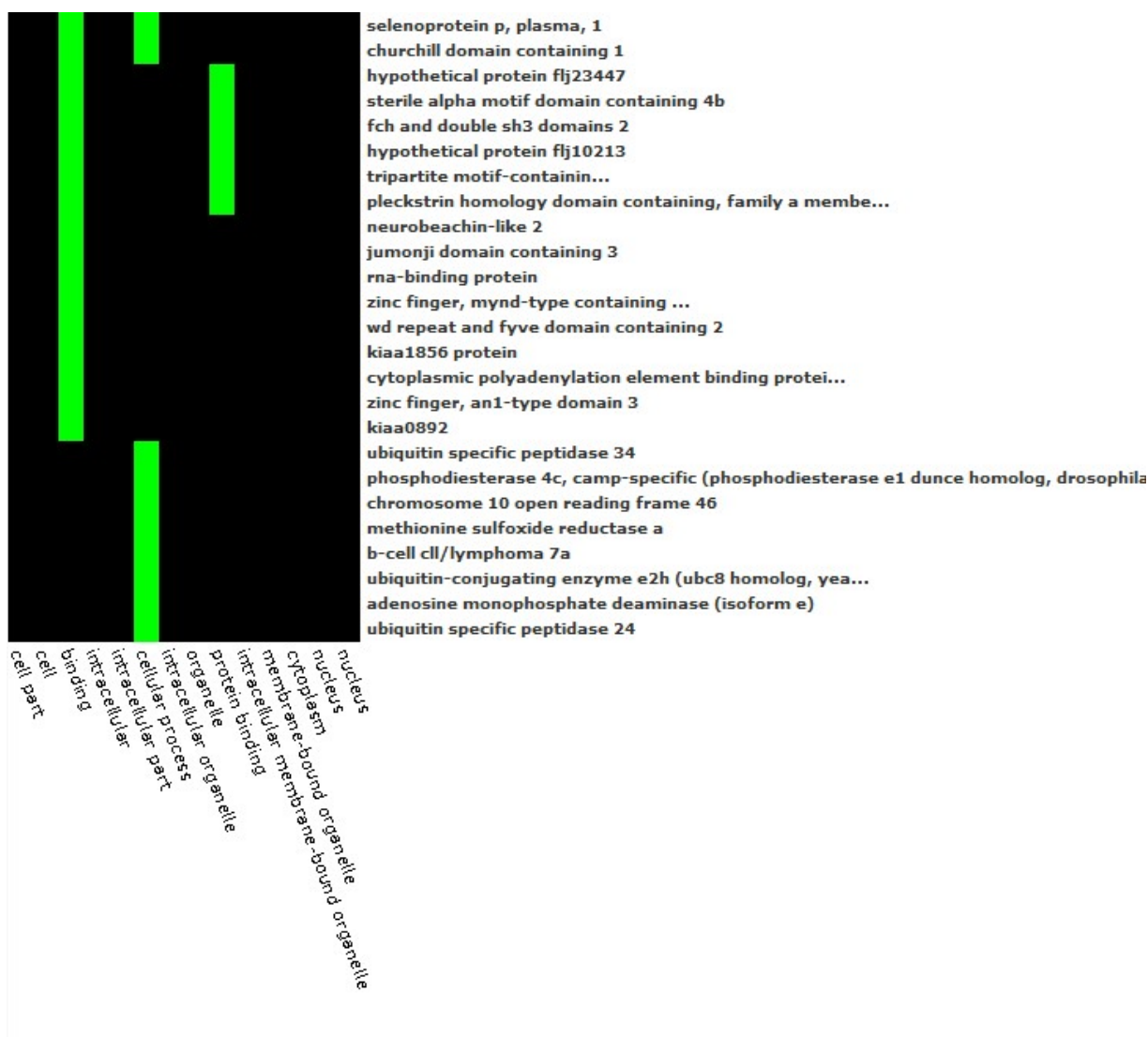
fyn binding protein (fyb-120/1...
 period homolog 1 (drosophila)
 arrestin, beta 2
 serine/threonine kinase 38
 neural precursor cell expressed, developmentally down-regulate...
 nuclear autoantigenic sperm protein (histone-binding)
 at rich interactive domain 3a (bright- li...
 nuclear factor of activated t-cells 5, tonicity-respo...
 restin (reed-steinberg cell-expressed intermediate filament-associated pro...
 leucine rich repeat (in flii) interacting protei...
 actinin, alpha 4
 acidic (leucine-rich) nuclear phosphoprotein 32 family, membe...
 staphylococcal nuclease domain containing 1
 calcium/calmodulin-dependent protein kinase id
 protein phosphatase 3 (formerly 2b), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin a al...
 bcl2-like 1
 survival of motor neuron 1, telome...
 histone deacetylase 4
 signal transducer and activator of transcription...
 ataxin 1
 arachidonate 5-lipoxygenase
 bcl2/adenovirus e1b 19kda interacting protei...
 mitogen-activated protein kinase 1
 protein phosphatase 2 (formerly 2a), catalytic subunit, alpha isof...
 hexamethylene bis-acetamide inducible 1
 supervillin
 reticulon 4
 nuclear receptor subfamily 2, group c, member 2
 thyroid hormone receptor associated protei...
 hla-b associated transcript 1
 arginine-glutamic acid dipeptide (re) repeats
 protein inhibitor of activated sta...
 epidermal growth factor receptor pathway substrate 15-li...
 hmg-box transcription facto...
 forkhead box p1
 serine/arginine repetitive matri...
 pou domain, class 2, transcription factor 1
 bromodomain containing 4
 max dimerization protein 1
 e74-like factor 2 (ets domain transcription fac...

	e74-like factor 2 (ets domain transcription fac...
	similar to dna-directed rna polymerase i (135 kda)
	mastermind-like 3 (drosophila)
	euchromatic histone-lysine n-methyltransferas...
	nuclear receptor coactivator 1
	tsc22 domain family, member 4
	zinc finger homeobox 1b
	ets variant gene 6 (tel oncogene)
	integrator complex subunit 4
	atp/gtp binding protein 1
	cug triplet repeat, rna binding protei...
	proteasome (prosome, macropain) activator subuni...
	cut-like 1, ccaat displacement protein (drosophi...
	serine/threonine kinase 35
	yy1 associated protein 1
	calcium binding and coiled-coil domain 2
	synaptopodin 2
	set binding factor 2
	golgi associated, gamma adaptin ear containing, arf binding protei...
	exostoses (multiple) 1
	unc-51-like kinase 1 (c. elegans)
	vacuolar protein sorting 35 (yea...
	phosphofurin acidic cluster sorting protein 1
	collagen, type iv, alpha 3 (goodpasture antigen) binding prot...
	rab6a, member ras oncogene family
	stromal interaction molecule 1
	mitochondria-associated protein involved in granulocyte-macrophage colony-stimulatin
	formin binding protein 1
	v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1
	cytochrome b-245, alpha polypeptide
	kinesin family member 1b
	hook homolog 3 (drosophila)
	malate dehydrogenase 2, nad (mitochondrial)
	adaptor-related protein complex 2, alpha 1 subu...
	hypothetical protein mgc13098
	g protein-coupled receptor kinase interacto...
	ubiquitin-activating enzyme e1c (uba3 homolog, ye...
	jumonji domain containing 2b
	hypothetical protein flj20813
	c-terminal binding protein 2
	regulatory factor x, 2 (influences hla class ii expressi...
	zinc finger protein 580

	zinc finger protein 580
	cdc-like kinase 4
	zinc finger protein 641
	nipped-b homolog (drosophila)
	kruppel-like factor 3 (basic)
	dead (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 17
	zinc finger protein 710
	polyhomeotic-like 2 (drosophila)
	acyl-coenzyme a oxidase 1, palmitoyl
	rab36, member ras oncogene family
	inositol 1,4,5-triphosphate receptor, typ...
	acyl-coa synthetase long-chain family membe...
	solute carrier family 40 (iron-regulated transporter), mem...
	sperm associated antigen 9
	dip2 disco-interacting protein 2 homolog b (drosophila)
	af4/fmr2 family, membe...
	thyroid hormone receptor associated protei...
	plectin 1, intermediate filament binding protein 500...
	myosin binding protein c, cardiac
	microtubule-actin crosslinking factor 1
	advillin
	slingshot homolog 2 (drosophila)
	adducin 1 (alpha)
	pdz and lim domain 7 (enigma)
	gelsolin (amyloidosis, finnish type)
	nude nuclear distribution gene e homolog like 1 (a. nidulans)
	arp2 actin-related protein 2 homolog (yea...
	iq motif containing gtpase activating protei...
	ptk2b protein tyrosine kinase 2 beta
	map/microtubule affinity-regulating kina...
	udp-gal:betaglcnac beta 1,4- galactosyltransferase, polypepti...
	hypothetical protein loc85007, isoform 2
	st3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferas...
	st3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferas...
	oxoglutarate (alpha-ketoglutarate) dehydrogenase (lipoam...
	ubiquitin-conjugating enzyme e2, j1 (ubc6 homolog, yea...
	b-cell receptor-associated protein 29
	chromosome 3 open reading frame 31
	sam domain and hd domain 1
	breast carcinoma amplified sequence 3
	musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1

	musculoskeletal, embryonic nuclear protein 1
	kiaa0457 protein
	syntrophin, beta 2 (dystrophin-associated protein a1, 59kda, basic compone...
	grip1 associated protein 1
	cytoskeleton-associated protein 4
	lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha
	atg7 autophagy related 7 homolog (s. cerevisi...
	kiaa0999 protein
	ras homolog gene family, member q
	thyroid hormone receptor interactor...
	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1)
	development and differentiation enhancing fact...
	eukaryotic translation initiation factor 4 gamm...
	nardilysin (n-arginine dibasic convertase)
	argininosuccinate synthetase
	lymphocyte cytosolic protein 2 (sh2 domain containing leukocyte protein of 76...
	amyloid beta (a4) precursor protein-binding, family b, member 1 interacting pr...
	zyg-11 homolog b (c. elegans)-like
	tubulin tyrosine ligase-like family, membe...
	leupaxin
	stromal membrane-associated protein 1-like
	pabp1-dependent poly a-specific ribonuclease subunit pan3
	eukaryotic translation initiation factor 4e memb...
	tao kinase 1
	myotubularin related protein 3
	kiaa0174
	trafficking protein, kinesin binding 2
	ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing...
	ankyrin repeat and kh domain containing 1
	chromosome 20 open reading frame 18
	rho gtpase activating protein 26
	son of sevenless homolog 2 (drosophila)
	inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kda
	neutral sphingomyelinase (n-smase) activation associated fac...
	zinc finger protein 539
	baculoviral iap repeat-containing 1
	hypothetical protein flj31951
	solute carrier family 8 (sodium/calcium exchanger), memb...
	insulin-like 3 (leydig cell)
	ring finger protein 130

	ring finger protein 130
	linker for activation of t cells family, memb...
	integrin, alpha x (complement component 3 receptor 4 subu...
	toll-like receptor 10
	vesicle transport through interaction with t-snares homolog 1a (ye...
	insulin-like growth factor 1 recep...
	protein tyrosine phosphatase, receptor typ...
	endothelial differentiation, lysophosphatidic acid g-protein-coupled recept...
	neuroblastoma breakpoint family, member 3
	kiaa1245
	neuroblastoma breakpoint family, member 14
	dead (asp-glu-ala-asp) box polypeptide 59
	zinc finger, cchc domain containing 6
	cd55 antigen, decay accelerating factor for complement (cromer blood gr...
	sema domain, immunoglobulin domain (ig), transmembrane domain (tm) and short cytc
	protein phosphatase 1f (pp2c domain containing)
	matrix metalloproteinase 25
	rab40c, member ras oncogene family
	sortilin-related receptor, l(dlr class) a repeats-contain...
	ubiquitin specific peptidase 32
	dipeptidase 3
	pleckstrin homology, sec7 and coiled-coil domains 4
	hypothetical protein loc201895
	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily b (with tm and itim domains), mem.
	fc fragment of iga, receptor ...
	kiaa1324
	apolipoprotein b48 receptor
	solute carrier family 11 (proton-coupled divalent metal ion transporters), mem...
	cytochrome b reductase 1
	dkfzp586c1324 protein
	g protein-coupled receptor 141
	map/microtubule affinity-regulating kina...
	ras and rab interactor 3
	rio kinase 3 (yeast)
	casp8 and fadd-like apoptosis regulator
	adamts-like 4
	btb (poz) domain containing 9
	hypothetical gene loc283846
	transmembrane protein 88
	fibronectin type iii domain containing 3b
	gram domain containing 1a



Slika 3. Prikaz prve skupine gena s povišenom ekspresijom gdje prevladavaju geni uključeni u proteinsko vezivanje, vezivanje te staničnu jezgru.

Druga skupina pojmova genske ontologije značajno obogaćena u skupini gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS-om uključivala je gene uključene u fosforilaciju proteina, metabolizam fosfora, fosforilaciju aminokiselina, aktivnost protein-kinaze, metabolizam

proteina, fosforilaciju, serin/treonin kinaze, katalitičku aktivnost i aktivnost transferaza. Prikaz svih gena i ontoloških pojmova u skupini 2 vidljiv je u Slici 4.

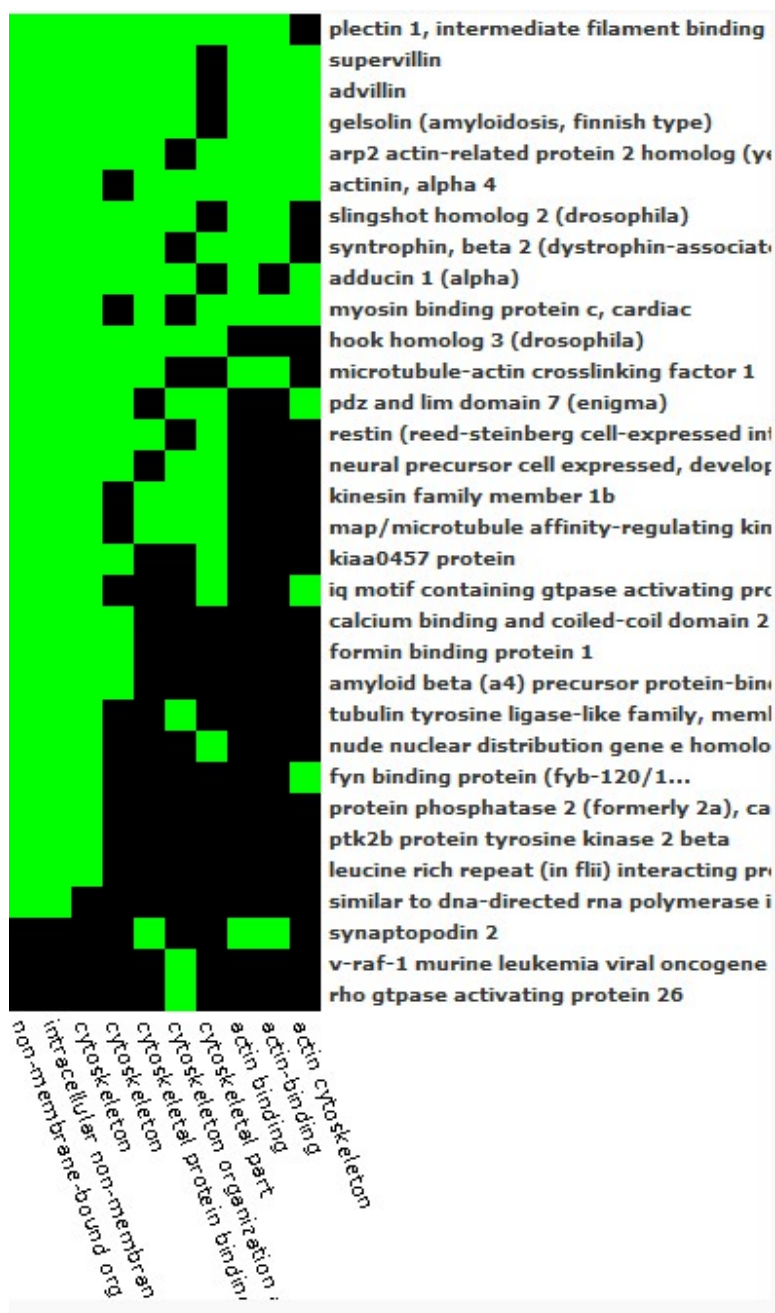




Slika 4. Prikaz druge skupine gena s povišenom ekspresijom gdje prevladavaju geni uključeni u fosforilaciju proteina, metabolizam fosfora, fosforilaciju aminokiselina, aktivnost protein-kinaze,

metabolizam proteina, fosforilaciju, serin/treonin kinaze, katalitičku aktivnost i aktivnost transferaza.

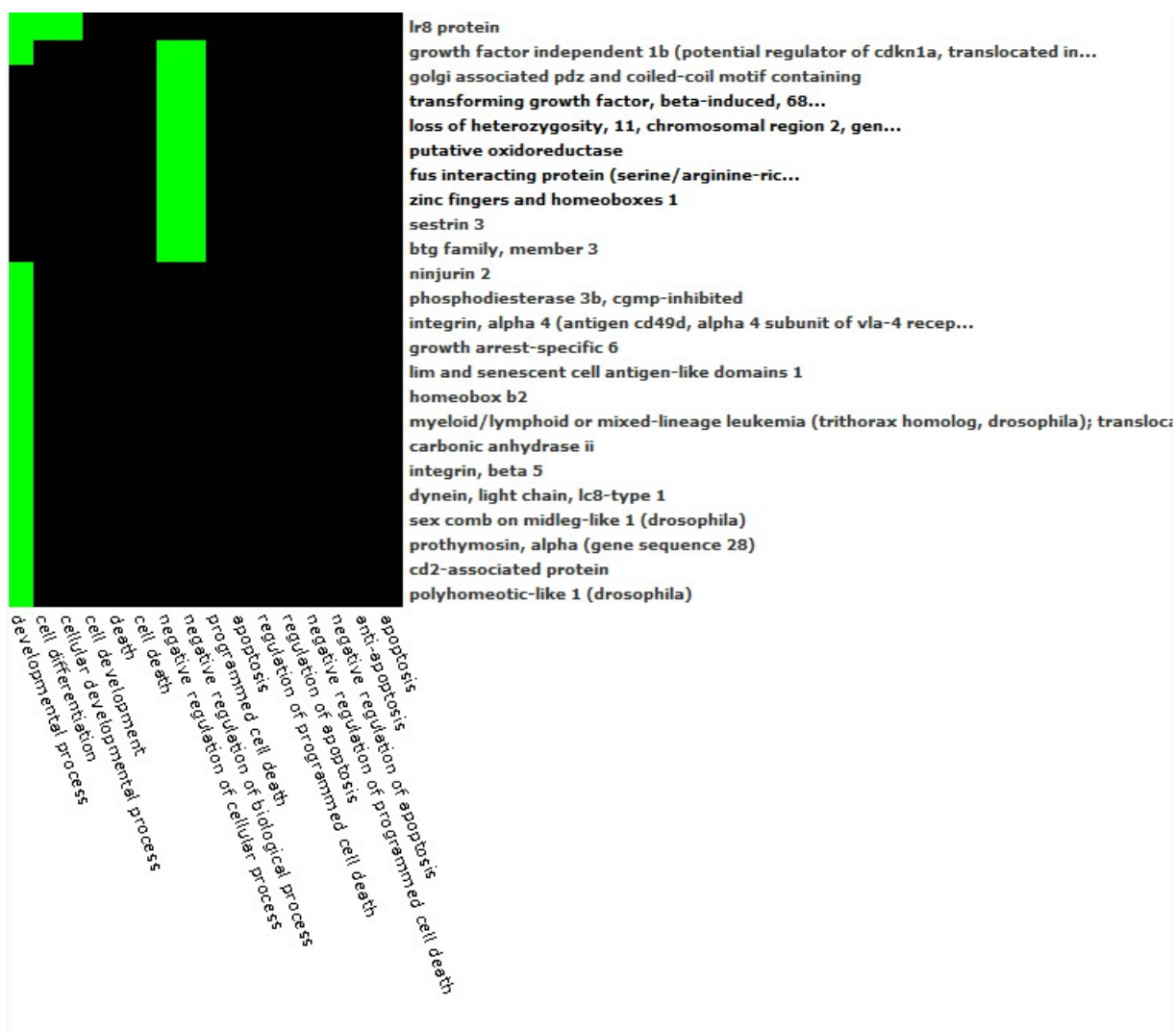
U trećoj skupini ontoloških pojmova značajno povezanih s genima s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS bili su zastupljeni geni uključeni u funkciju citoskeleta, vezanje aktina, organizaciju i biogenezu citoskeleta, dijelove citoskeleta i organele koje nisu vezane za membranu. Prikaz svih gena i ontoloških pojmova u skupini 3 vidljiv je u Slici 5.



Slika 5. Prikaz treće skupine gena s povišenom ekspresijom gdje spadaju geni uključeni u funkciju citoskeleta, vezanje aktina, organizaciju i biogenezu citoskeleta, dijelove citoskeleta i organele koje nisu vezane za membranu.

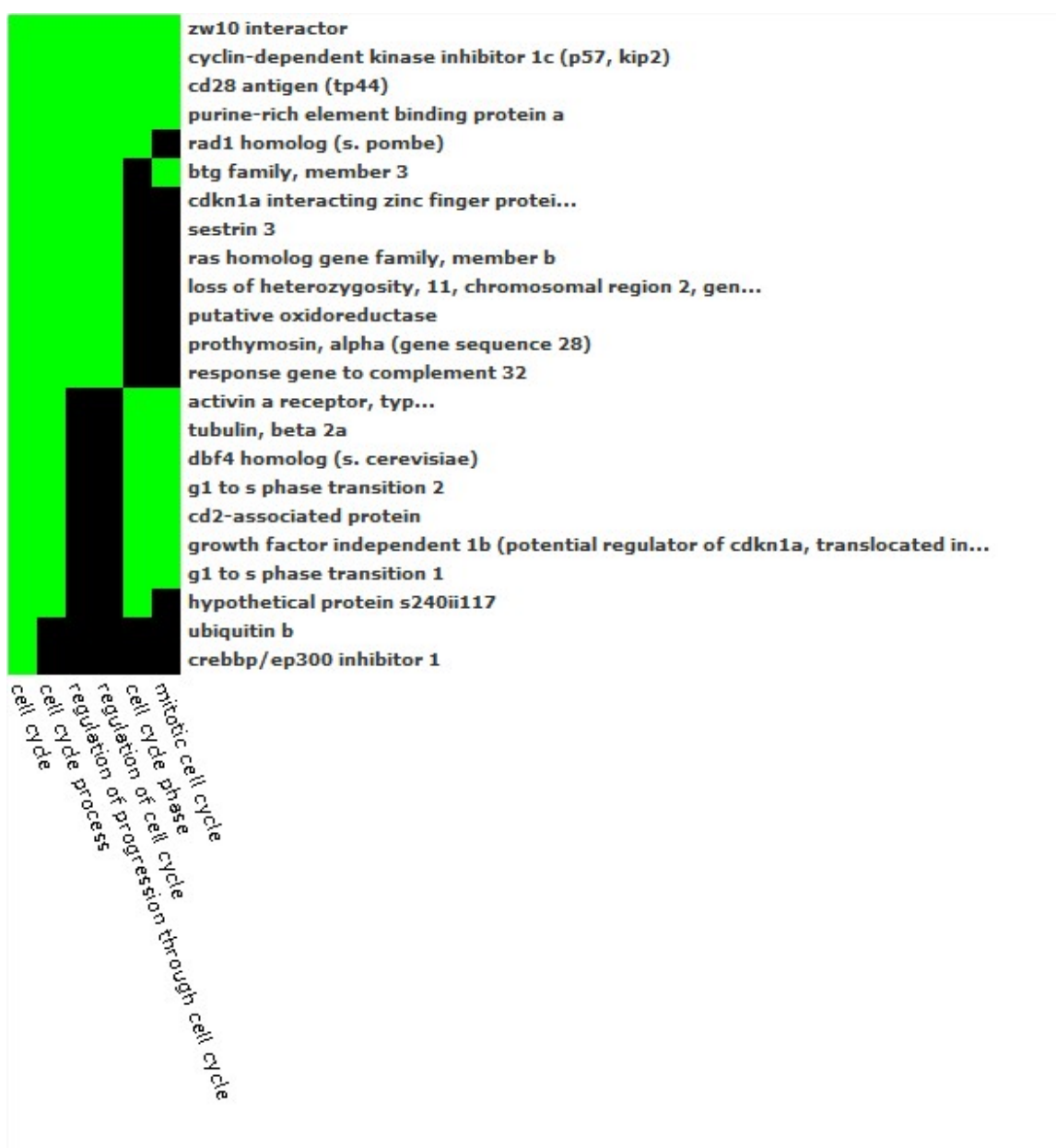
Analiza funkcionalnog klasteriranja ontoloških pojmova u skupini gena sa sniženom ekspresijom u bolesnika s MS-om, pokazala je tri skupine pojmova sa faktorom obogaćenja većim od 2. U prvoj skupini ontoloških pojmova prevladavali su pojmovi povezani s negativnom regulacijom stanične smrti, negativnom regulacijom apoptoze, negativnom regulacijom bioloških procesa, staničnim razvojem, smrću, programiranom smrću i staničnom diferencijacijom. Popis svih gena zatupljenih u navedenim ontološkim pojmovima mogu se vidjeti u slici 6.





Slika 6. Prikaz prve skupine gena sa sniženom ekspresijom gdje spadaju geni povezani s negativnom regulacijom stanične smrti, negativnom regulacijom apoptoze, negativnom regulacijom bioloških procesa, staničnim razvojem, smrću, programiranom smrću i staničnom diferencijacijom.

Druga skupina pojmova genske ontologije pokazala je značajnu zastupljenost gena povezanih sa staničnim ciklusom, regulacijom staničnog ciklusa, procesima povezanim sa staničnim ciklusom, fazama staničnog ciklusa i regulacijom procesa putem staničnog ciklusa u skupini gena sa sniženom ekspresijom. Ukupan popis gena i ontoloških pojmova u skupini 2 može se vidjeti u Slici 7.



Slika 7. Druga skupina sa sniženom ekspresijom gdje se nalaze geni povezani sa staničnim ciklusom, regulacijom staničnog ciklusa, procesima povezanim sa staničnim ciklusom, fazama staničnog ciklusa i regulacijom procesa putem staničnog ciklusa.

Unutar treće skupine ontoloških pojmova značajno povezanih sa skupinom gena sniženom u bolesnika s MS-om prevladavali su geni povezani s metabolizmom imunoglobulina, podtipovima imunoglobulina, domenom imunoglobulina, te imunoglobulin V-setom. Prikaz svih gena i ontoloških pojmova unutar skupine 3 vidljiv je u slici 8.



Slika 8. Treća skupina gena sa sniženom ekspresijom gdje se nalaze geni povezani s metabolizmom imunoglobulina, podtipovima imunoglobulina, domenom imunoglobulina, te imunoglobulin V-setom.

Zaključno, analiza genske ontologije pokazala je značajnu zastupljenost pojmova povezanih za proteinsku fosforilaciju i unutarstanični odjeljak u skupini gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS-om, što može ukazivati na pojačanu aktivaciju krvnih stanica i povišenu signalnu aktivnost, budući da se aktivacija receptora i signalnih molekula često vrši upravo putem fosforilacije. Na pojačanu staničnu aktivnost u uzorcima pune krvi bolesnika s MS-om također ukazuju i značajna zastupljenost pojmova vezanih uz citoskelet i aktin, te proteinsko vezivanje. S druge strane, analiza u skupini gena sa sniženom ekspresijom u bolesnika s MS-om pokazala je značajnu zastupljenost pojmova vezanih uz inhibiciju apoptoze, stanični ciklus, te proizvodnju imunoglobulina. Ukupni rezultati analize genske ontologije ukazuju na pojačanu aktivnost limfocita u bolesnika s MS, sa posljedičnom pojačanom reaktivnošću i povišenim unutarstaničnim signaliziranjem. S obzirom da je u analizi vidljiva smanjena zastupljenost gena povezanih sa produkcijom imunoglobulina, za pretpostaviti je da se radi poglavito o aktivaciji T limfocita. Također je vidljiva i inhibicija apoptoze u usporenje staničnog ciklusa u tim istim stanicama.

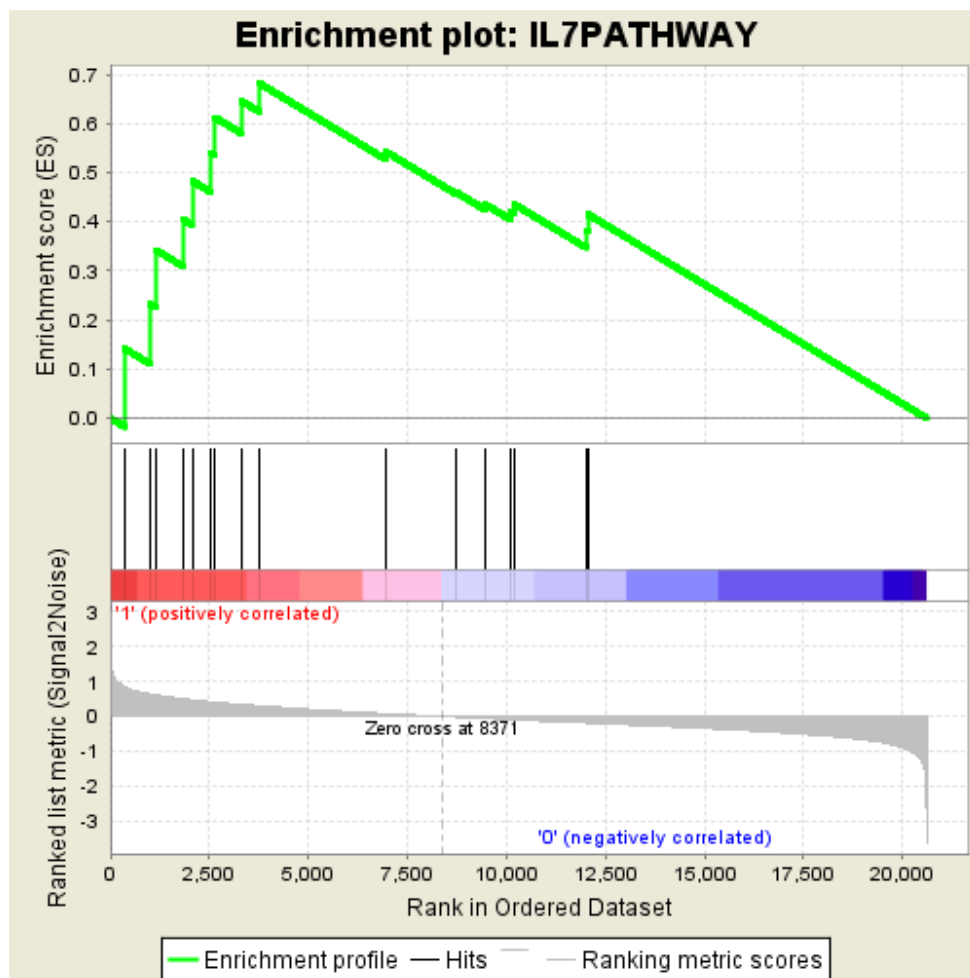
5.3. Gene set enrichment analiza (GSEA)

GSEA je metoda kojom je moguće odrediti pokazuje li definirana skupina gena statistički značajne, podudarne razlike između dva biološka stanja te rezultira u skupini različito eksprimiranih gena. Svi geni s ekspresijskom vrijednošću iznad pozadinske buke su obrađeni GSEA softwareom. Primarna statistička metoda za ispitivanje GSEA rezultata je „normalized

enrichment score“ (NES) koji odražava stupanj u kojem je određena skupina gena prezastupljena na vrhu ili dnu genske liste. Druga značajna statistička metoda je „false discovery rate“ (FDR) koja predstavlja procijenjenu vjerojatnost da skupina gena sa zadanim NES-om predstavlja lažno pozitivan nalaz. Kao dodatni pokazatelj statističke značajnosti promjene koristi se i „nominal p-value“ (NOM p-value).

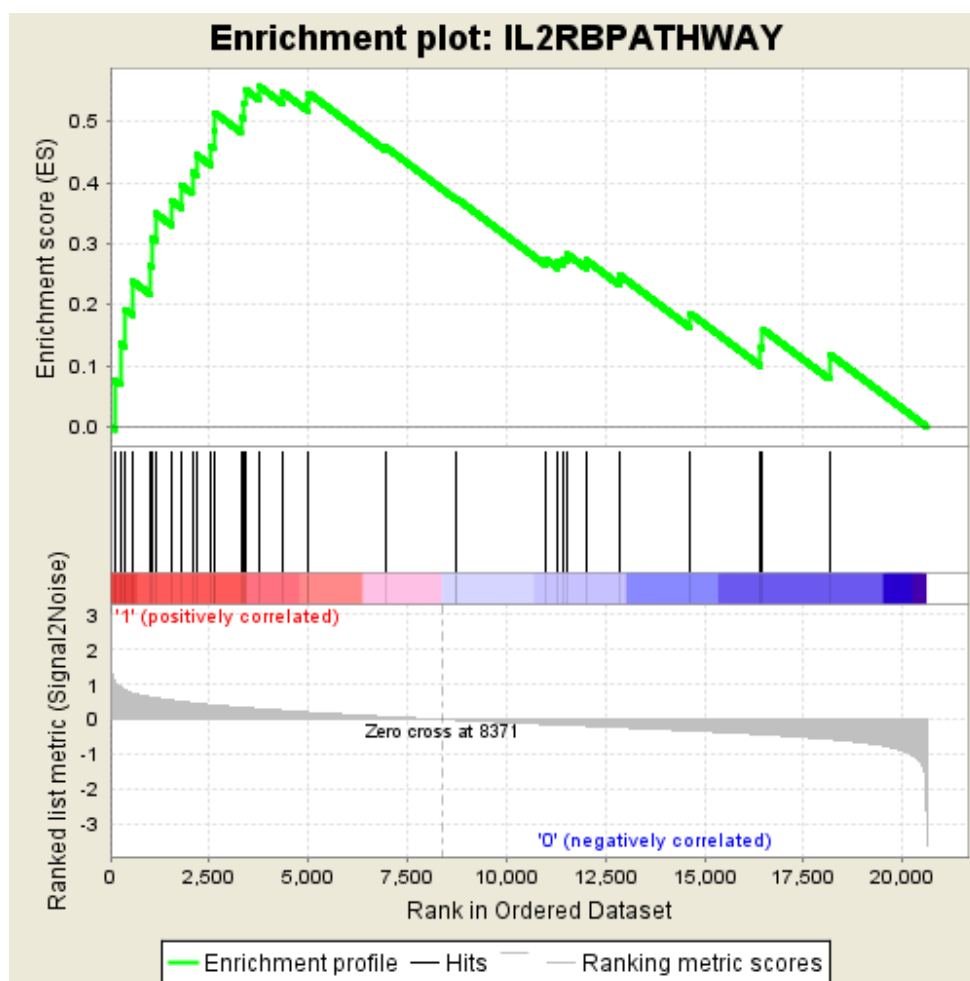
Ukupan broj obogaćenih putova u uzorcima bolesnika s MS-om bio je 534, od čega su 4 funkcionalne skupine gena bile statistički značajno obogaćene s $FDR < 0.25$, a 45 funkcionalna skupina gena s nominalnom p vrijednošću < 0.05 . Ukupan broj funkcionalnih skupina s vrijednošću NES većom od 1 u skupini bolesnika s MS-om iznosio je 240. U uzorcima zdravih pojedinaca broj aktivnih putova iznosio je 913, od čega je 113 bilo statistički značajno aktivirano s nominalnom $p < 0.05$. U skupini zdravih pojedinaca ukupan broj funkcionalnih skupina s vrijednošću normaliziranog skora obogaćenja (normalized enrichment score – NES) većom od 1 iznosio je 486.

GSEA analizom je pronađeno 5 genskih skupina koje su bile značajno povezane sa skupinom bolesnika s optičkim neuritisom. Genska skupina sa najznačajnijom povezanosti je interleukin 7 (IL7 put) (slika 9). Ovaj rezultat je posebno interesantan u svjetlu nalaza da polimorfizam IL7RA nosi povišen rizik od MS-a.



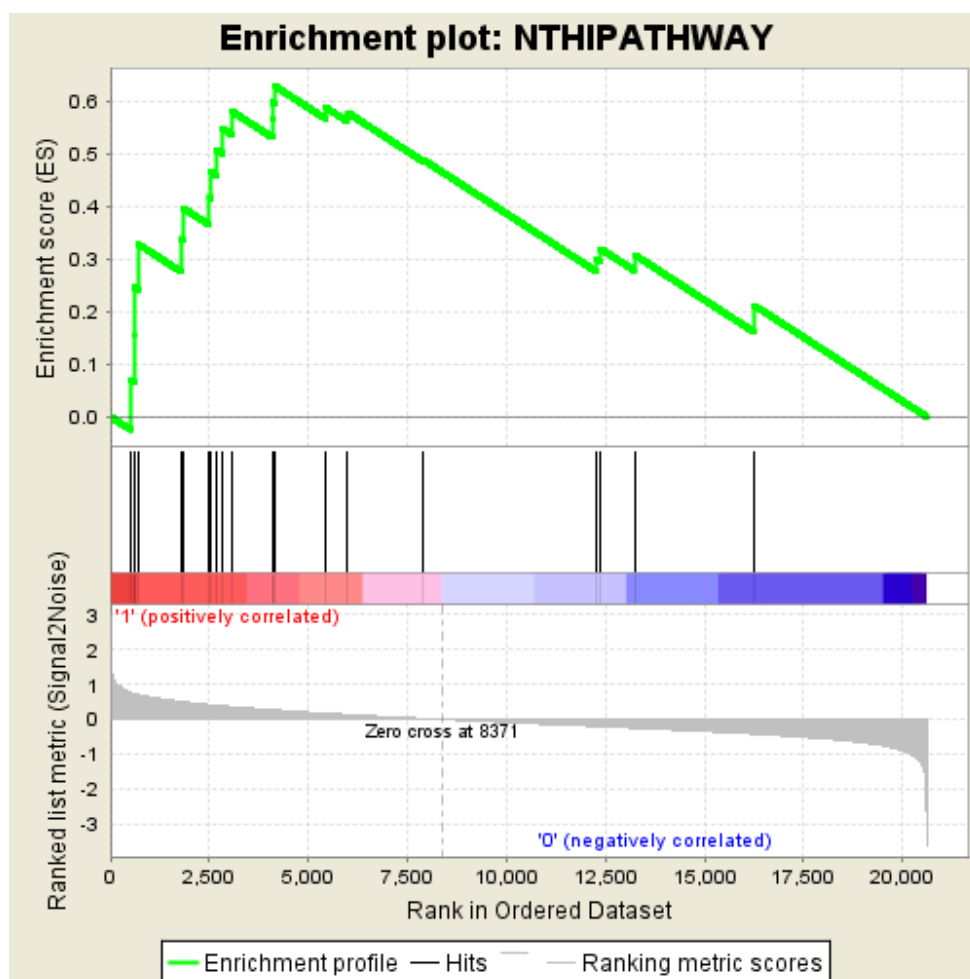
Slika 9. GSEA za IL7 put.

Drugi zanimljiv put za koji je GSEA pokazala značajnost u bolesnika s optičkim neuritisom je za interleukin 2 receptor beta (IL2RB) put. Zanimljivo je da se u ovoj skupini gena nalaze IL7 i IL7R za koje se od ranije zna da imaju važnu ulogu u MS-u (slika 10).



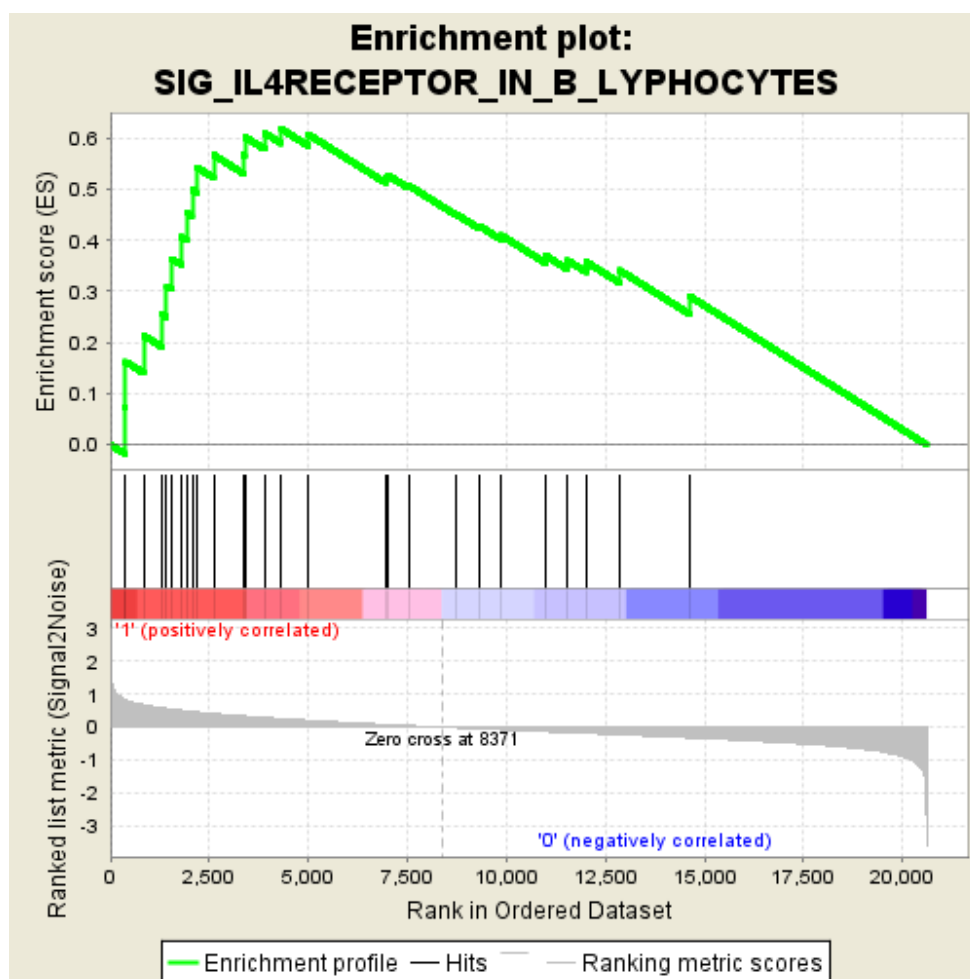
Slika 10. GSEA za IL2RB.

U putu imunog odgovora koji za koji je također nađena povezanost s bolesnicima koji boluju od optičkog neuritisa nalazi se IL2RA, koji je također jedan od poznatih nositelja rizika od MS-a (slika 11).

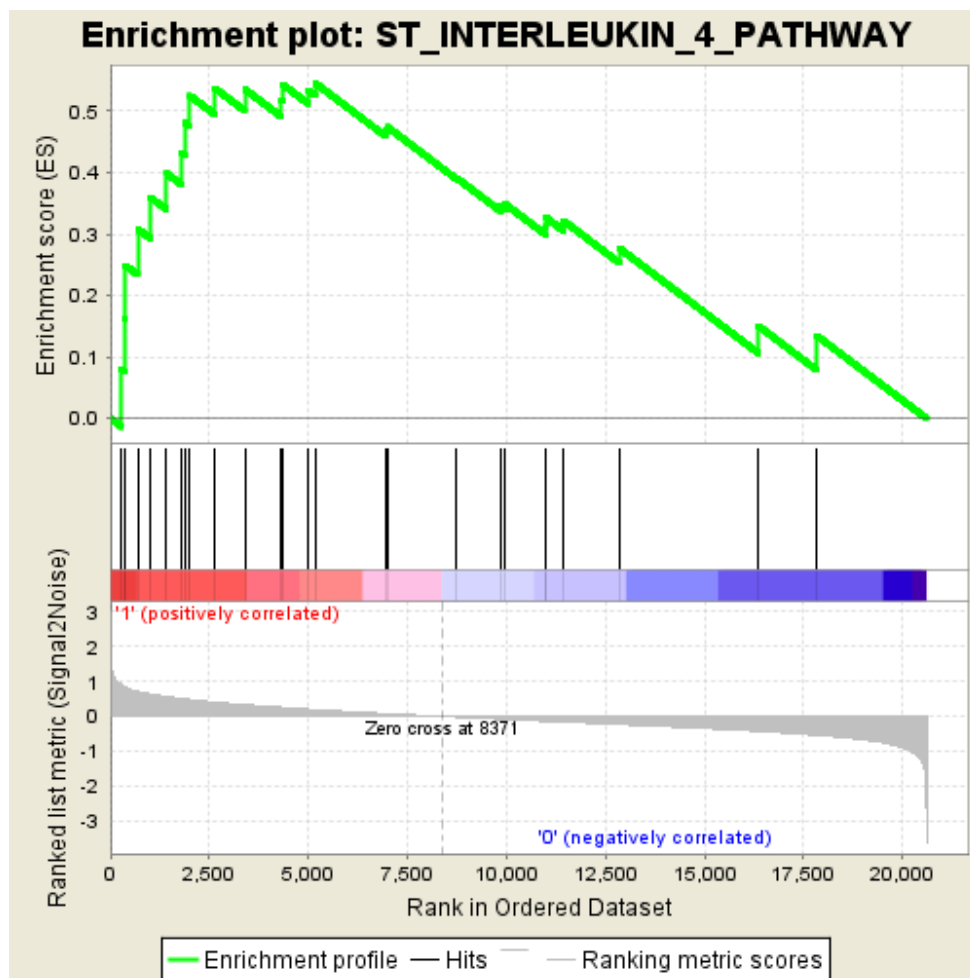


Slika 11. GSEA za put imunog odgovora.

Također je pronađeno da interleukin 4 (IL4) i interleukin 4 receptor (IL4R) putevi imaju važnu ulogu bolesnika s optičkim neuritidom (slike 12 i 13).



Slika 12. GSAE za IL4R.



Slika 13. GSEA za IL4.

Važno je za naglasiti da je većina statistički značajno obogaćeni signalnih puteva i funkcioanlnih skupina gena u bolesnika s optičkim neuritisom vezana uz dva gena koji su otkriveni kao ključni geni koji nose povišen rizik od MS-a: IL2R I IL7R. Uloga IL2R je ključna u funkcioniranju T regulatornih stanica, dok je funkcija IL7R neophodna u normalnom funkcioniranju T stanica, ali i B stanica. Upravo iz ovih rezultata vidljivo je da je u patogenezi MS-a, B stanice također igraju važnu ulogu. Također GSEA je pokazala vrlo važnu ulogu IL4 puta koji je glavni protu-upalni citokin unutar središnjeg živčanog sustava.

6. RASPRAVA

6.1. Rezultati analize ukupne genske ekspresije u krvi bolesnika s optičkim neuritisom

Ovo je prvo istraživanje ukupne genske ekspresije u krvi bolesnika s optičkim neuritisom.

Analiza genske ekspresije ukupnog genoma je pokazala da je ekspresija mnogih gena različita između bolesnika s optičkim neuritisom i zdravih ispitanika. Ukupno je nađeno 722 promijenjena gena, od kojih je 377 pokazalo povišenu razinu ekspresije, a 345 smanjenu razinu ekspresije. Sličan broj promijenjenih gena nađen je i u bolesnika s relapsno remitirajućim MS-om. (114) Od ukupno 722 promijenjeno gena, prema statističkoj značajnosti i dosad poznatoj ulozi u multiploj sklerozi, 5 s povišenom razinom ekspresije (PTPRC, SLC11A1, SLPI, NAIP, LPXN) te 4 gena sa sniženom razinom ekspresije (CCR3, ITGA4, CD28, SLAMF7) je izabrano kao potencijalni biomarkeri.

Protein tirozin fosfataze (PTP) su skupina signalnih medijatora koje igraju važnu regulatornu ulogu u imunološkim stanicama. PTPRC je pretežno eksprimirana u svim nukleiranim hematopoetskim stanicama te sadrži visoko glikolizirani ekstracelularni dio i jednu transmembransku domenu te citoplazmatski dio koji sadrži dvije PTP domene (D1 i D2). (130) PTPRC je posebno izražen na T stanicama, te čini 10% svih površinskih proteina na T stanicama. Što se tiče signaliziranja T staničnog receptora, PTPRC ima pozitivnu ulogu koja uključuje aktivaciju SFK Lck i FynT preko defosforilacije C-kraja tirozinskih rezidua Y505 i Y528. (131) U skladu s ovom funkcijom, bolesnici koji nemaju PTPRC boluju od teške kombinirane imunodeficijencije. (132) U perifernoj krvi ovih bolesnik broj B stanica je normalan, ali je broj T stanica značajno smanjen, te onaj mali broj T stanica koji je preostao ne odgovara na stimulaciju mitogenima.

PTPRC je povezan i s nekoliko autoimunih bolesti. Snip C77G u PTPRC genu je povezan s MS-om. (133) Ova mutacija dovodi do premećaja utišavača egzonskog splicinga za egzon 4 PTPRC gena, što za posljedicu ima visoku razinu egzon 4 kodirane izoforme PTPRC-a u svim staničnim linijama (CD45RA izoforma). Kako se ova izoforma ne dimerizira tako lagano kao CD45RO izoforma, prema modelu autoinhibicije dimerizacijom, bolesnici s C77G mutacijom imaju aberantnu aktivnost PTPCR-a u stanicama koje inače izražavaju CD45RO. Kasnije studije međutim nisu uspjele pokazati povezanost između C77G i MS-a. (134, 135, 136) Međutim čini se da postoji povezanost između C77G mutacije i povišenog rizika za sistemsku sklerozu i autoimuni hepatitis. (137, 138) Međutim, pronađeno je da druga mutacija u PTPRC genu, C59A koja također interferira s alternativnim splicingom nosi određeni povišen rizik od MS-a. (139)

Slijedeći gen koji je identificiran u ovom istraživanju je SLC11A1. Istraživanja su pokazala da ovaj gen regulira priming/aktivaciju makrofaga za mikrobicidnu i tumoricidnu aktivnost. Prema navedenom SLC11A1 ima mnoge pleotropne učinke na funkciju makrofaga, uključujući i ulogu u stvaranju citokina (osobito TNF alfa i interleukina 1b), inducibilne NO sintetaze te prezentaciji klase II kompleksa tkivne kompatibilnosti CD4 stanicama. (140) Sve ove funkcije su od možebitne važnosti u indukciji i/ili održavanju autoimunih bolesti. Opisano je nekoliko polimorfizama u SCA11A1 genu koji utječu na njegovu funkciju. (141) Promotorska regija SLC11A1 gena sadrži polimorfizam unutar mogućeg pojačivača koji sadrži Z-DNA formirajuće dinukeotidno ponavljanje, a nekoliko je alela s različitom ekspresijom SLC11A1 identificirano te povezano s nekoliko autotoimunih bolesti kao što su reumatoidni artritis, juvenilni reumatoidni artritis, Crohnova bolest, tip 1 dijabetes, sarkoidoza i primarna bilijarna ciroza. (142, 143, 144, 145, 146) U jednoj studiji je analiziran polomorfizam SLC11A1 promotora u 104 bolesnika s MS iz Južne Afrike, te je nađeno da alel 5 značajno povezan s MS bolesnicima. (147) Međutim

druga istraživanja nisu našla povezanost između SLC11A1 lokusa i MS-a. (148) Unatoč ovim kontradiktornim rezultatima nedavno je pokazano da je homeostaza željeza upletena i u patogenezu MS-a. Tako je nađeno da je u moždanom tkivu bolesnika s MS-om normalna distribucija transferinskog i feritinskog vezanja poremećena. Feritinskog vezanje je odsutno u samoj leziji i njezinoj neposrednoj okolini, dok se udaljavajući od lezije ono vraća u normalu. (149) Također je nađeno da je razina feritina značajno povišena i u serumu i cerebrospinalnoj tekućini bolesnika s kroničnim, progresivnim oblicima bolesti, što implicira da homeostaza željeza igra ulogu u progresiji MS-a. (150) Nalazi našeg istraživanja govore u prilog da je homeostaza željeza važna i u ranim fazama MS-a.

SLPI je homeostatski protein koji je eksprimiran u epitelnim stanicama, makrofazima i neutrofilima na mukoznim površinama. Upleten je u oporavak od upalnog procesa tako što suprimira aktivnost proteaza atenuirajući urođeni imunološki odgovor i inhibirajući aktivaciju i proliferaciju B stanica. (151, 152) Indukcija SLPI-a u CNS-u je opisana kao posljedica cerebralnog infarkta i ozljede kralježničke moždine. (151, 153) Studija koja je koristila genske mikročipove na EAE modelu MS-a je pokazala da SLPI potiče proliferaciju i diferencijaciju oligodendrocita. (154) Autori ovog rada sugeriraju da SLPI ima više uloga u upali CNS-a: inhibiciju patoloških proteaza, imunomodulaciju i promociju oporavka CNS-a. Također potičući proliferaciju neuralnih zametnih stanica u odraslih i njihovu diferencijaciju prema oligodendroglijalnim stanicama, SLPI može doprinijeti procesima popravka in vivo.

Već je ranije predloženo da u MS-u postoji genetska predispozicija koja kao posljedicu ima nemogućnost autoreaktivnih imunoloških stanica da uđu u apoptozu. (155) Proteini koji reguliraju apoptozu su abnormalno eksprimirani u aktivnim MS lezijama, dok je analiza periferne krvi genskim mikročipovima pokazala da veliki postotak gena koji su zahvaćeni u MS-u

reguliraju apoptozu. (156) Obitelj gena koji inhibiraju apoptozu (IAP) kodiraju proteine koji se direktno vežu i inaktiviraju inicijatorske i efektorne kaspaze, koje su važne za započinjanje i izvršavanje apoptoze, a u njih se ubrajaju X-vezane IAP (XIAP), humane IAP-1 (HIAP-1), humane IAP-2 (HIAP-2) i NAIP. (157) Za razliku od ostalih IAP, NAIP sadrži NACHT domenu koja je povezana s osjetljivošću stanica urođenog imunološkog sustava na patogene. (158) Pokazano je da su u bolesnika s aktivnim MS-om, razine HIAP-1 i HIAP-2 mRNA povišene u mirujućim T stanicama, dok je razina NAIP mRNA povišena u cijeloj krvi, nalaz koji je potvrđen i našim istraživanjem. (159) Rezultati ovog istraživanja su pokazali da obrazac ekspresije inhibitora apoptoze u imunološkim stanicama može poslužiti u razlikovanju podtipova MS-a te nam može dati uvid u mehanizme odgovorne za različite kliničke tijekove MS-a.

Još u uvodu je naglašena uloga B stanica u imunopatogenezi MS-a. Kao posljedica aktivacije B-staničnog antigenskog receptora dolazi do aktivacije signalnih proteina, brojnih drugih glasnika i intermedijarnih proteina koji provode signale, koji zajedno dovode do aktivacije nekoliko ključnih transkripcijskih čimbenika koji reguliraju gensku ekspresiju. (160) Navedeni procesi dovode do proliferacije, sekrecije citokina i diferencijacije ili u memorijske B stanice ili u plazma stanice koje stvaraju citokine. Nekoliko fosfataza, uključujući i ranije spominjanu PTPRC, sudjeluju u defosforilizaciji i deaktivaciji ključnih signala zaslužnih za provođenje u signalnom putu B-staničnog antigenskog receptora. (161) LPXN je pretežno eksprimiran u hematopoetskim stanicama, uključujući i B stanice. (162) Istraživanja su pokazala da LPXN pokazuje inhibitorni učinak na signalni put B-staničnog antigenskog receptora i funkciju B stanica. (163) Kako je poznato da su B stanice klonalno ekspandirane u MS-u, povišena ekspresija LPXN-a može biti zaštitni mehanizam u MS-u.

Mijelinizacija u CNS-u zahtjeva preciznu međuigru između oligodendrocitnih prekursornih stanica i aksona. Prema još nerazjašnjenom mehanizmu, oligodendrocitne prekursorne stanice proliferiraju, migriraju prema aksonima, mijeliniziraju ih te se konačno diferenciraju u zrele oligodendrocite. Nedavno objavljeno istraživanje je pokazalo da primarne oligodendrocitne prekursorne stanice zražavaju CCR3 te da stimulacija odgovarajućim ligandom dovodi do porasta unutarstaničnog kalcija što govori u prilog njihovoj funkcionalnosti. (164) Prema ovom istraživanju CCR3 utječe na proces mijelinizacije što je od opće važnosti za procese remijelinizacije u bolesnika s MS-om. Također je već pokazano da je razina ekspresije CCR3 mRNA snižena u bolesnika s MS-om, te da mjerenje mRNA CCR3 u kombinaciji s IL-1beta, TNF-alpha, TGF-beta, CCL20 razlikuje bolesnike s MS-om od zdravih kontrola. (165) Isto tako CCR3 u kombinaciji s CXCR5 i CCL5 identificira bolesnike s primarno progresivnim MS-om, a TNF-alpha, IL-10, CXCL10 i CCR3 razlikuju bolesnike s relapsno-remitirajućim MS-om. (165) Naše istraživanje je također potvrdilo da snižena vrijednost CCR3 može razlikovati bolesnike s CIS-om od zdravih kontrola.

Suprotno očekivanome, naše istraživanje je pokazalo sniženu vrijednost ekspresije ITGA4. Brojna istraživanja su pokazala povišenu ekspresiju ITGA4 u bolesnika s MS-om u usporedbi s kontrolama te je ekspresija ITGA4 povezana s tipom bolesti i razvoju lezija na MR-u. (166, 167) Također je nekoliko studija pokazalo da liječenje s interferonom dovodi do značajnog smanjenja ekspresije ITGA4. (168) Novija istraživanja su također pokazala da ITGA4 ima skroman učinak na sklonost MS-u. Razlike u rezultatima našeg istraživanja u usporedbi s do sada objavljenim istraživanjima se mogu objasniti što smo uključili bolesnike u vrlo ranoj fazi bolesti.

Drugi gen koji je također pokazao smanjenu ekspresiju kod bolesnika s optičkim neuritisom, a koji je u dosadašnjim istraživanjima u bolesnika s relapsno-remitirajućim oblikom MS-a pokazao

povišenu ekspresiju je CD28. Još od ranije je poznata tzv. „two-signal hypothesis“ prema kojoj su potrebna dva signala za aktivaciju naivnih T stanica. Prvi signal naivne CD4 T stanice primaju od antigen specifičnog T-staničnog receptora koji reagira s antigenskim peptidom koji se prezentira u sklopu MHC II na površini antigen prezentirajućih stanica. Drugi signal dobivaju od kostimulatornih molekula koje se nalaze na aktiviranim antigen prezentirajućim stanicama.

Jedna od kostimulatornih molekula na CD4 T stanicama je upravo CD28 molekula.

Stimulacijom CD28 molekule dolazi do povećanja razine proliferacije i stvaranje citokina, preživljenja stanice, povećane ekspresije CD40 liganda i adhezivskih molekula potrebnih za prelazak krvno moždane barijere kao što je ITGA4. (170, 171) Trenutno je u fazi kliničko ispitivanje abataceptom u MS-u, a ovaj lijek je odobreno za liječenje reumatoidnog artritisa. (172, 173) Iz navedenog je vidljivo da su funkcije ITGA4 i CD28 povezane te je naše istraživanje pokazalo sniženu ekspresiju oba gena u optičkom neuritisu.

Zadnja molekula je SLAMF7 za koju je poznato da regulira citotoksičnost NK stanica, te migraciju i adheziju B stanica. (174, 175) No nedavno je otkrivena i njena uloga u CD8 T stanicama te je moguće da je SLAMF7 upleten u razvoj CD8 T stanične citotoksičnosti. (176)

Može se zaključiti da smo ovim istraživanjem potvrdili od ranije poznate gene koji su upleteni u nastanak MS-a. Od gena s povišenom ekspresijom izdvajaju se PTPRC koji igra vrlo važnu ulogu u funkciji T stanica; CLSC11A1 koji igra važnu ulogu u homeostazi željeza, ali i funkciji makrofaga i stvaranju citokina; SLPI koji atenuira urođeni imunološki odgovor i inhibira aktivaciju B stanica; NAIP-a koji je vrlo važan gen koji inhibira apoptozu; te LPXN koji je važan u funkcioniranju B stanica. Od gena sa sniženom ekspresijom izdvajaju se CCR3 koji je jedan od ključnih gena mijelinizacije te SLAMF7 za kojega još do sada nije pokazana uloga u patogenezi MS-a. Također je nađena snižena ekspresija ITGA4 i CD28 koji su inače povišeni u

relapsno remitirajućem obliku MS-a, što može značiti da oni zapravo sudjeluju u progresiji oštećenja.

6.2. Rezultati analize genske ontologije

Kao što je već i ranije rečeno svrha je genske ontologije da omogući što bolju analizu i uvid u generalne biološke mehanizme u koje su pojedini geni uključeni, te omogući istraživački pristup na razini sustavne biologije. Analiza genske ontologije u skupini gena sa statistički značajno povišenom ekspresijom u bolesnika s MS, pokazala je značajnu zadržanost pojmova za fosforilirane proteine, proteinsko vezivanje, alternativni splicing, posttranslacijsku modifikaciju, staničnu smrt i programiranu staničnu smrt. U skupini gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS, funkcionalno klasteriranje pokazalo je 3 skupine ontološki pojmova s faktorom obogaćenja većim od 2. U prvoj skupini pojmova genske ontologije prevladavali su geni uključeni u proteinsko vezivanje, vezivanje te staničnu jezgru.

Potencijalni autoantigeni u MS-u uključuju MBP, proteolipidni protein i MOG. Smatra se da T stanice ulaze u CNS iz sistemske cirkulacije te da se naknadno reaktiviraju u CNS-u na MHC I i MHC II molekulama koje se nalaze na lokalnim antigen prezentirajućim stanicama. Do sada se nije uspio identificirati HLA vezani peptid koji se nalazi u zdravom tkivu, a koji bi mogao poslužiti kao autoantigen u MS-u. Tek je nedavno jasno pokazano da je MBP auto-antigen u MS-u. (176) Također je pokazano da proteini, koji su već od prije poznati kao biomarkeri za MS, mogu predstavljati auto-antigene. Tako su aktin, gliceraldehid-3-fosfat dehidrogenaza, rani

faktor trudnoće i gelosin identificirani kao mogući proteini na koje se aktiviraju T stanice. (176)

Upravo je aktivacija T pomoćnih stanica potrebna za adaptivni imunološki odgovor na patogene, te njihova brza aktivacija može kao posljedicu imati organ-specifičnu autoimunost, kao što je slučaj u MS-u. Signalni procesi koji nastaju kao posljedica aktivacije T stanica reguliraju različite ishode, kao što je sposobnost T stanica da razlikuju između stranih antigena i autoantigena. (177)

Druga skupina pojmova genske ontologije značajno obogaćena u skupini gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS uključivala je gene uključene u fosforilaciju proteina, metabolizam fosfora, fosforilaciju aminokiselina, aktivnost protein-kinaze, metabolizam proteina, fosforilaciju, serin/treonin kinaze, katalitičku aktivnost i aktivnost transferaza.

Ovi podaci su posebno interesantni jer se smatra da je upravo fosforilacija proteina ključna poveznica između upalne i degenerativne faze bolesti. Već je ranije primjećeno da se rane promjene u neuronalnom kompartmentu događaju u MS-u neovisno o demijelinizaciji. Topivi upalni citokini i glutamat su glavni determinatori neurodegeneracije u MS-u, a istraživanja su pokazala da su glutamatom posredovane ekscitatorne postsinaptičke struje pojačane tijekom ranih faza EAE-a upravo zbog promijenjene ekspresije i fosforilacije AMPA receptora. (179)

Trenutno prevladava mišljenje kako je upalni proces koji je ograničen na CNS u MS-u povezan s oslobađanjem topljivih molekula koje mogu promijeniti ekscitatornu sinaptičku transmisiju te konačno stimulirati sekundarnu neurodegeneraciju u sivoj tvari. Upravo procesi kao što je fosforilacija i metabolizam proteina igraju ključnu ulogu u ovim procesima.

U trećoj skupini ontoloških pojmova značajno povezanih s genima s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS bili su zastupljeni geni uključeni u funkciju citoskeleta, vezanje aktina, organizaciju i biogenezu citoskeleta, dijelove citoskeleta i organele koje nisu vezane za

membranu. I ovaj nalaz govori u prilog ranog aksonalnog oštećenja u MS-u. U cerebrospinalnoj tekućini bolesnika s MS-om u usporedbi sa zdravim ispitanicima i bolesnicima s drugim neurološkim bolestima nađene su više razine tri glavna proteina neuronalnog citoskeleta: aktina, tubulina i L-neurofilamenata. (180) Također je nađena jasna korelacija između kliničkog invaliditeta mjenenog EDSS-om. Što je kraće vrijeme nakon relapsa to su više vrijednosti L-neurofilamenta u cerebrospinalnoj tekućini, što govori da aksonalno oštećenje u MS-u nije u potpunosti neovisno od upalnog procesa. (181)

Što se tiče analize genske ontologije u skupini gena sa sniženom ekspresijom, u prvoj skupini ontoloških pojmova prevladavali su pojmovi povezani s negativnom regulacijom stanične smrti, negativnom regulacijom apoptoze, negativnom regulacijom bioloških procesa, staničnim razvojem, smrću, programiranom smrću i staničnom diferencijacijom. Već je ranije rečeno da u MS-u postoji genetska predispozicija koja kao posljedicu ima nemogućnost autoreaktivnih imunoloških stanica da uđu u apoptozu. (155) Proteini koji reguliraju apoptozu su abnormalno eksprimirani u aktivnim MS lezijama, dok je analiza periferne krvi genskim mikročipovima pokazala da veliki postotak gena koji su zahvaćeni u MS-u reguliraju apoptozu, što je potvrđeno u ovom istraživanju. (156)

Druga skupina pojmova genske ontologije pokazala je značajnu zastupljenost gena povezanih sa staničnim ciklusom, regulacijom staničnog ciklusa, procesima povezanim sa staničnim ciklusom, fazama staničnog ciklusa i regulacijom procesa putem staničnog ciklusa u skupini gena sa sniženom ekspresijom. Važnost regulacije staničnog ciklusa u MS-u je pokazana u studijama koje su koristile proteomiku. (182)

Unutar treće skupine ontoloških pojmova značajno povezanih sa skupinom gena sniženom u bolesnika s MS-om prevladavali su geni povezani s metabolizmom imunoglobulina, podtipovima

imunoglobulina, domenom imunoglobulina, te imunoglobulin V-setom. Važnost imunoglobulina je također već od ranije poznata u MS-u.

Zaključno, analiza genske ontologije pokazala je značajnu zastupljenost pojmova povezanih za proteinsku fosforilaciju i unutarstanični odjeljak u skupini gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS-om, što može ukazivati na pojačanu aktivaciju krvnih stanica i povišenu signalnu aktivnost, budući da se aktivacija receptora i signalnih molekula često vrši upravo putem fosforilacije. Na pojačanu staničnu aktivnost u uzorcima pune krvi bolesnika s MS također ukazuju i značajna zastupljenost pojmova vezanih uz citoskelet i aktin, te proteinsko vezivanje. S druge strane, analiza u skupini gena sa sniženom ekspresijom u bolesnika s MS pokazala je značajnu zastupljenost pojmova vezanih uz inhibiciju apoptoze, stanični ciklus, te proizvodnju imunoglobulina. Ukupni rezultati analize genske ontologije ukazuju na pojačanu aktivnost limfocita u bolesnika s MS, sa posljedičnom pojačanom reaktivnošću i povišenim unutarstaničnim signaliziranjem. S obzirom da je u analizi vidljiva smanjena zastupljenost gena povezanih sa produkcijom imunoglobulina, za pretpostaviti je da se radi poglavito o aktivaciji T limfocita.

6.3. Rezultati GSEA

GSEA je pokazala da su dva puta, IL7 put i IL2R put jedni od glavnih u patogenezi MS-a. Ovi rezultati ne iznenađuju s obzirom na poznatu povezanost MS-a s markerima na IL7R na kromosomu 5p13 i IL2 RA na kromosomu 10p15. Ova povezanost je obilježena s relativno

malim omjerom vjerojatnosti, zbog čega je i bilo potrebno učiniti istraživanja na jako velikom broju ispitanika. (183) Također je pokazano da je IL2RA lokus povezan sa sistemskim lupusom i ANCA povezanim sistemskim vaskulitisom. (184) Nađeno je da koncentracija IL2RA korelira s rs11594656 genotipom i u sistemskom lupusu i ANCA pozitivnom vaskulitisu. (184) Povezanost IL2RA lokusa s različitim autoimunim bolestima sugerira na IL2RA put igra važnu, ali još uvijek nedefiniranu ulogu u svakoj od navedenih bolesti. Poremećaj IL2R signalnog puta pomoću genetskih defekata u genu za IL2 ili komponenti IL2R kompleksa rezultira u teškoj, T-stanicama vezanoj autoimunosti, što ukazuje na ključnu ulogu IL2R signalizacije u funkciji i razvoju T regulatornih stanica. (185)

Interleukin 7 je potreban za stvaranje i preživljavanje T limfocita. Nakon što T stanice izađu iz timusa, IL7 je neophodan za njihovo preživljavanje te dostupnost IL7 ograničava broj T stanica. (186) Putevi koji proizlaze iz djelovanja IL7R uključuju Jak1/3-STAT5 put, PI3 kinaza put, src obitelj kinaza i drugi. (185) Povlačenje IL7 inducira apoptotičku smrt stanica. (185). IL7 također igra važnu ulogu u razvoju B stanica uključujući preživljavanje, proliferaciju i sazrijevanje. (186)

S druge GSEA je pokazala čak dva puta vezana uz IL4. Regulacija upale CNS-a je neophodna kako bi se spriječilo nepovratno oštećenje stanica koje se događa u neurodegenerativnoj fazi MS-a. Studije na EAE su pokazale da je stvaranje IL4 unutar središnjeg živčanog sustava neophodno za kontroliranje autoimune upale unutar središnjeg živčanog sustava. (187) Nadalje dostavljanje protu-upalnih citokina kao što je IL4 unutar središnjeg živčanog sustava je obećavajuća genska terapija MS-a. (188)

Zaključno se može reći kako je GSEA analiza pokazala ključnu ulogu puteva vezanih uz regulaciju funkcije T i B stanica, ali i puteve vezane uz protu-upalne procese unutar središnjeg živčanog sustava.

7. ZAKLJUČCI

Primjenom genomske analize ekspresijskog profila pune krvi u bolesnika s klinički izoliranim sindromom – optičkim neuritisom, odredili smo diferencijalno ekspresirane gene koji mogu poslužiti kao potencijalni genski marker multiple skleroze.

1. Ukupno je nađeno 722 promijenjena gena, od kojih 377 pokazuje povišenu razinu ekspresije, a 345 smanjenu razinu ekspresije u bolesnika s optičkim neuritisom u usporedbi sa zdravim kontrolama.
2. Od ukupno 722 gena ukupno 9 njih je izabrano za potencijalne biomarkere, 5 sa povišenom razinom ekspresije (PTPRC, SLC11A1, SLPI, NAIP, LPXN) te 4 gena sa sniženom razinom ekspresije (CCR3, ITGA4, CD28, SLAMF7).
3. Od gena s povišenom ekspresijom izdvajaju se PTPRC koji igra vrlo važnu ulogu u funkciji T stanica; SLC11A1 koji igra važnu ulogu u homeostazi željeza, ali i funkciji makrofaga i stvaranju citokina; SLPI koji atenuira urođeni imunološki odgovor i inhibira aktivaciju B stanica; NAIP-a koji je vrlo važan gen koji inhibira apoptozu; te LPXN koji je važan u funkcioniranju B stanica. Od gena sa sniženom ekspresijom izdvajaju se CCR3 koji je jedan od ključnih gena mijelinizacije te SLAMF7 za kojega još do sada nije pokazana uloga u patogenezi MS-a.
4. Analiza genske ontologije pokazala je značajnu zastupljenost pojmova povezanih za proteinsku fosforilaciju i unutarstanični odjeljak u skupini gena s povišenom ekspresijom u bolesnika s MS, što može ukazivati na pojačanu aktivaciju krvnih stanica i povišenu signalnu aktivnost, budući da se aktivacija receptora i signalnih molekula često vrši upravo putem fosforilacije. S druge strane, analiza u skupini gena sa sniženom

ekspresijom u bolesnika s MS-om pokazala je značajnu zastupljenost pojmova vezanih uz inhibiciju apoptoze, stanični ciklus, te proizvodnju imunoglobulina.

5. GSEA analiza je pokazala ključnu ulogu puteva vezanih uz regulaciju funkcije T i B stanica, ali i puteve vezane uz protu-upalne procese unutar središnjeg živčanog sustava.

8. SAŽETAK

Uvod: Otkrivanje genskih markera koji mogu predvidjeti razvoj multiple skleroze nakon optičkog neuritisa imalo bi veliku korist u dijagnostičkoj, ali i ranoj terapijskoj intervenciji u bolesnika s multiplom sklerozom. Genskom analizom ekspresijskog profila pune krvi u pacijenata s optičkim neuritisom, klinički izoliranim sindromom, moguće je odrediti diferencijalno eksprimirane gene koji mogu poslužiti kao potencijalni genski markeri za dijagnosticiranje i praćenje razvoja multiple skleroze.

Materijali i metode: U istraživanje je uključeno 15 bolesnika s akutnim optičkim neuritisom i 10 zdravih kontrola. Genska ekspresija analizirana je uporabom DNA čipa za analizu cjelokupnog humanog genoma (Human Genome U133 PLUS 2.0 GeneChip, Affymetrix) koji sadrži 54 675 25-baznih proba. Rezultati odabranih 9 gena potvrđeni su PCR-om. Dodatnu su rezultato obrađeni analizom genske ontologije i GSEA.

Rezultati: Ovo je prvo istraživanje ukupne genske ekspresije u krvi bolesnika s optičkim neuritisom. Ukupno je nađeno 722 promijenjena gena, od kojih je 377 pokazalo povišenu razinu ekspresije, a 345 smanjenu razinu ekspresije. Od ukupno 722 promijenjeno gena, prema statističkoj značajnosti i dosad poznatoj ulozi u multiploj sklerozi, njih 9 izabrano je za potencijalne biomarkere; 5 sa povišenom razinom ekspresije (PTPRC, SLC11A1, SLPI, NAIP, LPXN) te 4 gena sa sniženom razinom ekspresije (CCR3, ITGA4, CD28, SLAMF7). Analizom genske ontologije i GSEA je pokazana važnost proteinske fosforilacije i unutarstaničnog odjeljka, inhibicija apoptoze, gena vezanih uz stanični ciklus te genskih puteva vezanih uz funkciju B i T stanica, kao i interleukina vezanih uz protuupalne procese.

Zaključak: Analizom genske ekspresije pune krvi pokazane su značajne razlike u ekspresijskom profilu bolesnika s optičkim neuritisom u usporedbi sa zdravim kontrolama. Također su

identificirani putevi vezani uz T staničnu regulaciju i protu-upalno djelovanje kao važne čimbenike u ranoj fazi multiple skleroze.

9. SUMMARY

Introduction: Development of gene markers which are able to determine risk for development of MS after optic neuritis, would be of particular importance in early diagnosis and therapeutic intervention in patients with multiple sclerosis. Therefore, our hypothesis was that gene microarray analysis of whole blood samples in patients with acute optic neuritis will determine differentially expressed genes which can serve as potential gene markers for diagnosis and follow-up of multiple sclerosis.

Materials and methods: We included 15 patients with acute optic neuritis and 10 healthy controls. Gene expression was analyzed with DNA microarrays for whole human genome analysis (Human Genome U133 PLUS 2.0 GeneChip, Affymetrix) which contains 54 675 25-base pairs. Results of 9 selected genes were confirmed with PCR. Additional analysis was performed with gene ontology analysis and GSEA.

Results: This is the first study of whole genome expression analysis of whole blood in patients with optic neuritis. Totally 722 genes with different expression were identified, 377 with increased expression and 345 with decreased expression profiles. Based on statistical significance and up to known involvement in MS, from 722 genes, 9 were selected as potential biomarkers, 5 with increased expression (PTPRC, SLC11A1, SLPI, NAIP, LPXN) and 4 with decreased expression (CCR3, ITGA4, CD28, SLAMF7). Gene ontology analysis and GSEA showed that protein phosphorylation and intracellular compartment, apoptosis inhibition, and pathways involved in cell cycles, T- and B-cell functions and anti-inflammatory CNS pathways are implicated in MS pathology.

Conclusion: Gene expression analysis of whole blood showed significant differences in expression profiles of patients with optic neuritis compared with healthy control. As well,

pathways involved in T-cell regulation and anti-inflammatory pathways within CNS are identified as important in early phases of MS.

10. LITERATURA

1. Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2000 Nov 16;343(20):1430-8.
2. Rodriguez M, Siva A, Cross SA, O'Brien PC, Kurland LT. Optic neuritis: a population based study in Olmsted County, Minnesota. *Neurology* 1995;45: 244–250.
3. Shams PN, Plant GT. Optic neuritis: a review. *Int MS J*. 2009 Sep;16(3):82-9.
4. Newman NJ, Lessell S, Winterkorn JM. Optic chiasmal neuritis. *Neurology* 1991;41:1203–1210.
5. de la Cruz J, Kupersmith MJ. Clinical profile of simultaneous bilateral optic neuritis in adults. *Br J Ophthalmol*. 2006;90:551–554.
6. Plant GT. Optic neuritis and multiple sclerosis. *Curr Opin Neurol*. 2008 Feb;21(1):16-21.
7. Kupersmith MJ, Burde RM, Warren FA, Klingele TG, Frohman LP, Mitnick H. Autoimmune optic neuropathy: evaluation and treatment. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1988; 51:1381–1386.
8. Hickman SJ, Ko M, Chaudhry F et al. Optic neuritis: An update typical and atypical optic neuritis. *Neuroophthalmology* 2008; 32: 237–248.
9. Costello F, Coupland S, Hodge W, Lorello GR, Koroluk J, Pan YI, Freedman MS, Zackon DH, Kardon RH. Quantifying axonal loss after optic neuritis with optical coherence tomography. *Ann Neurol* 2006; 59: 963–969.
10. Fisher JB, Jacobs DA, Markowitz CE, Galetta SL, Volpe NJ, Nano-Schiavi ML, Baier ML, Frohman EM, Winslow H, Frohman TC, Calabresi PA, Maguire MG, Cutter GR,

- Balcer LJ. Relation of visual function to retinal nerve fiber layer thickness in multiple sclerosis. *Ophthalmology* 2006;113:324–332.
11. Wu GF, Schwartz ED, Lei T, Souza A, Mishra S, Jacobs DA, Markowitz CE, Galetta SL, Nano-Schiavi ML, Desiderio LM, Cutter GR, Calabresi PA, Udupa JK, Balcer LJ. Relation of vision to global and regional brain MRI in multiple sclerosis. *Neurology* 2007;69:2128–2135.
 12. Balcer LJ, Baier ML, Cohen JA, Kooijmans MF, Sandrock AW, Nano-Schiavi ML, Pfohl DC, Mills M, Bowen J, Ford C, Heidenreich FR, Jacobs DA, Markowitz CE, Stuart WH, Ying GS, Galetta SL, Maguire MG, Cutter GR. Contrast letter acuity as a visual component for the Multiple Sclerosis Functional Composite. *Neurology* 2003;61:1367–1373.
 13. Baier ML, Cutter GR, Rudick RA, Miller D, Cohen JA, Weinstock-Guttman B, Mass M, Balcer LJ. Low-contrast letter acuity testing captures visual dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Neurology* 2005;64:992–995.
 14. Beck RW, Gal RL, Bhatti MT, Brodsky MC, Buckley EG, Chrousos GA, Corbett J, Eggenberger E, Goodwin JA, Katz B, Kaufman DI, Keltner JL, Kupersmith MJ, Miller NR, Moke PS, Nazarian S, Orengo-Nania S, Savino PJ, Shults WT, Smith CH, Trobe JD, Wall M, Xing D; Optic Neuritis Study Group. Visual function more than 10 years after optic neuritis: experience of the optic neuritis treatment trial. *Am J Ophthalmol* 2004;137:77–83.
 15. Ludwin SK. Understanding multiple sclerosis: lessons from pathology. *Ann Neurol* 2000;47:691–693.

16. Wegner C. Pathological differences in acute inflammatory demyelinating diseases of the central nervous system. *Int MS J.* 2005 Apr;12(1):13-9, 12.
17. Hohlfeld R, Wekerle H. Autoimmune concepts of multiple sclerosis as a basis for selective immunotherapy: from pipe dreams to (therapeutic) pipelines. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101(Suppl. 2):14599–14606.
18. Zamvil SS, Steinman L. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 2003;38:685–688.
19. Kirk J, Plumb J, Mirakhor M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol* 2003;201:319–327.
20. Huang D, Han Y, Rani MR, Glabinski A, Trebst C, Sorensen T, Tani M, Wang J, Chien P, Bryan S, Bielecki B, Zhou ZL, Majmuder S, Ransohoff RM. Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. *Immunol Rev* 2000;177:52–67.
21. Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 1997;120:393–399.
22. Prineas JW, Kwon EE, Cho ES, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, Hoffman B, Morgan BP. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:646–657.
23. Allen IV, McKeown S. A histological, histochemical and biochemical study of the macroscopically normal white matter in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 1979;41:81-91

24. Barnard RO, Triggs M. Corpus callosum in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1974;37:1259-1264.
25. Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Aloisi F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2004 Apr;14(2):164-74.
26. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol.* 2000 Jun;47(6):707-17.
27. Pittock SJ, McClelland RL, Achenbach SJ, König F, Bitsch A, Brück W, Lassmann H, Parisi JE, Scheithauer BW, Rodriguez M, Weinshenker BG, Lucchinetti CF. Clinical course, pathological correlations, and outcome of biopsy proved inflammatory demyelinating disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2005 Dec;76(12):1693-7.
28. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol.* 2007 Apr;61(4):288-99.
29. Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors. *Ann Neurol.* 2007 Jun;61(6):504-13.
30. Sadovnick AD, Ebers GC. Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 1995;13:99–118.
31. Kantarci O, Wingerchuk D. Epidemiology and natural history of multiple sclerosis: new insights. *Curr Opin Neurol* 2006;19(3):248–54.
32. Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, et al. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 1998;7(8):1229–34.

33. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, Cree BC, Begovich AB, Villoslada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln RR, DeLoa C, Haines JL, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser SL, Oksenberg JR. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet.* 2006 Sep 15;15(18):2813-24.
34. Chao MJ, Barnardo MC, Lincoln MR, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dymment DA, Montpetit A, Sadovnick AD, Knight JC, Ebers GC. HLA class I alleles tag HLA-DRB1*1501 haplotypes for differential risk in multiple sclerosis susceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 2;105(35):13069-74.
35. Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, Fenoglio C, Ban M, Taylor CJ, Goodman RS, Walsh E, Wolfish CS, Horton R, Traherne J, Beck S, Trowsdale J, Caillier SJ, Ivinson AJ, Green T, Pobywajlo S, Lander ES, Pericak-Vance MA, Haines JL, Daly MJ, Oksenberg JR, Hauser SL, Compston A, Hafler DA, Rioux JD, Sawcer S. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2007 Mar;61(3):228-36.
36. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med.* 2007 Aug 30;357(9):851-62.
37. Oksenberg JR, Baranzini SE, Sawcer S, Hauser SL. The genetics of multiple sclerosis: SNPs to pathways to pathogenesis. *Nat Rev Genet* 2008;9(7):516–26.

38. Australia and New Zealand Multiple Sclerosis Genetics Consortium (ANZgene). Genome-wide association study identifies new multiple sclerosis susceptibility loci on chromosomes 12 and 20. *Nat Genet.* 2009 Jul;41(7):824-8.
39. De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, Piccio L, Raychaudhuri S, Tran D, Aubin C, Briskin R, Romano S; International MS Genetics Consortium, Baranzini SE, McCauley JL, Pericak-Vance MA, Haines JL, Gibson RA, Naeglin Y, Uitdehaag B, Matthews PM, Kappos L, Polman C, McArdle WL, Strachan DP, Evans D, Cross AH, Daly MJ, Compston A, Sawcer SJ, Weiner HL, Hauser SL, Hafler DA, Oksenberg JR. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *Nat Genet.* 2009 Jul;41(7):776-82.
40. Hauser MA, Li YJ, Takeuchi S, Walters R, Nouredine M, Maready M, et al. Genomic convergence: identifying candidate genes for Parkinson's disease by combining serial analysis of gene expression and genetic linkage. *Hum Mol Genet* 2003;12(6):671-7.
41. De Jager PL, Chibnik LB, Cui J, Reischl J, Lehr S, Simon KC, Aubin C, Bauer D, Heubach JF, Sandbrink R, Tyblova M, Lelkova P; Steering committee of the BENEFIT study; Steering committee of the BEYOND study; Steering committee of the LTF study; Steering committee of the CCR1 study, Havrdova E, Pohl C, Horakova D, Ascherio A, Hafler DA, Karlson EW. Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. *Lancet Neurol.* 2009 Dec;8(12):1111-9.
42. McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *Nat Immunol.* 2007 Sep;8(9):913-9.

43. Wucherpfennig KW, Strominger JL. Molecular mimicry in T-cell mediated autoimmunity—viral peptides activate human T-cell clones specific for myelin basic-protein. *Cell* 1995;80(5):695–705.
44. Lehmann PV, Forsthuber T, Miller A, Sercarz EE. Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature*. 1992 Jul 9;358(6382):155-7.
45. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:683–747
46. Ousman SS, Tomooka BH, van Noort JM, Wawrousek EF, O'Connor KC, Hafler DA, Sobel RA, Robinson WH, Steinman L. Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination. *Nature*. 2007 Jul 26;448(7152):474-9.
47. McKenzie BS, Kastelein RA, Cua DJ. Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol*. 2006;27;17–23
48. Gijbels K, Brocke S, Abrams JS, Steinman L. Administration of neutralizing antibodies to interleukin-6 (IL-6) reduces experimental autoimmune encephalomyelitis and is associated with elevated levels of IL-6 bioactivity in central nervous system and circulation. *Mol Med*. 1995;1;795–805
49. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002 May;8(5):500-8.

50. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001;159:809–815
51. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides ‘preferentially’ polarize CD4+ TH-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol.* 2007; 8:172–180
52. Meinl E, Krumbholz M, Hohlfeld R. B-lineage cells in the inflammatory central nervous system environment: migration, maintenance, local antibody production, and therapeutic modulation. *Ann Neurol* 2006;59:880–92.
53. Owens GP, Bennett JL, Gilden DH, Burgoon MP. The B cell response in multiple sclerosis. *Neurol Res* 2006;28:236–44.
54. Franciotta D, Salvetti M, Lolli F, Serafini B, Aloisi F. B cells and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2008 Sep;7(9):852-8.
55. Magliozzi R, Howell O, Vora A, et al. Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* 2007; 130: 1089–104.
56. Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D, Magliozzi R, Reynolds R, Cinque P, Andreoni L, Trivedi P, Salvetti M, Faggioni A, Aloisi F. Dysregulated Epstein–Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J Exp Med* 2007;204: 2899–912.
57. Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, Bar-Or A, Panzara M, Sarkar N, Agarwal S, Langer-Gould A, Smith CH; HERMES Trial Group. B-cell

- depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2008;358:676–88.
58. Bielekova B, Richert N, Howard T, Blevins G, Markovic-Plese S, McCartin J, Frank JA, Würfel J, Ohayon J, Waldmann TA, McFarland HF, Martin R. Humanized anti-CD25 (daclizumab) inhibits disease activity in multiple sclerosis patients failing to respond to interferon beta. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Jun 8;101(23):8705-8.
59. Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*. 2003 Apr;126(Pt 4):770-82.
60. Eriksson M, Andersen O, Runmarker B. Long-term follow up of patients with clinically isolated syndromes, relapsing-remitting and secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2003 Jun;9(3):260-74.
61. Fisniku LK, Brex PA, Altmann DR, Miszkiel KA, Benton CE, Lanyon R, Thompson AJ, Miller DH. Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain*. 2008 Mar;131(Pt 3):808-17.
62. Tintoré M, Rovira A, Rio J, Nos C, Grivé E, Téllez N, Pelayo R, Comabella M, Montalban X. Is optic neuritis more benign than other first attacks in multiple sclerosis? *Ann Neurol*. 2005 Feb;57(2):210-5.
63. Jacobs LD, Kaba SE, Miller CM, Priore RL, Brownschidle CM. Correlation of clinical, magnetic resonance imaging, and cerebrospinal fluid findings in optic neuritis. *Ann Neurol*. 1997 Mar;41(3):392-8.

64. Optic Neuritis Study Group. Multiple sclerosis risk after optic neuritis: final optic neuritis treatment trial follow-up. *Arch Neurol* 2008;65:727-32.
65. Brex PA, Ciccarelli O, O'Riordan JI, Sailer M, Thompson AJ, Miller DH. A longitudinal study of abnormalities on MRI and disability from multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2002 Jan 17;346(3):158-64.
66. Beck RW, Smith CH, Gal RL, Xing D, Bhatti MT, Brodsky MC, Buckley EG, Chrousos GA, Corbett J, Eggenberger E, Goodwin JA, Katz B, Kaufman DI, Keltner JL, Kupersmith MJ, Miller NR, Moke PS, Nazarian S, Orengo-Nania S, Savino PJ, Shults WT, Trobe JD, Wall M; Optic Neuritis Study Group. Neurologic impairment 10 years after optic neuritis. *Arch Neurol*. 2004 Sep;61(9):1386-9.
67. Swanton JK, Fernando KT, Dalton CM, Miszkiel KA, Altmann DR, Plant GT, Thompson AJ, Miller DH. Early MRI in optic neuritis: the risk for disability. *Neurology*. 2009 Feb 10;72(6):542-50.
68. Ghezzi A, Martinelli V, Torri V, Zaffaroni M, Rodegher M, Comi G, Zibetti A, Canal N. Long-term follow-up of isolated optic neuritis: the risk of developing multiple sclerosis, its outcome, and the prognostic role of paraclinical tests. *J Neurol*. 1999 Sep;246(9):770-5.
69. Nilsson P, Larsson EM, Maly-Sundgren P, Perfekt R, Sandberg-Wollheim M. Predicting the outcome of optic neuritis: evaluation of risk factors after 30 years of follow-up. *J Neurol* 2005;252:396-402.
70. Tumani H, Tourtellotte WW, Peter JB, Felgenhauer K. Acute optic neuritis: combined immunological markers and magnetic resonance imaging predict subsequent

- development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. *J Neurol Sci* 1998;155:44-9.
71. Barkhof F, Filippi M, Miller DH, Scheltens P, Campi A, Polman CH, Comi G, Adèr HJ, Losseff N, Valk J. Comparison of MR imaging criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Brain* 1997;120:2059–2069.
 72. Tintoré M, Rovira A, Martínez MJ, Rio J, Díaz-Villoslada P, Brieva L, Borrás C, Grivé E, Capellades J, Montalban X. Isolated demyelinating syndromes: comparison of different MR imaging criteria to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis. *Am J Neuroradiol* 2000;21:702–706.
 73. Korteweg T, Tintoré M, Uitdehaag B, Rovira A, Frederiksen J, Miller D, Fernando K, Filippi M, Agosta F, Rocca M, Fazekas F, Enzinger C, Matthews P, Parry A, Polman C, Montalban X, Barkhof F. MRI criteria for dissemination in space in patients with clinically isolated syndromes: a multicentre follow-up study. *Lancet Neurol*. 2006 Mar;5(3):221-7.
 74. Jacobi C, Hähnel S, Martinez-Torres F, Rieger S, Jüttler E, Heiland S, Jarius S, Meyding-Lamadè U, Storch-Hagenlocher B, Wildemann B. Prospective combined brain and spinal cord MRI in clinically isolated syndromes and possible early multiple sclerosis: impact on dissemination in space and time. *Eur J Neurol*. 2008 Dec;15(12):1359-64.
 75. Korteweg T, Tintore M, Uitdehaag BM, Knol DL, Vrenken H, Rovira A, Frederiksen J, Miller DH, Fernando K, Filippi M, Agosta F, Rocca MA, Fazekas F, Enzinger C, Parry A, Polman CH, Montalban X, Barkhof F. A search for new MRI criteria for

- dissemination in space in subjects with a clinically isolated syndrome. *Eur Radiol.* 2009 Sep;19(9):2244-8.
76. Swanton JK, Fernando KT, Dalton CM, Miszkiel KA, Thompson AJ, Plant GT, Miller DH. Modification of MRI criteria for multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2006; 77: 830–33.
77. Swanton JK, Rovira A, Tintore M, Altmann DR, Barkhof F, Filippi M, Huerga E, Miszkiel KA, Plant GT, Polman C, Rovaris M, Thompson AJ, Montalban X, Miller DH. MRI criteria for multiple sclerosis in patients presenting with clinically isolated syndromes: a multicentre retrospective study. *Lancet Neurol.* 2007 Aug;6(8):677-86.
78. Nielsen JM, Pohl C, Polman CH, Barkhof F, Freedman MS, Edan G, Miller DH, Bauer L, Sandbrink R, Kappos L, Uitdehaag BM. MRI characteristics are predictive for CDMS in monofocal, but not in multifocal patients with a clinically isolated syndrome. *BMC Neurol.* 2009 May 20;9:19.
79. Rovira A, Swanton J, Tintoré M, Huerga E, Barkhof F, Filippi M, Frederiksen JL, Langkilde A, Miszkiel K, Polman C, Rovaris M, Sastre-Garriga J, Miller D, Montalban X. A single, early magnetic resonance imaging study in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol.* 2009 May;66(5):587-92.
80. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, Hauser SL, Pelletier D. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology.* 2009 Mar 3;72(9):800-5.

81. Poser CM, Paty DW, Scheinberg L, McDonald WI, Davis FA, Ebers GC, Johnson KP, Sibley WA, Silberberg DH, Tourtellotte WW. New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols. *Ann Neurol*. 1983 Mar;13(3):227-31.
82. McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinshenker BY, Wolinsky JS. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2001 Jul;50(1):121-7.
83. Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Metz LM, McFarland HF, O'Connor PW, Sandberg-Wollheim M, Thompson AJ, Weinshenker BG, Wolinsky JS. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol*. 2005 Dec;58(6):840-6.
84. Biomarkers Definitions Working Group. Biomarkers and surrogate endpoints: preferred definitions and conceptual framework. *Clin Pharmacol Ther*. 2001 Mar;69(3):89-95.
85. Weiner HL. Multiple sclerosis is an inflammatory T-cell-mediated autoimmune disease. *Arch Neurol*. 2004;61:1613-5.
86. Lutterotti A, Berger T, Reindl M. Biological markers for multiple sclerosis. *Curr Med Chem*. 2007;14(18):1956-65.
87. Bielekova B, Martin R. Development of biomarkers in multiple sclerosis. *Brain*. 2004 Jul;127(Pt 7):1463-78.
88. McFarland HF, Barkhof F, Antel J, Miller DH. The role of MRI as a surrogate outcome measure in multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2002 Feb;8(1):40-51.

89. Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, Sommer N, Hemmer B. Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 2005 May;115(5):1352-60.
90. Bell J. Predicting disease using genomics. *Nature*. 2004;429:453-6.
91. Frank R, Hargreaves R. Clinical biomarkers in drug discovery and development. *Nat Rev Drug Discov*. 2003;2:566-80.
92. Comabella M, Martin R. Genomics in multiple sclerosis--current state and future directions. *J Neuroimmunol*. 2007 Jul;187(1-2):1-8.
93. Duggan DJ, Bittner M, Chen Y, Meltzer P, Trent JM. Expression profiling using cDNA microarrays. *Nat Genet*. 1999 Jan;21(1 Suppl):10-4.
94. Barrett JC, Kawasaki ES. Microarrays: the use of oligonucleotides and cDNA for the analysis of gene expression. *Drug Discov Today*. 2003 Feb 1;8(3):134-41.
95. Whitney LW, Ludwin SK, McFarland HF, Biddison WE. Microarray analysis of gene expression in multiple sclerosis and EAE identifies 5-lipoxygenase as a component of inflammatory lesions. *J Neuroimmunol* 2001;121:40-48.
96. Baechler EC, Batliwalla FM, Karypis G, Gaffney PM, Moser K, Ortmann WA, Espe KJ, Balasubramanian S, Hughes KM, Chan JP, Begovich A, Chang SY, Gregersen PK, Behrens TW. Expression levels for many genes in human peripheral blood cells are highly sensitive to ex vivo incubation. *Genes Immun* 2004;5:347-353.
97. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, Parkinson H, Robinson A, Sarkans U, Schulze-Kremer S,

- Stewart J, Taylor R, Vilo J, Vingron M. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. *Nat Genet.* 2001 Dec;29(4):365-71.
98. Whitney LW, Becker KG, Tresser NJ, Caballero-Ramos CI, Munson PJ, Prabhu VV, Trent JM, McFarland HF, Biddison WE. Analysis of gene expression in multiple sclerosis lesions using cDNA microarrays. *Ann Neurol.* 1999 Sep;46(3):425-8.
99. Bompreszi R, Ringnér M, Kim S, Bittner ML, Khan J, Chen Y, Elkahloun A, Yu A, Bielekova B, Meltzer PS, Martin R, McFarland HF, Trent JM. Gene expression profile in multiple sclerosis patients and healthy controls: identifying pathways relevant to disease. *Hum Mol Genet.* 2003 Sep 1;12(17):2191-9.
100. Mandel M, Gurevich M, Pauzner R, Kaminski N, Achiron A. Autoimmunity gene expression portrait: specific signature that intersects or differentiates between multiple sclerosis and systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol.* 2004 Oct;138(1):164-70.
101. Tajouri L, Mellick AS, Ashton KJ, Tannenberg AE, Nagra RM, Tourtellotte WW, Griffiths LR. Quantitative and qualitative changes in gene expression patterns characterize the activity of plaques in multiple sclerosis. *Brain Res Mol Brain Res.* 2003 Nov 26;119(2):170-83.
102. Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW. Microarray gene expression profiling of chronic active and inactive lesions in multiple sclerosis. *Clin Neurol Neurosurg.* 2004 Jun;106(3):223-9.

103. Mycko MP, Papoian R, Boschert U, Raine CS, Selmaj KW. cDNA microarray analysis in multiple sclerosis lesions: detection of genes associated with disease activity. *Brain*. 2003 May;126(Pt 5):1048-57.
104. Lock C, Hermans G, Pedotti R, Brendolan A, Schadt E, Garren H, Langer-Gould A, Strober S, Cannella B, Allard J, Klonowski P, Austin A, Lad N, Kaminski N, Galli SJ, Oksenberg JR, Raine CS, Heller R, Steinman L. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat Med*. 2002 May;8(5):500-8.
105. Lindberg RL, De Groot CJ, Certa U, Ravid R, Hoffmann F, Kappos L, Leppert D. Multiple sclerosis as a generalized CNS disease--comparative microarray analysis of normal appearing white matter and lesions in secondary progressive MS. *J Neuroimmunol*. 2004 Jul;152(1-2):154-67.
106. Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N. Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain Pathol*. 2003 Oct;13(4):554-73.
107. Dutta R, McDonough J, Yin X, Peterson J, Chang A, Torres T, Gudz T, Macklin WB, Lewis DA, Fox RJ, Rudick R, Mirnics K, Trapp BD. Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006 Mar;59(3):478-89.
108. Cunnea P, McMahon J, O'Connell E, Mashayekhi K, Fitzgerald U, McQuaid S. Gene expression analysis of the microvascular compartment in multiple sclerosis using laser microdissected blood vessels. *Acta Neuropathol*. 2009 Dec 5.

109. Kinter J, Zeis T, Schaeren-Wiemers N. RNA profiling of MS brain tissues. *Int MS J*. 2008 Jun;15(2):51-8.
110. Whitney AR, Diehn M, Popper SJ, Alizadeh AA, Boldrick JC, Relman DA, Brown PO. Individuality and variation in gene expression patterns in human blood. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Feb 18;100(4):1896-901.
111. Radich JP, Mao M, Stepaniants S, Biery M, Castle J, Ward T, Schimmack G, Kobayashi S, Carleton M, Lampe J, Linsley PS. Individual-specific variation of gene expression in peripheral blood leukocytes. *Genomics*. 2004 Jun;83(6):980-8.
112. Goertsches R, Zettl UK. MS therapy research applying genome-wide RNA profiling of peripheral blood. *Int MS J*. 2007 Sep;14(3):98-107.
113. Ramanathan M, Weinstock-Guttman B, Nguyen LT, Badgett D, Miller C, Patrick K, Brownschidle C, Jacobs L. In vivo gene expression revealed by cDNA arrays: the pattern in relapsing-remitting multiple sclerosis patients compared with normal subjects. *J Neuroimmunol*. 2001 Jun 1;116(2):213-9.
114. Achiron A, Gurevich M, Friedman N, Kaminski N, Mandel M. Blood transcriptional signatures of multiple sclerosis: unique gene expression of disease activity. *Ann Neurol*. 2004 Mar;55(3):410-7.
115. Wandinger KP, Stürzebecher CS, Bielekova B, Detore G, Rosenwald A, Staudt LM, McFarland HF, Martin R. Complex immunomodulatory effects of interferon-beta in multiple sclerosis include the upregulation of T helper 1-associated marker genes. *Ann Neurol*. 2001 Sep;50(3):349-57.

116. Koike F, Satoh J, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies interferon beta-regulated genes in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* 2003 Jun;139(1-2):109-18.
117. Stürzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain.* 2003 Jun;126(Pt 6):1419-29.
118. Weinstock-Guttman B, Badgett D, Patrick K, Hartrich L, Santos R, Hall D, Baier M, Feichter J, Ramanathan M. Genomic effects of IFN-beta in multiple sclerosis patients. *J Immunol.* 2003 Sep 1;171(5):2694-702.
119. Serrano-Fernández P, Möller S, Goertsches R, Fiedler H, Koczan D, Thiesen HJ, Zettl UK. Time course transcriptomics of IFNB1b drug therapy in multiple sclerosis. *Autoimmunity.* 2009 Nov 3. [Epub ahead of print]
120. Scofield RH. Autoantibodies as predictors of disease. *Lancet.* 2004 May 8;363(9420):1544-6.
121. Quintana FJ, Farez MF, Weiner HL. Systems biology approaches for the study of multiple sclerosis. *J Cell Mol Med.* 2008 Aug;12(4):1087-93.
122. Han MH, Hwang SI, Roy DB, Lundgren DH, Price JV, Ousman SS, Fernald GH, Gerlitz B, Robinson WH, Baranzini SE, Grinnell BW, Raine CS, Sobel RA, Han DK, Steinman L. Proteomic analysis of active multiple sclerosis lesions reveals therapeutic targets. *Nature.* 2008;451:1076–81.

123. Robinson WH, Fontoura P, Lee BJ, de Vegvar HE, Tom J, Pedotti R, DiGennaro CD, Mitchell DJ, Fong D, Ho PP, Ruiz PJ, Maverakis E, Stevens DB, Bernard CC, Martin R, Kuchroo VK, van Noort JM, Genain CP, Amor S, Olsson T, Utz PJ, Garren H, Steinman L. Protein microarrays guide tolerizing DNA vaccine treatment of autoimmune encephalomyelitis. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 1033–9.
124. Quintana FJ, Farez MF, Viglietta V, Iglesias AH, Merbl Y, Izquierdo G, Lucas M, Basso AS, Khoury SJ, Lucchinetti CF, Cohen IR, Weiner HL. Antigen microarrays identify unique serum autoantibody signatures in clinical and pathologic subtypes of multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Dec 2;105(48):18889-94.
125. Quintana FJ, Hagedorn PH, Elizur G, Merbl Y, Domany E, Cohen IR. Functional immunomics: microarray analysis of IgG autoantibody repertoires predicts the future response of mice to induced diabetes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 Suppl 2: 14615–21.
126. Smith KJ, Lassmann H. The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 2002; 1: 232–41.
127. Adalsteinsson E, Langer-Gould A, Homer RJ, Rao A, Sullivan EV, Lima CA, Pfefferbaum A, Atlas SW. Gray matter N-acetyl aspartate deficits in secondary progressive but not relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol.* 2003;24:1941–5.
128. Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron.* 2006;52:61–76.
129. www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/

130. Hermiston ML, Xu Z, Weiss A. CD45: a critical regulator of signaling thresholds in immune cells. *Annu. Rev. Immunol.* 2003;21:107–37.
131. Mustelin T, Vang T, Bottini N. Protein tyrosine phosphatases and the immune response. *Nat. Rev. Immunol.* 2005;5:43–57.
132. Kung C, Pingel JT, Heikinheimo M, Klemola T, Varkila K, et al. Mutations in the tyrosine phosphatase CD45 gene in a child with severe combined immunodeficiency disease. *Nat Med.* 2000;6:343–45.
133. Jacobsen M, Schweer D, Ziegler A, Gaber R, Schock S, et al. A point mutation in PTPRC is associated with the development of multiple sclerosis. *Nat. Gene* 2000;26:495–99.
134. Barcellos LF, Caillier S, Dragone L, Elder M, Vittinghoff E, et al. *PTPRC* (*CD45*) is not associated with the development of multiple sclerosis in U.S. patients. *Nat. Genet* 2001;29:23–24.
135. Vorechovsky I, Kralovicova J, Tchilian E, Masterman T, Zhang Z, et al. Does 77C→G in *PTPRC* modify autoimmune disorders linked to the major histocompatibility locus? *Nat. Genet.* 2001;29:22–23.
136. Szvetko AL, Jones A, Mackenzie J, Tajouri L, Csurhes PA, Greer JM, Pender MP, Griffiths LR. An investigation of the C77G and C772T variations within the human protein tyrosine phosphatase receptor type C gene for association with multiple sclerosis in an Australian population. *Brain Res.* 2009;1255:148-52.
137. Schwinzer R, Witte T, Hundrieser J, Ehlers S, Momot T, et al. Enhanced frequency of a PTPRC (*CD45*) exon A mutation (77C→G) in systemic sclerosis. *Genes Immun* 2003;4:168–69.

138. Vogel A, Strassburg CP, Manns MP. 77 C/G mutation in the tyrosine phosphatase CD45 gene and autoimmune hepatitis: evidence for a genetic link. *Genes Immun* 2003;4:79–81.
139. Jacobsen M, Hoffmann S, Cepok S, Stei S, Ziegler A, et al. A novel mutation in PTPRC interferes with splicing and alters the structure of the human CD45 molecule. *Immunogenetics* 2002;54:158–63.
140. Blackwell JM. Structure and function of the natural-resistance-associated macrophage protein (SLC11A1), a candidate protein for infectious and autoimmune disease susceptibility. *Mol Med Today* 1996;2:205-11.
141. Liu J, Fujiwara TM, Buu NT, Sanchez FO, Cellier M, Paradis AJ et al . Identification of polymorphisms and sequence variants in the human homologue of the mouse natural resistance-associated macrophage protein gene. *Am J Hum Genet* 1995;56:845-53.
142. Searle S, Blackwell JM. Evidence for a functional repeat polymorphism in the promoter of the human SLC11A1 gene that correlates with autoimmune versus infectious disease susceptibility. *J Med Genet* 1999;36:295-99.
143. Hofmeister A, Neibergs HL, Pokorny RM, Galandiuk S. The natural resistance-associated macrophage protein gene is associated with Crohn's disease. *Surgery* 1997;122:173-79.
144. Graham AM, Dollinger MM, Howie SEM, Harrison DJ. Identification of novel alleles at a polymorphic microsatellite repeat region in the human SLC11A1 gene promoter: analysis of allele frequencies in primary biliary cirrhosis. *J Med Genet* 2000;37:150-52.

145. Bassuny WM, Ihara K, Matsuura N, Ahmed S, Kohno H, Kuromaru R et al . Association study of the SLC11A1 gene promoter polymorphism and early-onset type 1 diabetes. *Immunogenetics* 2002;54:282-85.
146. Maliarik MJ, Chen KM, Sheffer RG, Rybicki BA, Major ML, Popovich J Jr et al . The natural resistance-associated macrophage protein gene in African Americans with sarcoidosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2002;22:672-75.
147. Kotze MJ, de Villiers JNP, Rooney RN, Grobbelaar JJ, Mansvelt EP, Bouwens CS et al . Analysis of the SLC11A1 gene implicated in iron transport: association with multiple sclerosis and age effects. *Blood Cells Mol Dis* 2001;27:44-53.
148. Comabella M, Altet L, Peris F, Villoslada P, Sánchez A, Montalban X. Genetic analysis of SLC11A1 polymorphisms in multiple sclerosis patients. *Mult Scler.* 2004;10(6):618-20.
149. Hulet SW, Powers S, Connor JR. Distribution of transferrin and ferritin binding in normal and multiple sclerotic human brains. *J Neurol Sci* 1999;165:48–55.
150. Sfagos C, Makis AC, Chaidos A, et al. Serum ferritin, transferrin and soluble transferrin receptor levels in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2005;11:272–5.
151. Wang X, Li X, Xu L, Zhan Y, Yaish-Ohad S, Erhardt JA, Barone FC, Feuerstein GZ: Up-regulation of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in the brain after ischemic stroke: adenoviral expression of SLPI protects brain from ischemic injury. *Mol Pharmacol* 2003;64:833-840.

152. Xu W, He B, Chiu A, Chadburn A, Shan M, Buldys M, Ding A, Knowles DM, Santini PA, Cerutti A: Epithelial cells trigger frontline immunoglobulin class switching through a pathway regulated by the inhibitor SLPI. *Nat Immunol* 2007;8:294-303.
153. Urso ML, Chen YW, Scrimgeour AG, Lee PC, Lee KF, Clarkson PM: Alterations in mRNA expression and protein products following spinal cord injury in humans. *J Physiol* 2007;579:877-892.
154. Mueller AM, Pedré X, Stempf T, Kleiter I, Couillard-Despres S, Aigner L, Giegerich G, Steinbrecher A. Novel role for SLPI in MOG-induced EAE revealed by spinal cord expression analysis. *J Neuroinflammation*. 2008;5:20.
155. Pender MP. Genetically determined failure of activation induced apoptosis of autoreactive T cells as a cause of Multiple sclerosis. *Lancet* 1998;351:978-981.
156. Satoh J, Nakanishi M, Koike F, Miyake S, Yamamoto T, Kawai M, Kikuchi S, Nomura K, Yokoyama K, Ota K, Kanda T, Fukazawa T, Yamamura T. Microarray analysis identifies an aberrant expression of apoptosis and DNA damage- regulatory genes in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2005;18:537-550.
157. Salvesen GS, Duckett CS. IAP proteins: blocking the road to death's door. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2002;3:401-410.
158. Damiano JS, Newman RM, Reed JC. Multiple roles of CLAN (caspase-associated recruitment domain, leucine-rich repeat, and NAIP CH1A HET-E, and TP1-containing protein) in the mammalian innate immune response. *J Immunol* 2004;173:6338-6345.
159. Hebb AL, Moore CS, Bhan V, Campbell T, Fisk JD, Robertson HA, Thorne M, Lacasse E, Holcik M, Gillard J, Crocker SJ, Robertson GS. Expression of the inhibitor of

- apoptosis protein family in multiple sclerosis reveals a potential immunomodulatory role during autoimmune mediated demyelination. *Mult Scler*. 2008;14:577-94.
160. Tsubata T, Wienands J. B cell signaling. Introduction. *Int Rev Immunol*. 2001;20(6):675-8.
161. Plas DR, Thomas ML. Negative regulation of antigen receptor signaling in lymphocytes. *J Mol Med*. 1998 Jul;76(8):589-95.
162. Lipsky BP, Beals CR, Staunton DE. Leupaxin is a novel LIM domain protein that forms a complex with PYK2. *J Biol Chem*. 1998 May 8;273(19):11709-13.
163. Chew V, Lam KP. Leupaxin negatively regulates B cell receptor signaling. *J Biol Chem*. 2007 Sep 14;282(37):27181-91.
164. Maysami S, Nguyen D, Zobel F, Heine S, Höpfner M, Stangel M. Oligodendrocyte precursor cells express a functional chemokine receptor CCR3: implications for myelination. *J Neuroimmunol*. 2006 Sep;178(1-2):17-23.
165. Furlan R, Rovaris M, Martinelli Boneschi F, Khademi M, Bergami A, Gironi M, Deleidi M, Agosta F, Franciotta D, Scarpini E, Uccelli A, Zaffaroni M, Kurne A, Comi G, Olsson T, Filippi M, Martino G. Immunological patterns identifying disease course and evolution in multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2005 Aug;165(1-2):192-200.
166. Iglesias AH, Camelo S, Hwang D, Villanueva R, Stephanopoulos G, Dangond F. Microarray detection of E2F pathway activation and other targets in multiple sclerosis peripheral blood mononuclear cells. *J Neuroimmunol*. 2004 May;150(1-2):163-77.
167. Eikelenboom MJ, Killestein J, Izeboud T, Kalkers NF, Baars PA, van Lier RA, Barkhof F, Uitdehaag BM, Polman CH. Expression of adhesion molecules on peripheral

- lymphocytes predicts future lesion development in MS. *J Neuroimmunol*. 2005 Jan;158(1-2):222-30.
168. Hong J, Zang YC, Hutton G, Rivera VM, Zhang JZ. Gene expression profiling of relevant biomarkers for treatment evaluation in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2004 Jul;152(1-2):126-39.
169. O'Doherty C, Roos IM, Antiguada A, Aransay AM, Hillert J, Vandebroek K. ITGA4 polymorphisms and susceptibility to multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2007 Sep;189(1-2):151-7.
170. Harding FA, McArthur J, Gross JA, Raulet D, Allison JP. CD28 mediated signalling costimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T cell clones. *Nature* 1992;356:607–609.
171. Norton SD, Zuckerman L, Urdahl KB, Shefner R, Miller J, Jenkins MK. The CD28 ligand, B7, enhances IL-2 production by providing a costimulatory signal to T cells. *J Immunol* 1992;149:1556–1561.
172. Buch MH, Vital EM, Emery P. Abatacept in the treatment of rheumatoid arthritis. *Arthritis Res Ther* 2008;10(Suppl 1):S5.
173. Viglietta V, et al. CTLA4Ig treatment in patients with multiple sclerosis: an openlabel, phase 1 clinical trial. *Neurology* 2008;71:917–924.
174. Lee JK, Boles KS, Mathew PA. Molecular and functional characterization of a CS1 (CRACC) splice variant expressed in human NK cells that does not contain immunoreceptor tyrosine-based switch motifs. *Eur J Immunol* 2004, 34(10):2791-2799.

175. Lee JK, Mathew SO, Vaidya SV, Kumaresan PR, Mathew PA. CS1 (CRACC, CD319) induces proliferation and autocrine cytokine expression on human B lymphocytes. *J Immunol* 2007, 179(7):4672-4678.
176. Wang M, Windgassen D, Papoutsakis ET. Comparative analysis of transcriptional profiling of CD3+, CD4+ and CD8+ T cells identifies novel immune response players in T-cell activation. *BMC Genomics*. 2008 May 16;9:225.
177. Wylie DC, Das J, Chakraborty AK. Sensitivity of T cells to antigen and antagonism emerges from differential regulation of the same molecular signaling module. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Mar 27;104(13):5533-8.
178. Fissolo N, Haag S, de Graaf KL, Drews O, Stevanovic S, Rammensee HG, Weissert R. Naturally presented peptides on major histocompatibility complex I and II molecules eluted from central nervous system of multiple sclerosis patients. *Mol Cell Proteomics*. 2009 Sep;8(9):2090-101.
179. Centonze D, Muzio L, Rossi S, Furlan R, Bernardi G, Martino G. The link between inflammation, synaptic transmission and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Cell Death Differ*. 2009 Nov 20.
180. Semra YK, Seidi OA, Sharief MK. Heightened intrathecal release of axonal cytoskeletal proteins in multiple sclerosis is associated with progressive disease and clinical disability. *J Neuroimmunol* 2002;122:132–139.
181. Lycke JN, Karlsson JE, Andersen O, Rosengren LE. Neurofilament protein in cerebrospinal merker of activity in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1998;64:402–404.

182. Alexander JS, Minagar A, Harper M, Robinson-Jackson S, Jennings M, Smith SJ. Proteomic analysis of human cerebral endothelial cells activated by multiple sclerosis serum and IFNbeta-1b. *J Mol Neurosci.* 2007;32(3):169-78.
183. Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics.* 2008 Jun;60(6):275-86.
184. Carr EJ, Clatworthy MR, Lowe CE, Todd JA, Wong A, Vyse TJ, Kamesh L, Watts RA, Lyons PA, Smith KG. Contrasting genetic association of IL2RA with SLE and ANCA-associated vasculitis. *BMC Med Genet.* 2009;10:22.
185. Jiang Q, Li WQ, Aiello FB, Mazzucchelli R, Asefa B, Khaled AR, Durum SK. Cell biology of IL-7, a key lymphotrophin. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2005;16(4-5):513-33.
186. Milne CD, Paige CJ. IL-7: a key regulator of B lymphopoiesis. *Semin Immunol.* 2006 Feb;18(1):20-30.
187. Ponomarev ED, Maresz K, Tan Y, Dittel BN. CNS-derived interleukin-4 is essential for the regulation of autoimmune inflammation and induces a state of alternative activation in microglial cells. *J Neurosci.* 2007 Oct 3;27(40):10714-21.
188. Butti E, Bergami A, Recchia A, Brambilla E, Del Carro U, Amadio S, Cattalini A, Esposito M, Stornaiuolo A, Comi G, Pluchino S, Mavilio F, Martino G, Furlan R. IL4 gene delivery to the CNS recruits regulatory T cells and induces clinical recovery in mouse models of multiple sclerosis. *Gene Ther.* 2008 Apr;15(7):504-15.

11. ŽIVOTOPIS

Mario Habek, rođen je u Slavanskom Brodu 29. studenog 1978. godine gdje je završio osnovnu i srednju školu, nakon čega je, 1997. godine, upisao Medicinski fakultet Sveučilišta u Zagrebu gdje je diplomirao 2003. godine. Obavezni staž, kao liječnik-pripravnik obavio je u Klinici za plućne bolesti Jordanovac, a stručni ispit za liječnike položio je 2004. godine u Ministarstvu zdravstva RH. Nakon toga radio je kao znanstveni novak na Katedri za neurologiju, Medicinskog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu. Specijalizaciju iz neurologije započeo je 08. veljače 2005. godine u Klinici za neurologiju KBC Zagreb, a specijalslitički ispit iz položio je 09. veljače 2009. godine pred komisijom Ministarstva zdravstva i socijalne skrbi. Od 03. travnja 2009. godine zaposlen je u kumulativnom radnom odnosu na Klinici za neurologiju KBC-a i Katedri za neurologiju Medicinskog fakulteta. Sudjeluje kao istraživač na projektu „Molekularne i biološke osnove demijelinizacijskih bolesti živčanog sustava“, voditeljice prof.dr.sc. Vesne Brinar.

U svrhu znanstvene i stručne edukacije pristupnik je aktivno sudjelovao na brojnim domaćim i međunarodnim skupovima, završio je stručni poslijediplomski studij „Klinička neurologija“, Multiple Sclerosis Preceptorship Program, Tel-Aviv, Izrael 2008. godine i tri godine Poslijediplomskog doktorskog studija „Biomedicina i zdravstvo“.

Objavio je preko 50 radova u časopisima indeksiranim u CC-u, ima preko 80 citata, gost kourednik je specijalnog izdanja međunarodnog časopisa Clinical Neurology and Neurosurgery posvećenom multiploj sklerozi, koautor je nekoliko poglavlja udžbenika iz nuerologije koji je službeni udžbenik Medicinskog fakulteta. Aktivni je reviewer u 9 časopisa indeksiranih u CC-u.