T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

AİLESEL MULTİPLE SKLEROZ HASTALARINDA GENETİK ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ GENETİK UZMANLIK TEZİ

Dr. Gizem Nur İZGİ

TEZ DANIŞMANLARI

Doç. Dr. Esra ARSLAN ATEŞ

Doç. Dr. SİNEM FIRTINA

İstanbul-2024

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ GENETİK ANABİLİM DALI

AİLESEL MULTİPLE SKLEROZ HASTALARINDA GENETİK ETİYOLOJİNİN ARAŞTIRILMASI

TIBBİ GENETİK UZMANLIK TEZİ

Dr. Gizem Nur İZGİ

TEZ DANIŞMANLARI
Doç. Dr. Esra ARSLAN ATEŞ
Doç. Dr. SİNEM FIRTINA

İstanbul-2024

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca beni yönlendirdiği, bilgisini, değerli görüşlerini ve deneyimlerini bana aktardığı için değerli tez danışmanı hocam Doç. Dr. Esra ARSLAN ATEŞ'e, vaktini, hoşgörü, sabır ve emeğini esirgemeyen Doç.Dr. Sinem FIRTINA 'ya, uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve birikimlerini her daim paylaşan Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Mustafa ÖZEN'e, tez çalışmamda yardımlarını eksik etmeyen Prof. Dr. Sema SALTIK'a saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Birçok zorluğu birlikte göğüs gerdiğim, asistanlığım süresince her zaman destekleriyle yanımda olan ve birlikte çalışmaktan gurur duyduğum değerli asistan arkadaşlarıma,

Birlikte çalıştığımız sevgili hemşirelere, özverili laboratuvar ekibimize ve sekreterlerimize

Teşekkür Ederim.

Anneme…

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ..... **i**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **iv**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **vii**

ETİK KURUL ONAYI ..... **viii**

FİNANSAL DESTEK BİLDİRİM ..... **ix**

ÖZET ..... **x**

ABSTRACT ..... **xii**

1. GİRİŞ VE AMAÇ **1**

2. GENEL BİLGİLER **4**

2.1. Multiple Sklerozis Genel Bilgi 5

2.2. Tarihçe 5

2.3. Epidemiyoloji 6

2.4. Tanı 7

2.5. Klinik Seyir 10

2.6. Patolojik Bulgular 11

2.7. İmmünoloji 14

2.7.1. Edinilmiş Bağışıklık Sistemi ve MS 15

2.7.1.1 CD4+ T hücreleri 15

2.7.1.2 CD8+ T hücreleri 17

2.7.1.3 B hücreleri 17

2.7.2. Doğal Bağışıklık Sistemi ve MS 18

2.8. Etiyoloji 18

2.8.1. Çevresel Faktörler 19

2.8.2. MS ve Genetik Etiyoloji 20
2.8.2.1 Bağlantı Analizleri 21
2.8.2.2 İlişkilendirme Çalışmaları 22
2.8.2.3 Nadir Varyasyon Analizi 24
2.8.2.4 Türkiye'deki Genetik Çalışmalar 26
2.9. Tüm Ekzom Dizileme 27
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER 29
3.1. Hasta Seçimi 29
3.2. DNA izolasyonu ve Kantitasyonu 29
3.2.1. Genomik DNA izolasyonu 29
3.2.2. DNA Kantitasyonu 30
3.3. Tüm Ekzom Dizileme 31
3.3.1. Kütüphane Hazırlanması 31
3.3.2. Sekans Aşaması 33
3.3.3. Biyoinformatik Aşaması 33
3.3.4. WES datası Kalite Kontrolü Aşaması 34
3.3.5. Klinik Analiz 34
4. BULGULAR 42
4.1. Tüm Ekzom Dizileme Bulguları 42
4.2. Olguların Klinik Bilgileri ve WES Sonuçları 43
4.2.1. A1 Ailesi 44
4.2.1.1 A1H1 ve A1H2 Klinik Bilgiler 44
4.2.1.2 A1H1 ve A1H2 WES Bilgileri 46
4.2.2. A2 Ailesi 51
4.2.2.1 A2H1 ve A2H2 Klinik Bilgiler 51
4.2.2.2 A2H1 ve A2H2 WES Bilgileri 53
4.2.3. A3 Ailesi 57

4.2.3.1 A3H1 ve A3H2 Klinik Bilgiler 57
4.2.3.2 A3H1 ve A3H2 WES Bilgileri 59
4.2.4. A4 Ailesi 66
4.2.4.1 A4H1 ve A4H2 Klinik Bilgiler 66
4.2.4.2 A4H1 ve A4H2 WES Bilgileri 67
4.2.5. A5 Ailesi 74
4.2.5.1 A5H1 ve A5H2 Klinik Bilgiler 74
4.2.5.2 A5H1 ve A5H2 WES Bilgileri 75
5. TARTIŞMA 80
6. SONUÇLAR 92
7. KAYNAKLAR 94
8. ÖZGEÇMİŞ 127
9. İNTİHAL TARAMA RAPORU 129
BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU 137

KISALTMALAR

MS : Multiple Skleroz

SSS : Santral Sinir Sistemi

POMS : Çocukluk çağı başlangıçlı multiple skleroz

EBV : Epstein-Barr virüsü

MHC : Majör histokompatibilite kompleksi

GWAS : Genom boyu ilişkilendirme çalışmasında (Genome-Wide Association Studies)

IMSGC : Uluslarası Multipl Skleroz Genetik Konsorsiyum (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium)

MAF : Minor alel frekansı

ADEM : Akut dissemine ensefalomyelit

MRG : Manyetik rezonans görüntüleme

KİS : Klinik izole sendrom

BOS : Beyin omurilik sıvısı

OKB : Oligoklonal band

KBB : Kan Beyin Bariyeri

Ig : İmmünoglobin

ROS : Reaktif oksijen türleri

DC : Dendritik hücresi

Ab : Antikor (Antibody)

EAE : Deneysel otoimmün ensefalomiyelit (Experimental autoimmune encephalomyelitis)

GM-CSF : Granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktör (granulocyte macrophage colony stimulating factor)

APC : Antijen sunan hücre

NGS : Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing)

EDSS : Genişletilmiş özürlülük durum ölçeği

Aa : Amino asit

VNTR : Değişken sayıda ardarda tekrar (Variable number tandem repeat)

Dk : Dakika

VCF : Variant Calling File

PCR : Polimeraz zincir reaksiyonu (polymerase chain reaction)

BWA : Burrows-Wheeler Aligner

GATK : Genome Analysis Tool Kit

IGV : Integrative Genomics Viewer

ACMG : Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (American College of Medical Genetics and Genomics)

AMP : Moleküler Patoloji Derneği (Association for Molecular Pathology)

CADD : Combined Annotation Dependent Depletion

GERP : Genomic Evolutionary Rate Profiling

HPO : Human Phenotype Ontology

OMIM : Online Mendelian Inheritance in Man

GTEx : Genotype-Tissue Expression

IVMP : İntravenöz metilprednizolon

HET : Heterozigot

HOMO : Homozigot

P : Patojenik

LP : Olası Patojen

VUS : 'belirsiz öneme sahip değişken'

OR : Otozomal Resesif

OD : Otozomal dominant

OEA : Oleoylethanolamide

PEA : N-palmitoylethanolamide

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Multipl skleroz, genetik ve çevresel faktörlerin birleşimi ve bunların etkileşiminden kaynaklanır 19
Şekil 2:MS genetik çalışmaların kronolojik sıralaması 21
Şekil 3: Biyoinformatik Analiz Şeması 34
Şekil 4: Aday Varyasyonların Belirlenmesinde Takip Edilen İş Akışı..... 36
Şekil 5: A1 Ailesine ait pedigri..... 46
Şekil 6: A1H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 46
Şekil 7: A1H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 47
Şekil 8: A1H1 ve A1H2'de bulunan *NSUN5* c.647G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü..... 49
Şekil 9: *NSUN5* c.647G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 49
Şekil 10: A1H1 ve A1H2'de bulunan *ARRB2* c.893A>G varyasyonuna ait IGV görüntüsü..... 50
Şekil 11: *ARRB2* c.893A>G varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 50
Şekil 12: A1 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafiği 51
Şekil 13: A2 Ailesine ait pedigri..... 53
Şekil 14: A2H1'de ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı..... 53
Şekil 15: A2H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 54
Şekil 16: A2H1 ve A2H2'de bulunan *SAMD9* c.2298delG varyasyonuna ait IGV görüntüsü..... 56
Şekil 17: A2H1'de bulunan *OPA1* c.826G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü..... 56

Şekil 18: *OPA1* c.826G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 57
Şekil 19: A2 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi..... 57
Şekil 20: A3 Ailesine ait pedigri 59
Şekil 21: A3H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 59
Şekil 22: A3H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 60
Şekil 23: A3H1 ve A3H2'de bulunan *MPO* c.1214G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü..... 62
Şekil 24: *MPO* c.1214G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 62
Şekil 25: A3H1 ve A3H2'de bulunan *NAAA* c.999-3C>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü..... 63
Şekil 26: A3H2'de bulunan *SLITRK2* c.943G>C varyasyonuna ait IGV görüntüsü. 63
Şekil 27: *SLITRK2* c.943G>C varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 64
Şekil 28: A3H2'de bulunan *PSMC1* c.1183A>G varyasyonuna ait IGV görüntüsü. 64
Şekil 29: *PSMC1* c.1183A>G varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 64
Şekil 30: A3H2'de bulunan *GRIK2* 1073G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü..... 65
Şekil 31: *GRIK2* 1073G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 65
Şekil 32: A3 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi..... 65
Şekil 33: A4 Ailesine ait pedigri 67
Şekil 34: A4H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 67
Şekil 35: A4H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 68
Şekil 36: A4H1 ve A4H2'de bulunan *SPR* c.1A>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü 70
Şekil 37: *SPR* c.1A>T varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu..... 70

Şekil 38: A4H1 ve A4H2'de bulunan *STAT5A* c.1270A>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü 71
Şekil 39: *STAT5A* c.1270A>T varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 71
Şekil 40: A4H1'de bulunan *SARM1* c.799_801delinsCGGCTGCACGCCTGCCTCGCAGTAGC varyasyonuna ait IGV görüntüsü 72
Şekil 41: A4H2'de bulunan *CYP2R1* c.1241G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü 72
Şekil 42: *CYP2R1* c.1241G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 72
Şekil 43: A4H2'de bulunan *DAB2* c.377G>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü 73
Şekil 44: *DAB2* HET c.377G>T varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 73
Şekil 45: A4 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi..... 73
Şekil 46: A5 Ailesine ait pedigri 75
Şekil 47: A5H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 75
Şekil 48: A5H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı 76
Şekil 49: A5H1 ve A5H2'de bulunan *IGLON5A* c.178G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü 78
Şekil 50: *IGLON5A* c.178G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu 78
Şekil 51: A5H1'de bulunan *GJC2* c.118_123delinsAGGCCATCGCCTAGAT varyasyonuna ait IGV görüntüsü 79
Şekil 52: A5H1'de bulunan *DARS* c.564+2T>C varyasyonuna ait IGV görüntüsü . 79
Şekil 53: A5 Ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi 79
Şekil 54: *ARRB2* c.893A>G varyasyonun proteindeki bulunduğu bölge 82
Şekil 55: *IGLON5* dokulara göre transkripsiyonu 90

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. SSS inflamatuar demiyelizan hastalıkları 4
Tablo 2. 2017 Revize McDonald kriterleri 9
Tablo 3. MS Klinik Seyirleri 10
Tablo 4. Örneklerin Nanodrop ölçümleri 30
Tablo 5: ACMG ve AMP varyasyon sınıflandırma kriterleri 37
Tablo 6. WES verisi kalite parametreleri 42
Tablo 7. Çalışmaya katılan hastaların genel klinik bilgisi 43
Tablo 8. A1H1 ve A1H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar 47
Tablo 9. A2H1 ve A2H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar 54
Tablo 10. A3H1 ve A3H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar 60
Tablo 11. A4H1 ve A4H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar 68
Tablo 12. A5H1 ve A5H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar 76

FİNANSAL DESTEK BİLDİRİM

Bu tez çalışması İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa BAP desteği ile gerçekleştirilmiştir (tarih/sayı 11.01.2024/37581).

ÖZET

Amaç: Multiple skleroz (MS), santral sinir sisteminin (SSS) nöroinflamatuvar, nörodejeneratif kronik bir hastalığı olup en çok genç erişkinleri etkilemektedir. Yapılan birçok çalışma, MS patofizyolojisinin primer mekanizmasının periferde aktifleşen otoreaktif lenfositlerin kan beyin bariyerinden geçerek miyelin gibi sinir sistemi bileşenlerine saldırması ve bunun oligodendrosit ölümü ile sonuçlanması olduğunu göstermektedir. Bugüne kadar MS patofizyolojisinin aydınlatılmasına yönelik sayısız çalışma yürütülmüş ve başta immün yolaklar olmak üzere birçok yolak ve çevresel etken suçlanmıştır. Tüm bunlara rağmen MS oluşumunun ve progresyonunun altında yatan mekanizmalar halen tam olarak bilinmemektedir. MS kompleks bir kalıtım modeli göstermekte olup çevresel etkenler ile etkileşim sonucunda genetik olarak yatkın bireylerde ortaya çıkmaktadır. Farklı yaklaşımların uygulandığı birçok genetik çalışma ile MS yatkınlığına sebep olan genomik bölge ve varyasyonlar tanımlanmaya çalışılmıştır. Günümüzde, 233 yaygın varyasyonun MS ile istatistiksel olarak anlamlı seviyede ilişkili olduğu saptanmıştır. Ek olarak istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmayan, önerisel ilişki gösteren 416 varyasyon tanımlanmıştır. Bu önerisel ilişkilerle birlikte bilinen yaygın varyasyonlar kümülatif olarak MS kalıtımsallığının yaklaşık yarısını açıklayabilmektedir. Ayrıca yapılan çalışmada düşük frekanslı varyasyonların MS riski üzerindeki kümülatif etkisini hesaplayarak MS kalıtımsallığının %5'ine kadarının bu varyasyonlar tarafından açıklanabileceğini ortaya koymuştur. Tüm bu bilgiler MS'de rol alan genetik etkilerin yarısının halen daha bilinmediğini göstermektedir. Bu çalışmada, MS patogenezinde rol oynayan gen ve yolakların ortaya çıkarılması hedeflenmektedir. Bu amaçla en az bir tanesi çocukluk çağı başlangıçlı olmak üzere 2 ya da daha fazla MS olgusu olan ailelerde tüm ekzom dizileme (WES) yöntemi ile hastalardaki MS etyopatogenezi ile ilişkili olduğu bilinen yolaklarda görev alan genlerdeki nadir varyasyonlar irdelenmiştir. Her ailede belirlenen nadir ortak varyasyonlar ile yolak analizleri yapılarak hastalık ile ilişkili olabilecek olası yolaklar tespit edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmaya İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Polikliniğine başvuran ve Çocuk Nöroloji bilimdalında MS

tanısı ile takip edilen Çocukluk çağı başlangıçlı multiple skleroz (POMS) hastalarından birinci, ikinci veya üçüncü derece akrabalarında MS tanısı olan 5 olgu ve MS tanılı en yakın akrabası dahil edildi. Bu hastalardan alınan periferik kandan DNA izolasyonu yapılarak miktarı ve saflığı yeterli olan örnekler uygun koşullarda saklandı. Tüm ekzom dizileme için bu tez çalışmasında, hedef yakalama ve zenginleştirme (target capture and enrichment) prensibiyle çalışan "Twist Target Enrichment Standard Hybridization v1 kiti" üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanıldı (kütüphane hazırlama). Daha sonrasında hazırlanan kütüphane MGISEQ-2000 dizileme platformuna uygun şekilde yüklenildi (sekanslama). Biyoinformatik veri analizleri kullanılarak cihazdan elde edilen veriden, WES analizinin yapılabildiği "Variant Calling Format (VCF)" dosyası elde edildi (biyoinformatik analiz).

Bulgular: Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sıklıkla immün sistem genleri suçlansa da çalışmamızda miyelinizasyon defektiyle ve/veya nörolojik bulgularla ilişkili ve oligodendrositlerin gelişimi ve maturasyonu için önemli olan genlerde varyasyonlar saptanmıştır. Ekzom dizileme sonucunda çalışmada yer alan 5 ailenin 2'sinde OMIM tanımlı fenotipi olan *SAMD9* ve *SPR* genlerinde muhtemel patojenik varyasyonlar saptanmıştır. Ayrıca bir ailede MS ile ilişkili olabileceği düşünülen *NSUN5* geninde varyasyon belirlenmiş olup bu gen daha önce bir başka ailesel MS çalışmasında aday bölge olarak belirlenen 7q11.23 bölgesinde yer almaktadır. Klinik seyri hafif olan ve ilaçsız takip edilen bir olguda da bu klinikten sorumlu olabileceği düşünülen *SARM1* geninde çerçeve kaymasına sebep olan varyasyon tespit edilmiştir.

Sonuç: WES analizi, multifaktöriyel ve poligenik bir hastalık olan MS'in tek başına yeterli bir değerlendirme yöntemi olmasa da MS ayırıcı tanısına giren nadir kalıtsal hastalıkları dışlamak ve MS ile ilişkili aday genleri belirlemek için önemli olduğu ortaya konulmuştur.

Anahtar Kelimeler: Ailesel Multiple Skleroz, POMS, MS genetik

ABSTRACT

Aim: Multiple sclerosis (MS) is a neuroinflammatory, neurodegenerative chronic disease of the central nervous system (CNS) that affects mostly young adults. Many studies have shown that the primary mechanism of MS pathophysiology is that peripherally activated autoreactive lymphocytes cross the blood brain barrier and attack nervous system components such as myelin, resulting in oligodendrocyte death. To date, numerous studies have been conducted to elucidate the pathophysiology of MS and many pathways and environmental factors, especially immune pathways, have been blamed. Despite all this, the mechanisms underlying the occurrence and progression of MS are still not fully understood. MS shows a complex inheritance pattern and occurs in genetically predisposed individuals as a result of interaction with environmental factors. Many genetic studies using different approaches have attempted to identify genomic regions and variations that cause MS susceptibility. Currently, 233 common variations have been found to be statistically significantly associated with MS. In addition, 416 variations that do not reach statistical significance and show suggestive associations have been identified. Together with these suggestive associations, known common variations can cumulatively explain approximately half of the heritability of MS. The study also calculated the cumulative effect of low-frequency variations on MS risk and found that up to 5% of MS heritability. All this data shows that half of the genetic influences involved in MS are still unknown.

Material and Method: The study included 5 patients with POMS who were admitted to the Medical Genetics Outpatient Clinic of Istanbul University-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Medical Faculty and followed up with a diagnosis of MS in the Pediatric Neurology department, who had first, second or third degree relatives with MS and their closest relatives with MS. DNA was isolated from peripheral blood obtained from these patients and the samples with sufficient quantity and purity were stored under appropriate conditions. For whole exome sequencing, the "Twist Target Enrichment Standard Hybridization v1 kit", which works on the principle of target capture and enrichment, was used in accordance with the manufacturer's instructions (library

preparation). The library was then loaded into the MGISEQ-2000 sequencing platform (sequencing). Using bioinformatics data analysis, a "Variant Calling Format (VCF)" file was obtained from the device data in which WES analysis could be performed (bioinformatics analysis).

Results: Although immune system genes have been frequently blamed in previous studies, in our study, variations were found in genes associated with myelinization defects and/or neurological findings and important for the development and maturation of oligodendrocytes. As a result of exome sequencing, possible pathogenic variations in *SAMD9* and *SPR* genes with OMIM-defined phenotype were found in 2 of the 5 families in the study. In addition, variation in the *NSUN5* gene, which is thought to be associated with MS, was identified in one family and this gene is located in the 7q11.23 region, which was previously identified as a candidate region in another familial MS study. In a patient with a mild clinical course who was followed up without medication, a frame-shifting variation in the *SARM1* gene, which may be responsible for this clinical course, was detected.

Conclusion: Although WES analysis is not a sufficient evaluation method for MS, which is a multifactorial and polygenic disease, it has been shown to be important for excluding rare inherited diseases in the differential diagnosis of MS and identifying candidate genes associated with MS.

Keywords: POMS, MS genetics, Familial MS

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Multiple Skleroz (MS) santral sinir sisteminin (SSS) en sık görülen kronik inflamatuar demiyelinizan hastalığıdır. MS tipik olarak demiyelinizan odaklardan kaynaklı atakların uzun yıllar boyunca tekrar etmesi ve bu ataklardan sonra oluşan bozukluğun değişen derecelerde iyileşmesi ile karakterize edilen genellikle ilerleyici ve nörolojik fonksiyon kayıplarına yol açan kronik bir durumdur. Nörolojik belirtiler, demiyelinizan odakların yeri ve büyüklüğüne göre ortaya çıkar. Hastalığın en sık başlangıç semptomları güçsüzlük veya el becerisinin azalması, duyusal bozukluk, optik nörit, çift görme (diplopi), yürüme bozukluğu ve ataksidir. Günümüzde MS'in şifa ile sonuçlanan tedavisi bulunmamakla birlikte atakları engellemek ya da sınırlamak, atak sonrası oluşabilecek nörolojik fonksiyon kaybını azaltmak ve hastalığın ilerleyişini önlemek ya da en aza indirmek amacı ile tedaviler uygulanmaktadır (1).

Dünya genelinde prevalansı 35.9/100.000 olup, başlangıç yaşı 20 ile 50 yaş arasındadır. Kadınlar erkeklere göre 2 kat fazla etkilenmektedir (2). Türkiye'de MS prevalansı ilgili net bir çalışma olmamakla birlikte 2005-2023 yılları arasında yapılan farklı lokal çalışmalarda dikkate alındığında multiple skleroz prevalansı 18,6-101,4/100.000 olarak raporlanmıştır. Türkiye'de de kadınlarda daha sık görülmektedir (3–6). MS hastalarının %2-10'unu, klinik bulguların 18 yaş altında ortaya çıktığı çocukluk çağı başlangıçlı MS (Pediatric Onset MS, POMS), olguları oluşturmaktadır. Dünya genelinde çocukluk çağında MS tanısı alan yaklaşık 30.000 çocuk bulunmaktadır. POMS sıklığı puberteden önce iki cinsiyette de eşit iken puberteden sonra erişkinde olduğu gibi kadınlarda daha sıktır (2,7).

MS'in etiyolojisi belirsizliğini korumakla birlikte genetik olarak yatkın olan bireylerde çoklu çevresel faktörlerin etki etmesi ile ortaya çıktığı düşünülmektedir. Çoklu faktörlerin karmaşık etkileşimi immün hücrelerin bireyin kendi hücrelerini tanımasını kaybetmesine yol açmakta özellikle SSS'nin yapısal bileşenlerine karşı anormal ve patojenik inflamatuar yanıtların gelişmesine neden olmaktadır. Şu ana

kadar kadar vitamin D eksikliği, iklimsel ve coğrafik koşullar, Epstein-Barr virüsü (EBV) olmak üzere çeşitli viral ve bakteriyel enfeksiyöz ajanlar, sigara kullanımı hastalığa yatkınlık oluşturduğu tespit edilen faktörlerdir (8). Ayrıca epidemiyolojik çalışmalar MS hastalarının akrabalarında MS riskinin normal popülasyondan daha yüksek olduğu gösterilmiştir. 2021 yılında yapılan bir meta analiz çalışmasında vakaların yaklaşık %11,8'inin ailesel olduğu belirtilmektedir. Bu rakam çocukluk çağı başlangıçlı MS vakalarında daha yüksektir (9). Normal popülasyon için MS'e yakalanma olasılığı %0,1 iken birinci derece akrabasında MS tanısı olan bireylerde bu olasılık %2-4'lere kadar çıkmaktadır. Monozigot ikizlerde yapılan çalışmalarda bir ikizde MS varsa diğerinde MS gelişme riski yaklaşık %25 iken dizigotik ikizlerde bu oran %5'dir (10). Bu aile çalışmaları ve vakaların ailesel yığılımı MS patolojisinde genetik faktörlerin etkili olduğunu göstermektedir.

MS'nin genetik etyolojisini aydınlatmaya yönelik yapılan araştırmalarda bağlantı analizi, ilişkilendirme analizi, etkilenmiş bireylerde genom dizileme çalışmalarından yararlanılmaktadır. 2019 yılında yapılan bir genom boyu ilişkilendirme çalışmasında (GWAS), majör histokompatibilite kompleksi (MHC) kümesi dışındaki genlerde 200'i otozomal kromozomlarda ve biri X kromozomunda yerleşimli olmak üzere genom çapında anlamlı ilişkili 233 tek nükleotid varyasyonu (SNV) olduğu ortaya koyulmuştur. Uluslararası Multipl Skleroz Gentik Konsorsiyumu (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, IMSGC) tarafından GWAS verileri kullanılarak kalıtsallığın %48 oranında tahmin edilebilir olduğu ifade edilmiştir (11). Birden fazla etkilenen bireyi olan MS aileleri son derece nadir olsa da bu ailelerde tespit edilen nadir ve düşük frekanslı (minör alel frekansı,MAF<%5) varyasyonların açıklanamayan genetik kısmı tamamlayacağı öngörülmektedir. Literatürde ailesel MS olgularında yapılan çalışmalarda *FKBP6, CUL9, TTBK1, PPP2R5D, MYO16, TNFSF13B, ATP9A, POLD2* genlerinde nadir varyasyonlar tespit edilmiş ve bu genlerin MS patogenezinde rol aldığı ileri sürülmüştü (12–14).

Bu çalışmada en az bir tanesi çocukluk çağı başlangıçlı olmak üzere 2 ya da daha fazla MS olgusu olan ailelerde tüm ekzom dizileme (WES) yöntemi ile hastalardaki MS etyopatogenezi ile ilişkili olduğu bilinen yolaklarda görev alan genlerdeki nadir varyasyonlar irdelenmesi amaçlanmıştır. Bugün bilgimiz dahilinde ülkemizde daha önce erken başlangıçlı MS ailelerinin genetik varyasyonlarının

incelendiği bir çalışma bulunmamaktadır. Türkiye'de daha önce yapılan bir çalışmada çocukluk çağı başlangıçlı MS vakalarının ailesel olma oranı %6,5 olarak tespit edildiği düşünüldüğünde oldukça nadir bir grupta gerçekleştirilecek olan bu öncül çalışmamızın, hastalığın genetik altyapısının anlaşılmasına önemli bir katkı sunacağı düşünülmektedir (15).

.

2. GENEL BİLGİLER

Miyelin, aksonları çevreleyip izole eden ve aksiyon potansiyellerinin aksonların çıplak bölgeleri (Ranvier düğümleri) arasında atlayarak ilerlemesini sağlayarak hızlı iletimde rol oynayan, protein ve lipid açısından zengin çok katmanlı bir zardır. Miyelin kılıflar ayrıca aksonların yapısına ve stabilitesine de katkıda bulunur. SSS'de miyelin oluşturan hücreler oligodendrositlerdir ve bu hücreler birden fazla nöronun aksonunu kaplayabilir. Miyelin hasarı, aksonlara verilen desteğin azalmasına, iyon kanallarının yeniden yerleşmesine, aksonal membran potansiyellerinin dengesizleşmesine, uyarılabilirliğin azalmasına ve iletim bloğuna neden olur. Aksonlar başlangıçta kendini adapte edip iletime devam edebilir, ancak sonunda distal ve retrograd dejenerasyon meydana gelir ve hasar kalıcı hale gelir (16).

SSS demiyelinizan hastalıkları patolojik olarak sinir liflerindeki miyelin kılıfın diğer doku elemanlarına göre daha çok harabiyeti, inflamatuar hücrelerin özellikle perivenöz dağılımlı infiltrasyonu ve ak maddede birden fazla lezyonlar ya da büyük birden fazla merkezi olan tek lezyon ile karakterizedir (1). SSS inflamatuar demiyelizan hastalıkları Tablo 1'de sınıflandırılmaktadır:

Tablo 1. SSS inflamatuar demiyelizan hastalıkları

SSS inflamatuar demiyelinizan hastalıkları
1.) Multiple skleroz
2.) Nöromiyelitis optika spektrum bozukluğu ve progresif nekrotik myelopati
3.) Akut dissemine ensefalomyelit (ADEM) ve akut hemorejik ensafalit
4.) Otoimmün hastalık ilişkili demiyelinizasyon
5.) Sarkoid ilişkili demiyelinizasyon
6.) Graft versus host hastalığı

2.1.Multiple Sklerozis Genel Bilgi

Multiple skleroz, SSS'nin inflamatuar demiyelinizan hastalığı olup en çok genç erişkin dönemde görülmektedir. MS'in patogenezi karmaşıktır ve tam olarak anlaşılamamıştır, ancak inflamasyon ve nörodejenerasyonun yol açtığı akson ve nöron kaybının hastalığın kliniğinin temelini oluşturduğu günümüzde bilinmektedir. MS'in kesin nedeni belirsizliği korumakla birlikte hastalığın genetik olarak duyarlı bireylerde çevresel faktörlerin etkisiyle ortaya çıktığı düşünülmektedir (17,18).

2.2.Tarihçe

Tarihteki yazılı kayıtlara göre ilk MS vakası olduğu düşünülen kişi Saint Lidwina van Schiedam'dır (1380-1433) (19). Daha sonraki önemli kayıt ise 19. yüzyılda İngiltere Kralı III. George torunu Augustus d'Esté'nin (1794-1848) onlarca yıldır tuttuğu günlüğüdür. 28 yaşında optik nörit atağının ardından izleyen yıllardaki ilerleyici zayıflık, uyuşukluk, yürüme zorluğu, ağrılı spazmlar ve depresyon gibi nörolojik fonksiyon kayıplarını ayrıntılı olarak aktardığı bu günlük, MS'in seyri açısından oldukça önemli bir kaynak oluşturmaktadır (20). Viktorya döneminin popüler çocuk kitapları yazarı Margaret Gatty (1809-1873) de MS hastası olduğu düşünülmektedir. Gatty'nin elindeki güçsüzlük ve koordinasyon bozukluğunun önce aralıklarla olduğu ve sonrasında duygu durum bozukluğu ile birlikte olan ilerleyen nörolojik bir hastalığa dönüştüğü The Lancet dergisinde yayınlanan bir makalede anlatılmıştır. "Hayal Kırıklığına Uğramış Bir Adamın Günlüğü" adlı eserde hastalığın seyrini gözler önüne seren B. F. Cummings ise ilk semptomlarının başlangıcından 10 yıl sonra, 30 yaşında ölmüştür. MS'in ilerleyici formunu belgelediği günlüğü günümüzde de basılmaya devam etmektedir (19).

Tıp literatüründe ilk MS vakası 1824 yılında Ollivier d'Angers'in omurilik hastalıklarıyla ilgili ders kitabında anlatılmaktadır. 1838'de Robert Carswell ve 1842'de Jean Cruveilhier'in, birbirlerinden habersiz bir şekilde hazırladıkları tıbbi ve nörolojik durumların atlaslarında MS örnekleri yer almaktadır. 1849 yılında Alman klinisyen-patolog Friedrich Theodor von Frerichs (1819-1885), akut omurilik sendromu ile başvuran bir hastada ilk klinik tanıyı koyarak ve hastalığın klinik özelliklerinin sınırını çizerek önemli bir adım atmıştır. Bu tanısı öğrencisi tarafından yapılan otopsiyle kanıtlansa da günümüzde ilk MS tanımlanmasının Edme Felix Alfred Vulpian (1826-1887) ve Jean-Martin Charcot (1825-1893) tarafından 1866

tarihinde yayınlanan makale ile yapıldığı kabul edilmektedir. Bu makalede daha sonra hastalığın ismine temel oluşturacak "*sclérose en plaque disseminé*" terimi kullanılmaktadır. 1868 yılında Charcot hastalıkla ilgili dersler vermiş ve daha sonra bu konferansları yazılı hale getirmiştir. Bu dersler uluslararası camiada büyük yankı bulmuş ve hastalığın tanınmasına yol açmıştır. Amerika'da benzer yıllarda Dr. Morris ve patolog S. Weir Mitchell tarafından ilk kez bir MS vakası bildirilmiş ve patolojik bulguları tanımlanmıştır. 1871 yılında yayınlanan bir genel cerrahi kitabında da "Multiple cerebral sclerosis" adında bir kitap bölümü yer almıştır (19,21).

İlk MS tanımlamalarında, aile öyküsü olan hastaların varlığına dikkat çekilmiş olsa da bu vakaların nadir olduğu düşünülerek önemi küçümsenmiştir. İlk kez 1933 yılında Almanya'da Curtius, MS'li ailelerde hastalığın genel popülasyona göre 10 kat daha yaygın olduğunu fark edip bu bulguyu yayınlamıştır. MacKay ise, 1896'dan 1948'e kadar tüm ailesel MS vakalarını incelemiş ve bu durumun nadir veya önemsiz olmadığını ortaya koymuştur. Ardından monozigotik ikizlerde %23'lük konkordans oranı olduğunu açıklamış ve bu oran daha sonra yapılan Kanada ve İngiliz çalışmaları tarafından da doğrulanmıştır. Bu çalışmalar ışığında, MS'in etiyolojisinde genetik faktörlerin önemli bir rol oynadığı düşünülmeye başlanmıştır (19).

2.3.Epidemiyoloji

MS dünya genelinde yaklaşık 2.8 milyon insanı etkilemektedir ve global prevalansı 100 000'de 35,9'dur. Bu sayılar bir önceki prevalans hesaplamasına göre yaklaşık %30 daha fazladır ve prevalanstaki artış dünya genelinde gözlemlenmektedir (2,22). Bu artış, verinin toplandığı ülke sayısının ve verinin kalitesinin artması, küresel nüfus artışı ve tanı yöntemlerindeki gelişmeler gibi faktörlere bağlanabilir. Ancak, MS gelişme riskindeki artışın da göz ardı edilmemesi gerekir (23). Küresel dağılıma bakıldığında, istisnalar olmakla beraber ekvatordan uzaklaştıkça prevalans artmaktadır. İnsidans 75 ülkeye göre 100 000'de 2.1'dir. Bu da dünya çapında her 5 dakikada birinin MS tanısı aldığı anlamına gelmektedir. İnsidanstaki bölgesel farklılıklar genellikle prevalans dağılım modelini takip eder. En yüksek insidans oranı 6,8/100.000 ile Avrupa'da, onu 4,8/100.000 ile Amerika Birleşik Devletleri takip etmektedir. Güney Doğu Asya ve Afrika, 0,4/100.000 ile en düşük insidans oranlarına sahiptir. Global olarak, kadınlar MS'ten erkeklerden iki kat daha fazla etkilenmektedir. Ancak bazı bölgelerde bu oran 4 kata kadar çıkmaktadır. Tanı yaşı aralığı 20-50 yaş

olup ortalama tanı yaşı 32'dir. Bu rakamlar bir önceki çalışmayla benzerlik göstermekte ve ülkeler arası çok fazla değişiklik göstermemektedir (2,22).

2021 yılında yapılan bir meta-analiz çalışması, tüm MS tanılı hastalarının %11,8'inde ailesinde başka MS hastası olduğunu göstermektedir. Bu oran bir önceki çalışmaya göre (%12,6) biraz daha düşük olsa da, zaman içinde ailesel MS olgularının sayısında önemli bir değişiklik olmadığı belirtilmektedir (9,24). Türkiye'de yapılan çalışmada ise vakaların %17,8 ailesinde başka MS hastası olduğunu belirtmiştir (25).

POMS vaka sayısı son yıllarda önemli ölçüde artmıştır. 2013 yılında 34 ülkeden 7.000 vaka bildirimi yapılırken, 2020 yılında 47 ülkeden 30.000 vaka bildirimi yapılmaktadır (2,22). MS'li bireylerin yaklaşık %2-10'u ilk ataklarını çocukken yaşamaktadır. Ergenlik öncesinde MS, cinsiyetler arasında kabaca eşit oranda görülürken ergenlik sonrasında erişkinlikteki gibi kadınlarda daha sık rastlanır (7). Ailesel MS olgu oranı, pediatrik başlangıçlı MS olgularında daha yüksektir. Bu durum, artmış genetik yükten kaynaklandığı öngörülmektedir (9). Türkiye'de yapılan bir çalışmada POMS vakalarının %6,5'i ailesel olduğu belirtilmektedir (15).

2.4.Tanı

MS tanısındaki temel yaklaşım, SSS'deki lezyonların ve bunların neden olduğu klinik tablonun zamana ve alanda yayılım göstermesi ve benzer özelliklere sahip diğer tanıların klinik ve/veya inceleme yöntemleri ile dışlanmasıdır. Bazı olgularda tanı klinik ve laboratuvar bulguları ile kolaylıkla konulabilir ancak bazı atipik seyirli hastalarda tanıyı kesinleştirmek zordur. Bu yüzden hastalara tanı koymak için kriterlerden yararlanılmaktadır. İlk kez 1965 yılında Schumacher paneli ile MS tanı kriterleri belirlenmiştir. Bu kriterlerde, SSS'deki hastalığın klinik olarak zamanda ve alanda yayılım göstermesini dikkate alarak belirlenmiştir. Geliştirilen tüm klinik tanı kriterlerinin temelini bu ilk tanı kriterleri oluşturmaktadır. Daha sonrasında ilk kez laboratuvar verilerinin tanı kriterlerinde yer bulduğu Poser tanı kriterleri, Schumacher kriterlerinin yerini almış ve uzun yıllar MS tanısında kullanılmıştır. 2001 yılında McDonald öncülüğünde toplanan uluslararası panelde McDonald kriterleri olarak adlandırılan yeni tanı kriterleri geliştirilmiş ve yayınlanmıştır (26). Günümüzde "International Advisory Committee on Clinical Trials in Multiple Sclerosis" topluluğu tarafından belirlenen 2017 revize McDonald kriterleri kullanılmaktadır (27).

Tablo 2'de bu kriterler özetlenmektedir. Tanıda kullanılan kavramlar aşağıda özetlenmektedir (27).

Klinik izole sendrom (KİS): SSS'de fokal veya multifokal inflamatuar demiyelinizasyona işaret eden, akut veya subakut olarak gelişen, en az 24 saat süren, iyileşme ile veya iyileşme olmaksızın seyreden ve ateş veya enfeksiyon bulgusu göstermeyen bir klinik epizodtur. Bu durum, tipik bir multipl skleroz nüksüne (atak ve alevlenme) benzerlik gösterir. Ancak MS olduğu bilinmeyen bir hastada, hasta tarafından bildirilen semptomlar ve objektif bulgular klinik izole sendrom olarak adlandırılır. Hastaya ilerleyen dönemde multipl skleroz tanısı konulursa, bu klinik hastanın ilk atağı olarak kabul edilir. KİS monofokal veya multifokal olabilir ve belirtiler patolojinin anatomik konumuna göre değişir. Tipik belirtiler arasında tek taraflı optik nörit, fokal supratentoryal sendrom, fokal beyin sapı veya serebellar sendrom veya kısmi miyelopati yer alır. Atipik belirtilere ise bilateral optik nörit, tam oftalmopleji, tam miyelopati, ensefalopati, baş ağrısı, bilinç değişikliği, menenjismus veya izole yorgunluk örnek olarak verilebilir.

Atak: Atak, nüks, alevlenme ve klinik izole sendrom (tek atak olduğunda) eşanlamlıdır.

Lezyon: T2 ağırlıklı veya proton yoğunluk ağırlıklı manyetik rezonans görüntüleme (MRG) taramasında uzun eksende en az 3 mm olan hiperintensite alanı

Alanda yayılma: SSS içinde farklı anatomik konumlarda lezyonların gelişmesi, yani multifokal bir SSS sürecine işaret eder.

Zamanda yayılma: Zaman içinde yeni SSS lezyonlarının gelişmesi veya ortaya çıkması.

Tablo 2. 2017 Revize McDonald kriterleri

Atak Sayısı	Objektif Kanıtı Olan Klinik Lezyonların Sayısı	MS tanısı için gerekli ek bulgular
2 ya da daha fazla	2 ya da daha fazla	Gerek YOK[1]
2 ya da daha fazla	1 + belli bir anatomik bölgeyi etkileyen eski bir atağın kesin tarihsel kanıtları olması[2]	Gerek YOK[1]
2 ya da daha fazla	1	SSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG[3] ile alanda yayılımın gösterilmesi
1	2 ya da daha fazla	Ek bir klinik atak veya MRG[4] ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB[5] varlığı
1	1	SSS'de farklı bir alandaki lezyona ait yeni bir atak veya MRG[3] ile alanda yayılımın gösterilmesi ve ek bir klinik atak veya MRG[4] ile zamanda yayılımın gösterilmesi veya BOS-spesifik OKB[5] varlığı
Sinsi Progresyon	1 yıl klinik progresyon (retrospektif veya prospektif, ataktan bağımsız olarak)	Aşağıdakilerin 2'si • MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal veya infratentoryal) alanlarda ≥1 lezyon • Spinal kordda ≥2 lezyon • BOS-spesifik OKB varlığı

1: Alanda ve zamanda yayılımı göstermek için ek bir teste gerek yoktur. Ancak beyin MRG tüm hastalara yapılmalıdır. Tanıyı destekleyecek yetersiz klinik ve MR bulguları olanlarda, tipik KİS olmayanlarda, atipik özellikleri olan hastalarda ek olarak spinal kord MRG ve BOS tetkiki yapılmalıdır. Bu tetkikler yapılamadıysa ya da negatifse MS tanısı koymadan önce dikkat edilmeli ve alternatif tanılar göz önünde bulundurulmalıdır.

2: Atak için objektif nörolojik bulgular temelinde konulmuş klinik tanı en güvenilirdir. Öykudeki atağa ait dökümante edilmiş objektif nörolojik bulgular yoksa, öykü enflamatuvar demyelinizan olaya ait tipik semptom ve klinik gelişim özelliklerini içermelidir. Ancak en az bir atak objektif bulgularla desteklenmelidir. Objektif kanıtların yokluğunda dikkatli olunmalıdır.

3: MRG'de alanda yayılım; MS tipik (periventriküler, kortikal/jukstakortikal, infratentoryal ve spinal kord) 4 alanın ≥2'sinde ≥1 lezyon olması.

4: MRG'de zamanda yayılım; herhangi bir zamanda çekilen MRG'de kontrast tutan ve tutmayan lezyonların aynı anda bulunması veya takip MRG'sinde ilk MRG (çekildiği zamandan bağımsız olarak) referans alındığında yeni bir T2 hiperintens lezyonun ya da kontrast tutan lezyonun olması.

5: BOS-spesifik OKB varlığı zamanda yayılımı göstermez ama tanıda onun yerine geçer.

MS: Multipl skleroz, SSS: Santral sinir sistemi, MRG: Manyetik rezonans görüntüleme, BOS: Beyin omurilik sıvısı, OKB: Oligoklonal band

2.5.Klinik Seyir

MS klinik tipleri Lublin ve arkadaşları tarafından 2013'de tanımlanmış ve 2014 yılında revize edilmiştir. Bu tipler, hastalığın seyri ve prognozunu daha iyi anlamak için kullanılır. Tanımlamada, hastalığın aktivitesi (atak sıklığı ve MR'daki lezyon aktivitesi) ve/veya hastalığın ilerlemesi ve engellilik durumundaki değişiklikler göz önünde bulundurulur. Klinik seyir tipleri hakkında genel bilgi Tablo 3'te özetlenmektedir (28).

Tablo 3. MS Klinik Seyirleri

TÜR	TANIM	HASTALIK SEYRİ	İLERLEME	BELİRTİLER	NÜKS	YAŞ
KLİNİK İZOLE SENDROM (KİS)	En az 24 saat süren, MS'i andıran ancak tam tanı kriterlerini karşılamayan tek bir nörolojik semptom atağı	Genellikle tamamen iyileşir	Yok	RRMS veya diğer nörolojik hastalıklara benzer	Sık N/A	20-40 yaş arası
RELAPSİNG-REMİTTİNG MULTİPLE SKLEROZ (RRMS)	En yaygın tip (%85); net ataklar (nüksler) ve ardından kısmi veya tam iyileşme dönemleri ile karakterizedir	Nüks ve iyileşme	Yavaş, hastalığın ilerleyişi değişken	Yorgunluk, zayıflık, görme problemleri, uyuşma, karıncalanma, bilişsel problemler	Evet	20-40 yaş arası
SEKONDER PROGRESİF MULTİPLE SKLEROZ (SPMS)	RRMS tanısı konduktan sonra gelişir; net nüksler olmadan semptomların kademeli olarak kötüleşmesi ile karakterizedir	Progresif	Sürekli kötüleşme	Yukarıdakilere ek olarak yürüme güçlüğü, mesane ve bağırsak problemleri	Hayır	RRMS tanısından 10-15 yıl sonra
PRİMER PROGRESİF MULTİPL SKLEROZ (PPMS)	Daha az yaygın (%15); başlangıçtan itibaren semptomların net nüksler olmadan sürekli olarak kötüleşmesi ile karakterizedir	Progresif	Sürekli kötüleşme	SPMS'ye benzer ancak daha erken başlangıç ve daha hızlı ilerleme	Hayır	40-50 yaş arası

2.6.Patolojik Bulgular

MS'in patolojik özelliği, SSS içinde birden fazla odakta miyelin kaybı alanlarıdır. Taze lezyonlar, çevredeki beyaz maddeden (skleroz) daha sert ve iyi sınırlı, hafifçe çökük, camsı görünümlü, gri-ten rengi ve düzensiz şekilli plaklar halinde görülür (29). Bu demiyelinizan alanlarda miyelin kaybına ek olarak değişken derecelerde gliosis, inflamasyon ve göreceli aksonal kayıp eşlik eder. Lezyonlar SSS her bölgesinde olabilir ancak optik sinirler, subpial omurilik, beyin sapı, serebellum ve jukstakortikal ve periventriküler beyaz cevher bölgelerinde daha sık bulunmaktadır. MS, önceleri SSS'nin beyaz cehverini etkileyen bir hastalık olarak kabul edilirken, son zamanlarda yapılan patoloji ve görüntüleme çalışmalarında, MS hastalarının kortikal gri cehverinde de demiyelinizan lezyonların yaygın olarak bulunduğu görülmüştür (30). Histolojik olarak lezyon oluşumunu yönlendiren temel süreçler: inflamasyon, miyelin bozulması, astrogliozis, oligodendrosit hasarı, nörodejenerasyon, aksonal kayıp ve yeterli olmayan remiyelinizasyon, nöroplastisitedir (31).

Hastalığın erken ve kronik evrelerinde beyaz cevherdeki lezyonlarda hakim olan histolojik süreçler farklıdır ve her evrede farklı lezyon tipleri görülür. Lezyonlar kabaca üç gruba ayrılır: aktif, aktif ve kronik miks ve kronik (31). Aktif lezyonlar, RRMS'de en sık görülen lezyon tipidir ve perivasküler parankimal inflamasyona eşlik eden demiyelinizasyon ve aksonal dejenerasyondan oluşmaktadır. İnflamatuar hücrelerin büyük çoğunluğunu aktif makrofajlar/mikroglialar ve CD8-pozitif sitotoksik T lenfositleri oluştururken, daha az sayıda CD4-pozitif yardımcı T lenfositleri, B lenfositleri ve plazma hücreleri de bulunur. Lezyonlardaki makrofajlar lezyon boyunca yayılmış haldedir (makrofaj denizi) ve miyelin kalıntıları içerirler (32). Aktif lezyonlardaki astrositler çoğalır ve homojen eozinofilik sitoplazmaya ve çok sayıda fibriler uzantılara sahip dolgun şekilli gemistositler haline gelerek diğer hücrelerin içinde asılı kaldığı bir matriks oluşturur (33). Kraniyal MRG'de gadolinyum artışı, inflamatuar hücrelerin kan-beyin bariyerini (KBB) aşarak SSS'ye sızmasını sağlayan hasarlı lezyonları karakterize eder. İnflamasyon, demiyelinizasyon ve vazojenik ödem, aktif lezyonların taze kesitlerdeki pembemsi-sarı, yumuşak ve net sınırları olmayan görünümlerinden sorumludur (29). Aktif beyaz cevher lezyonları, spesifik miyelin proteini kaybı, lezyon boyutu ve topografisi, oligodendrosit yıkımı, remiyelinizasyonun varlığı veya yokluğu, immünoglobulin (Ig) birikimi ve kompleman aktivasyonunun olup olmamasına göre heterojenlik göstermektedir. Bu

durum MS hastalarındaki hasar ve demiyelinizasyon mekanizmaların birbirinden farklı olabileceğine işaret ederek hastalığın farklı klinik tablolar sunmasının nedenini açıklar (34).

Aktif lezyonların %20'sinde bu inflamatuar mekanizmalar düzelmez. Dokuda yerleşik CD8+ T bellek hücrelerinin ve monositlerin aktive olup lezyonda birikmesi ile inflamasyon daha organize hale gelir. Bu durum, aktif lezyonların inflamasyonun azaldığı ancak devam ettiği, yavaşça genişleyen aktif ve inaktif miks lezyonlara dönüşmesine neden olmaktadır. Bu tür lezyonların çoğu (hepsi değil) yüksek alan (high-field) MRG'de tanımlanabilir; normal görünen beyaz cevher ile lezyon arasında demir yüklü fagositler birikir. Bu fagositler, görüntülemede "paramanyetik rim işareti" olarak adlandırılan görüntüye sebep olmaktadır (35).

Kronik inaktif lezyonlarda, lezyonun tamamında akson ve oligodendrosit kaybı vardır ve demyelinizasyon yaygındır. Lezyon hiposelülerdir ancak astrogliozis, makrofaj/mikroglia ve lenfosit infiltrasyonu az da olsa görülür (33). Perivasküler alanlarda lenfoid foliküler yapılar oluşur ve hastalığın ilerleyen evrelerinde plazma hücreleri birikir. T hücresi ve B hücresinin SSS içinde kalmaya devam etmesi ancak KBB'in sağlam kalması veya hasarın MRG'de gadolinyum sızmasına neden olmayacak seviyede sınırlı olması inflamasyonun kapalı veya onarılmış bir KBB'nin arkasında SSS içinde sıkışıp kalmasıyla açıklanabilmektedir (32). Lezyon akut aktif durumdan kronik inaktif duruma ilerledikçe ödem çözülmekte, inflamasyon azalmakta ve makrofaj, mikroglialar yavaş yavaş kaybolmaktadır. Astrositler glial lifler üreterek nihayetinde demiyelinize alanların glial skar ile doldurulmasını sağlamaktadır. (astrositik fibriler gliozis). Bu özellikler patolojik kaba kesitlerde belirgin şekilde sınırlanmış, sert, geri çekilmiş ve kahverengimsi renk değişikliğine yol açar ve Charcot'nun hastalığa "skleroz en plak" adını vermesine sebep olan görüntüden sorumludur (31).

MS'te gri cevher bölgelerinin de demiyelinizasyondan etkilendiği uzun zamandır bilinmektedir. Fakat geleneksel boyama yöntemlerinin yetersizliği nedeniyle bu durum göz ardı edilmiştir. Klinik olarak, korteks ve diğer gri madde bölgelerindeki aksonların demiyelinizasyonu önemlidir çünkü beyaz cevherde görülen lezyonlar kognitif bozukluk gibi bazı klinik durumları tam olarak açıklayamamaktadır (36). Gri cevher lezyonların korteks içindeki konumlarına göre üç tipe ayrılmaktadır: subpial,

intrakortikal ve lökokortikal. Tüm bu lezyonlarda demiyelinizasyon, oligodendrosit kaybı, mikroglial aktivasyon, aksonal transeksiyon, nöron ölümü ve sinaptik bağlantılarda azalma görülmektedir (37). Bu değişiklerin kraniyal MRG'deki kortikal kalınlıkta incelme görüntüsünün sebebi olduğu düşünülmektedir (36). Beyaz cevherdeki lezyonlara benzer şekilde, gri cevher lezyonlarında da erken evrede inflamasyon ve makrofaj/T hücre infiltrasyonu hakimken, geç dönemde inflamasyon azalır. Hastalığın hem erken döneminde hem de geç döneminde meningeal inflamasyon mevcuttur ve topografik olarak kortikal lezyonlarla ilişkilidir. Özellikle erken evredeki yaygın meningeal inflamasyon, kortikal demiyelinizasyon riskini 45 kat, perivasküler meningeal inflamasyon ise 15 kat artırmaktadır (31). Bu da menigeal inflamasyonun kortikal demiyelinizasyonu tetikleyebilecek inflamatuar sitokinleri ürettiğini düşündürtmektedir. Alternatif bir teori ise kortikal lezyonların beyaz cevher patolojisine ikincil olarak ortaya çıktığıdır. Bu teoriye göre, beyaz cevher lezyonlarındaki inflamatuar aktivite, retrograde ve anterograde şekilde SSS'inde hasara yol açarak gri cevher lezyonlarına neden olmaktadır (36).

MS'in bir başka karakteristik özelliği de normal görünen beyaz ve gri cevherde yaygın mikroglia aktivasyonu, aksonal hasar ve atrofidir. Bu değişiklikler hastalığın erken evresinde bulunmakta ve zamanla şiddeti artmaktadır. Beyinde, normal görünen beyaz cevherdeki mikroglia aktivasyonun şiddeti, beyaz cevher lezyon sayısından ziyade kortikal lezyonların yaygınlığı ile ilgilidir. Omurilikte ise meninkslerdeki T-hücre infiltrasyonunun derecesiyle ilişkilidir (38).

MS moleküler patolojisine baktığımızda inflamasyonun yol açtığı demyelinizasyon ve bu hasarı telafi etmeye çalışan remyelinizasyon görülür. Sürekli inflamasyon ve öncül oligodendrositlerin yeterli olmaması sonucunda hasar kalıcı hale gelmektedir. Demyelinizan alanda iletim hızı yavaşlamasını azaltmak için aksonda mitokondri sayısı artar fakat bu alanda immün hücreler tarafından salınan reaktif ajanlar mitokondri DNA'sına zarar vermekte ve solunum zincir proteinlerinin üretiminin bozulmasına dolayısıyla yetersiz enerji üretimine yol açmaktadır. Hastalık ilerledikçe, hasarlı mitokondriler nöronun somasında da birikir. Ayrıca, ölen MS hastalarının beyin motor nöronlarında mitokondriyal işlevle ilgili nükleer genlerin ifadesinin bozulduğu bildirilmektedir. Yeterli enerji sağlanamaması hücre içi ve dışı iyon konsantrasyonlarının değişmesine sebep olmaktadır. Sodyum kanallarının geri

alımının bozulması sonucu biriken glutamat ve hasarlı mitokondrilerden sitoplazmaya salınan kalsiyum, ileri ve geri aksonal hasardan sorumlu tutulmaktadır. Normalde miyelin, oligodendrositler ve mikroglialarda ferritine bağlı toksik olmayan ferrik (üç değerlikli, Fe+3) formda bulunan demir, hasar esnasında hücre dışı boşluğa salınır. Bu ortamda, ferröz (iki değerlikli, Fe+2) formuna dönüşerek reaktif oksijen türlerinin (ROS) toksisitesini artırır. Bu nedenle, bazal ganglionlar, talamus veya hipotalamus gibi yüksek demir yüküne sahip bölgelerde, MS'in erken evrelerinde bile belirgin nörodejenerasyon ve atrofi görülmektedir (38).

Sonuç olarak, MS; beyaz cevherdeki lezyonların yanı sıra gri cevher, meninks ve normal görünümlü beyaz cevheri de etkileyen karmaşık bir hastalıktır. Daha fazla araştırma, bu lezyonların oluşum mekanizmalarını aydınlatacak ve yeni tedavi yöntemlerinin geliştirilmesine imkan sağlayacaktır.

2.7.İmmünoloji

MS, periferik olarak aktive olmuş bağışıklık hücrelerinin KBB geçerek oligodendrositlerin yıkımına sebep olması sonucu nörodejenerasyonun görüldüğü bir otoimmün hastalıktır. Ancak MS'in öncelikle otoimmün bir hastalık mı (SSS'nin immün saldırısı ile başlayan) yoksa SSS'ye özgü bir hastalık mı (SSS'de başlayan ve daha sonra periferik immün aktivasyon ile devam eden) olduğuna dair tartışmalar devam etmektedir (39). GWAS'lardan elde edilen sonuçlarda, genetik yatkınlığın büyük çoğunluğunu immün yolaklarda (özellikle T hücreleri ve B hücrelerini içerenler) görevli genlerdeki değişikliklerin yol açtığı tespit edilse de SSS yapılarını oluşturan hücrelerle ilgili genler de (özellikle mikrogliaları içeren) artık sorumlu tutulmaktadır (11,40,41). Aslında bağışıklık sistemi ve SSS olmak üzere iki farklı sistemin hastalığın meydana gelmesinde katkısı vardır. Bu iki sistemin her bir hastada farklı şekilde yer alması büyük olasılıkla fenotipik çeşitliliğe katkıda bulunmaktadır. Buna ek olarak, bağışıklık sistemi SSS'de onarım ve yenilenmesini teşvik ederek veya otoimmün mekanizmaları düzenleyerek faydalı bir rol de oynayabilmektedir. SSS elemanlarının inflamasyona karşı farklı kırılganlık ve onarım yeteneği hastalık patogenezine katkıda bulunabilmektedir (39).

2.7.1. Edinilmiş Bağışıklık Sistemi ve MS

2.7.1.1 CD4+ T hücreleri

CD4+ T hücreleri, B lenfositlerinin antikor (Ab) üretmesine yardımcı olarak ve spesifik sitokinleri salgılayarak edinilmiş bağışıklık yanıtının merkezi düzenleyicileridir. Naif CD4+ T hücreleri, patojen kaynaklı peptidleri sınıf II MHC aracılığıyla sunan olgun dendritik hücreler (DC'ler) tarafından aktive edilir ve farklı T hücresi tiplerine dönüşür (42). Farelerde CD4+ T hücreleri, dışardan verilen miyelin proteinlerine karşı otoimmün reaksiyon vererek MS'e benzer semptomlar gösteren bir hastalığa neden olmaktadır. Bu fareler deneysel otoimmün ensefalomiyelit (EAE) modelli olarak tanımlanmakta ve MS patogenezi aydınlatılmasında kullanılmaktadır. Normal bir fareye uyarılmış CD4+ T hücreleri verilirse EAE de aktarılabilmektedir. CD4+ T hücrelerinin MS'teki rolünü destekleyen en güçlü kanıt, bazı sınıf II MHC moleküllerinin MS için en önemli genetik risk faktörlerinden biri olmasıdır (8). Nitekim şu ana kadar bulunan en güçlü duyarlılık lokusu *HLA-DRB1*15:01*'dir (43). Ayrıca GWAS'da, *HLA* genleri dışında CD4+ T hücrelerinin aktivasyonu, proliferasyonu, sitokin yolları, kostimülasyon ve sinyal iletimi ile ilgili genlerin bulunduğu lokusların duyarlılık ile ilişkili olduğu tespit edilmiştir (44).

Otoreaktif CD4+ T hücrelerinin oluşabilmesi için bu hücrelerin uyarılması gerekmektedir. Periferdeki otoreaktif CD4+ T hücrelerinin aktivasyonuna neden olan antijenler tam olarak bilinmemekle birlikte, enfeksiyöz ajanların rol oynayabileceği düşünülmektedir. Enfeksiyöz ajanların miyelin kılıfı proteinlerine benzeyen yapıya sahip olması (moleküler taklit) veya enfeksiyonlar sırasında oluşan inflamatuar olayların otoreaktif hücreleri aktive etmesi (bystander aktivasyon) ya da her iki mekanizmanın beraber gerçekleşmesi otoimmün yanıta yol açtığı varsayılmaktadır (8). Otoreaktif CD4+ T hücrelerinin SSS'nin hangi yapısını hedeflediği tam olarak bilinmemekle birlikte, miyelin temel proteini, proteolipid proteini ve miyelin oligodendrosit glikoproteinler en olası adaylardır. Ancak bazı araştırmalar, diğer miyelin bileşenleri ve miyelin dışı proteinlerin ve glikolipidlerin de bu hücreler için antijen olabileceğini göstermiştir (45,46). Hayvan modelleri ve hasta çalışmaları, MS'teki inflamasyon yanıtın oluşmasında, CD4+ T hücre alt küme hücreleri olan Th1, Th17 ve Treg'ler arasındaki dengenin bozulmasının kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir (39).

Th1'ler, CXC kemokin reseptörü tip 3 (CXCR3) ve interlökin-12 reseptör (IL-12R) zincir 1β/2β'nin hücre yüzey ekspresyonu ile tanılırlar ve interferon-gama (IFN-γ) sentezlerler (42,47). EAE hayvanların lezyonlarında en sık görülen, CD4+ T hücre alt kümesidir. MS hastalarında da aktif lezyonlarda Th1 hücreleri ve IFN-γ üretiminin arttığı gözlemlenmiştir (8). Ayrıca MS hastalarına IFN-γ verilmesi hastalığın şiddetini arttırmaktadır. Bu bilgiler, MS'te Th1 hücrelerinin ve IL-12/IFN-γ ekseninin önemli bir rol oynadığını desteklemektedir. SSS'ye sızan otoreaktif Th1 hücrelerinin nöropatolojik rolü tam olarak aydınlatılmamış olsa da mikrogliaları aktive ettiği ve nörotoksik bir fenotipe dönüştürdüğü düşünülmektedir. Dahası Th1 hücreleri, mikroglia üzerindeki sınıf II MHC ve kostimülatör moleküllerin upregüle ederek infiltre Th hücrelerinin tekrar aktive olmasını sağlamaktadır (48).

Th17 hücreleri CD161, kemokin reseptörleri CCR6 ve CCR4, sitokin reseptörleri, IL-23R ve IL-1R gibi spesifik yüzey işaretleri ile karakterize edilen ve IL-17A-F, IL-21 ve IL-22 gibi sitokinleri üreten bir CD4+ T hücre alt kümesidir (42,47). Th17 hücreleri, MS dahil olmak üzere birçok otoimmün hastalığın patogenezinde yer almaktadır. Bu hücreler, MS'de KBB'nin bozulmasında önemli bir rol oynamaktadır (49). Astrositler, KBB ve nöronlar arasında konumlanarak dolaşım ile SSS arasında moleküllerin ve hücrelerin hareketini düzenler ve nörotrofik faktörler üreterek doku onarımına katkıda bulunur. Th17 hücreleri IL-17'ni gibi inflamatuar sitokinlerin ve kemokinlerin üretimini artırarak astrositlerin işlevlerini düzenlemektedir (50). IL-6 ile birlikte IL-17A, endotel hücrelerindeki yapışma moleküllerinin ifadesini değiştirerek ve sıkı bağlantı noktalarının yakınındaki aktin hücre iskeletinin depolimerizasyonunu sebep olarak RRMS hastalarında KBB'nin bozulmasına sebep olduğu düşünülmektedir (51). Th17 hücreleri, hastalığı şiddetli seyreden RRMS hastalarının aktif lezyonlarında artmış bulunmuştur (52). Ayrıca EAE modellerinde hastalığın oluş mekanizmasında kritik bir rol oynadığı öne sürülen bir başka sitokin olan granülosit-makrofaj koloni uyarıcı faktörü (GM-CSF) de Th17 ve Th1 hücreleri tarafından üretilmektedir (39,53).

Treg hücreleri, FOXP3 adı verilen bir proteini ifade eden ve bağışıklık sisteminin aşırı tepki vermesini engelleyerek bağışıklık homeostazına yardımcı olan CD4+ T hücresi türüdür (42). MS'de dolaşımdaki Treg hücrelerin FOXP3 ekspresyonunun azaldığı ve sayılarının da düştüğü gözlenmiştir (54) Bu hücreler

hastalarda azalmış bağışıklık düzenleme kapasitesi gösterir ve uyarılmış T hücrelerinin Treg hücrelerine karşı dirençli olduğu görülmüştür. POMS hastalarında yapılan çalışmalarda, FOXP3+ Treg'lerinin normale göre daha hızlı yaşlandığı ileri sürülmüştür (39)

2.7.1.2 CD8+ T hücreleri

Naif CD8 T hücreleri adhezyon molekülü olan L-selektini (CD62L) ve kemokin reseptörü CCR7'yi ifade eder (55). Bu hücreler, ikincil lenf nodüllerinde antijen sunan hücrelerle (APC) etkileşime girerler. Eğer naif CD8 T hücresi spesifik antijeni tanımazsa, lenf düğümünü terk ederek dolaşım sistemine geri döner. Ancak bir CD8 T hücresi doğru şekilde sunulan peptit-MHC I kompleksiyle karşılaşırsa sitotoksik T lenfositlerine (STL) farklılaşana kadar çoğalmakta ve burada kalmaktadır. Farklılaşmasını tamamlamış hücreler endotel hücrelerine bağlanarak dokulara ekstravazasyon yapma yeteneği kazanırlar (55). Çoğu kanıt, MS'in başlamasında CD4+ T hücrelerinin kritik bir rol oynadığını gösterse de son çalışmalar CD8+ T hücrelerinin hastalığın seyrine katkıda bulunduğunu öne sürmektedir (44). Bu hücreler sağlıklı insan beyinlerinde de tespit edilmiş olsa da aktif veya kronik aktif MS ve meningeal MS lezyonlarında normalden çok daha fazladır (56). MS'in MHC sınıf I bölgesi ile ilişkisini gösteren genetik çalışmalar mevcuttur. Örneğin, *HLA-A*02:01* aleli MS riskini azaltırken, *HLA-A*03:01* aleli ise risk artışı ile ilişkilidir (ancak bu durumun HLA sınıf 2 ile bağlantı eşitsizliği ile ilişkili olduğunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır) (57). MS'teki CD8+ T hücreleri hakkında hala çok az şey bilinmekle birlikte MS lezyonlarında bol olması ve genellikle klonal çoğalması, SSS doku hasarında önemli bir rol oynayabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, aksonlar ve nöronlar MHC sınıf II moleküllerini ifade etmezler, ancak MHC sınıf I moleküllerini ifade ederler. Bu nedenle, CD4+ T hücrelerinin verdiği nöron hasarı dolaylı mekanizmalarla veya spesifik antijen tanımayı içermeyen etkileşimlerle gerçekleşirken, CD8+ T hücreleri nöronlar/aksonlar üzerindeki antijenleri doğrudan tanıyabilir ve bunlara zarar verebilir (44).

2.7.1.3 B hücreleri

Naif B lenfositleri, antijenler için reseptör işlevi gören membrana bağlı iki Ab sınıfını, IgM ve IgD'yi ifade eder. B lenfositlerinin aktivasyonu, çoğalmalarına, antijene özgü klonların genişlemesine ve Ab salgılayan plazma hücrelerine

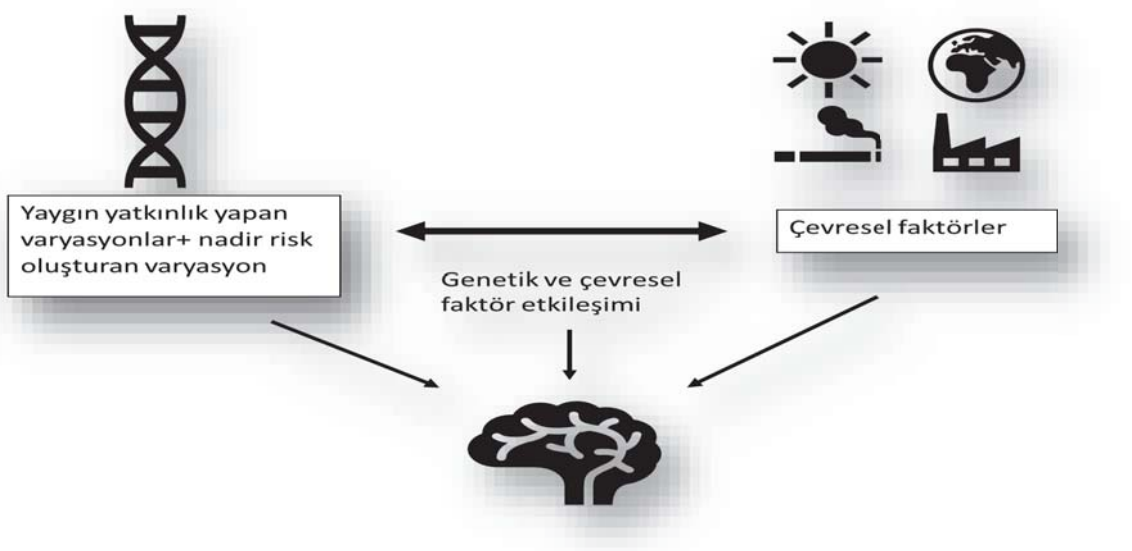
dönüşmelerine yol açar. Plazma hücrelerinin lezyonlardaki varlığı, BOS'da OKB saptanması, artmış Ig sentez oranları ve lezyonlarda Ig veya kompleman birikimi MS'in uzun zamandır bilinen özellikleridir. Araştırmalarda MS'li hastaların BOS'undaki B hücrelerinin transkriptomu ile aynı hastaların BOS'unda bulunan Ig proteomu eşleştiğini tespit etmiştir (58). Bu Ab'ların hedefleri tam olarak anlaşılamamış olsa da yapılan bir çalışmada her yerde bulunan hücre içi antijenleri hedeflediği bulunmuştur. Bu bulgu B hücrelerin hasarı başlatmaktan çok hasardan sonra oluşan antijenlere karşı yanıt verdiğini düşündürtmektedir (59). Anti-CD20 monoklonal antikoru rituksimab ile tedavi edilen hastalarda hem klinik hastalık aktivitesi hem de yeni MRI lezyonlarının oluşumu önemli ölçüde azalmaktadır. İlginç bir şekilde, bu etki, Ab üretiminin baskılanmasından çok daha önce ortaya çıkmaktadır. B hücrelerinin APC gibi davranarak ve proinflamatuar sitokinler üreterek T hücrelerini aktive ederek de MS patogenezinde rol aldığını düşündürtmektedir (60,61). Ayrıca SPMS hastalarının %40'ında bulunan lenfoid foliküllere benzeyen "tersiyer lenfoid yapılar" olarak adlandırılan meningeal lezyonlar, hastalığın ilerleyen dönemindeki bulgularda B hücrelerinin önemine işaret etmektedir (44).

2.7.2. Doğal Bağışıklık Sistemi ve MS

Monosit, CD14 ve/veya CD16 moleküllerini hücre yüzeylerinde taşırlar. Dolaşımdaki hücresel atıkları fagosite ederler ya da kemotaksis yoluyla dokulara göç ederek makrofajlara ya da monosit kaynaklı DC'lere farklılaşarak T hücrelerine antijen sunarlar Dokuda yerleşik mikroglialara ek olarak, makrofajlar akut inflamatuar MS lezyonlarında en bol bulunan hücre tipleridir (56). MS lezyonlarında aktive olmuş makrofaj/mikroglialar ile dejenere olmuş aksonlar ve oligodendrositler arasında yakın ilişki gözlenmiştir. ROS ve nitrik oksit (NO) gibi reaktif nitrit türleri MS ve EAE lezyonlarında aktif makrofaj/ mikroglialar tarafından üretilmekte ve inflamasyonun şiddeti ile korelasyon göstermektedir (44).

2.8.Etiyoloji

MS'in kesin nedeni halen bilinmemekle birlikte, genetik yatkınlığı olan bireylerde çeşitli çevresel faktörlerin etkileşimi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir. Vitamin D eksikliği, iklim ve coğrafik koşullar, EBV başta olmak üzere çeşitli bakteriyel ve viral enfeksiyonlar, sigara kullanımı genetik yatkınlığa eşlik eden çevresel faktörlerden bazılarıdır (8) (Şekil 1).



Şekil 1. Multipl skleroz, genetik ve çevresel faktörlerin birleşimi ve bunların etkileşiminden kaynaklanır

2.8.1. Çevresel Faktörler

MS'e yatkınlıkta kalıtım önemli rol oynarken, çevresel faktörler de etkilidir (62). Bunu gösteren en önemli kanıtlardan biri MS prevalansının coğrafi dağılımıdır (2). MS, İskandinav ülkeleri, Kanada ve İskoçya'da yaygınken, ekvator bölgelerinde nadirdir (63). Ancak yapılan bazı meta-analizler enlemin dağılımda önemli olmadığı yönündedir (64). Göç çalışmaları da çevresel faktörlerin rolünü desteklemektedir. Bu çalışmalarda 15 yaşından önce göç edenlerin gittiği bölgenin riskini taşıdığı, 15 yaşından sonra göç edenlerin ise geldikleri bölgenin riskini taşıdığı görülmüştür. Bu bulgular, özellikle çocukluk çağında maruz kalınan çevresel faktörlerin önemine işaret etmektedir (65).

MS'te D vitamininin koruyucu bir rol oynadığı düşünülmektedir ve bu da MS'in coğrafi dağılımını kısmen açıklayabilir; D vitamini sentezi için gerekli olan güneş ışığını az alan bölgelerde MS daha sık görülür. Büyük bir prospektif çalışmada, serum 25-hidroksivitamin D düzeyleri arttıkça MS riskinin azaldığı ortaya konulmuştur. Çok sayıda bağımsız prospektif çalışmada yetişkinlerde diyet veya takviye yoluyla D vitamini alımı ile gelecekteki MS riski arasında ters bir ilişki bulunmuştur. Prospektif ve retrospektif çalışmalar, 25-hidroksivitamin D seviyesi ile MS hastalarının klinik seyri arasında ters bir ilişki olduğunu göstermektedir (66).

MS için bir diğer faktör, enfeksiyöz ajanlardır. Şu ana kadar birçok enfeksiyöz ajan suçlanmışsa da tam olarak hangisinin sebep olduğu bilinmemektedir. Ancak en güçlü aday EBV'dir. MS hastalarında seropozitiflik oranı %100 iken genel popülasyonda yaklaşık %90'dır. MS hastalarında latent EBV daha sık reaktive olur ve bu reaktivasyon nükslerle korelasyon gösterir. MS hastalarında enfeksiyöz mononükleoz öyküsünün daha yaygın olduğu ve genç yaşta enfeksiyöz mononükleoz geçiren bireylerde MS gelişme riskinin daha yüksek olduğu bildirilmiştir (8). 10 milyondan fazla genç yetişkinde yapılan bir çalışmada, EBV ile enfekte olmanın MS riskini 32 kat arttırdığı gösterilmiştir (67). EBV epitoplarının sinir sistemi peptitleri ile benzerlikler göstermesi EBV'nin, MS patogenezini "moleküler taklit" yoluyla tetikleyebileceği düşündürtmektedir. Ayrıca EBV B hücrelerini ölümsüzleştirmektedir. Bu da MS'te antijen sunan veya antikor üreten otoreaktif B hücrelerinin sayısının artmasına sebep olabileceği anlamına gelmektedir (68). Alternatif bir teori, EBV ile enfekte B hücrelerinin SSS'ne daha fazla infiltrasyon göstermesidir (44).

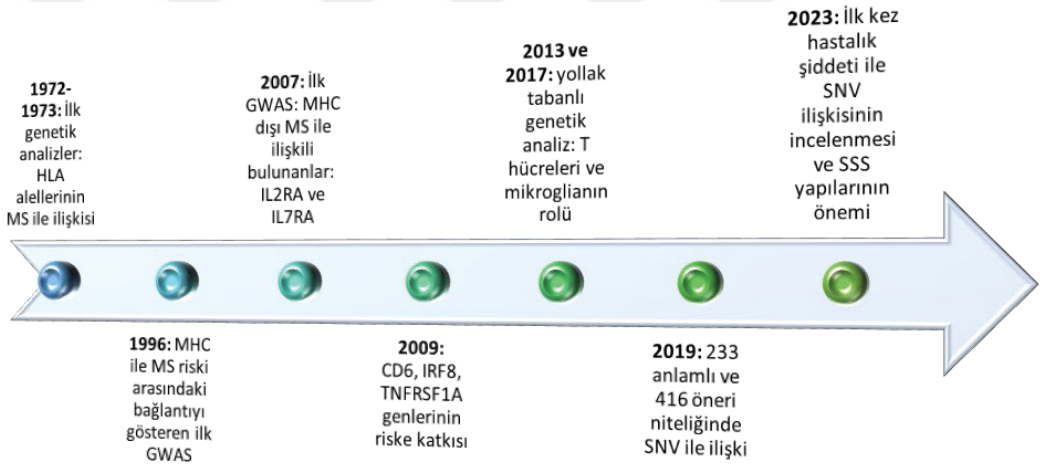
Literatürde sigara içmenin MS riskini artırdığına dair önemli bulgular mevcuttur. Bir meta-analiz, sigara paket-yılı ile MS riski arasında doz-yanıt ilişkisi olduğunu ortaya koymaktadır (69). Bir başka meta-analizde sigara içmenin hem MS riskini hem de SPMS riskini arttırdığına dair istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki tespit edilmiştir (70). Sigara içiminin solunum sisteminde inflamatuar bir ortamı teşvik ettiği, çapraz reaktivite yoluyla otoreaktif lenfositleri uyardığı ve KBB bozulmasını teşvik ettiği varsayılmaktadır (16).

2.8.2. MS ve Genetik Etiyoloji

Epidemiyolojik çalışmalar, MS hastalarının yakın akrabalarında MS gelişme riskinin normal popülasyona göre önemli ölçüde daha yüksek olduğunu göstermektedir. 2021 yılında yapılan meta analiz çalışmasında vakaların yaklaşık %11,8'inin ailesel olduğu tespit edilmiştir. Bu sayı çocukluk çağı başlangıçlı MS vakalarında daha yüksektir (9). Normal popülasyon için MS'e yakalanma olasılığı %0,3 iken birinci derece akrabasında MS tanısı olan bireylerde bu olasılık %2-4'lere kadar çıkmaktadır (71). Monozigot ikizlerde yapılan çalışmalar, bir ikizde MS varsa diğerinde MS gelişme riski yaklaşık %25 iken dizigotik ikizlerde bu riskin %5 olduğu bildirilmektedir (62). Biyolojik olmayan ebeveynlerde, kardeşlerde ve çocuklarda MS

sıklığı genel popülasyondaki riskten daha yüksek değildir. Üvey kardeşler için risk de biyolojik kardeşlerden daha düşüktür. Birlikte veya ayrı yetiştirilen üvey kardeşler arasında MS riski açısından herhangi bir fark gözlemlenmemiştir. MS'li çiftlerin çocuklarında ise MS riski, tek etkilenen ebeveynin çocuğuna göre daha yüksektir (72). Bu aile çalışmaları ve vakaların ailesel yığılımı MS patolojisinde genetiğin rolü olduğunu göstermektedir.

MS'e genetik yatkınlığa neden olan genomik bölgeleri ve varyasyonları belirlemek için geçmişten günümüze farklı yaklaşım ve yöntemler kullanılmaktadır. MS gibi poligenik kalıtım modeline sahip hastalıklarda genetik varyasyonların bulunması için bağlantı analizi, ilişkilendirme analizi, etkilenmiş bireylerde genom dizileme yapılmaktadır. Geçmişten günümüze yapılan önemli çalışmalar Şekil 2'de özetlenmektedir.



Şekil 2:MS genetik çalışmaların kronolojik sıralaması

2.8.2.1 Bağlantı Analizleri

MS'e yatkınlık oluşturan lokusları belirlemek için bağlantı analizleri geçmişten günümüze kullanılmaktadır. Kanadalı, Amerikalı ve İngiliz araştırmacılar mikrosatellit polimorfizmleri kullanarak çok sayıda etkilenmiş kardeş çifti üzerinde tüm genom boyu bağlantı analizleri yaparak ilgili lokusları araştırmışlardır. Dördüncü bir grup ise 16 Finlandiyalı ailenin genomik taramasını yapmıştır. Her çalışmada farklı belirteç setleri, farklı örneklem büyüklükleri ve farklı anlamlılık düzeyleri kullanılmış olması sonuçların birleştirilmesini zorlaştırmaktadır. Ancak, bu çalışmalar MS'e yatkınlık oluşturan gen bölgelerinin nerede yer aldığına dair genel bir fikir

vermektedir. Dört grupta da MHC bölgesini (6p21) içeren 6. kromozom istatiksel olarak anlamlı olmasa da suçlanmıştır. Diğer sorumlu olduğu düşünülen lokuslar ise şunlardır:

- 3q21-24 (Amerika, Kanada, İskandinavya, Avustralya ve Finlandiya çalışmalarında)
- 18p11 (Avustralya, Finlandiya, Kanada ve Amerika çalışmalarında)
- 17q22 (Kanada, Finlandiya, İngiltere çalışmalarında)'dir (73).

MHC gen bölgesi ile MS arasındaki ilişki yarım asırdan fazladır bilinmektedir. İlk çalışmalar HLA sınıf I antijenleri A3 ve B79 ilişkili olduğu yönündedir ve bu çalışmaları takiben HLA sınıf II polimorfizmleri Dw2 ve DR2 ile de bir ilişki saptanmıştır. Daha sonrasında *HLA DRB1*1501 DQA1*0102* ve *DQB1*0602* haplotipi ile güçlü ve tutarlı bir ilişki bulunmuştur (73). Günümüzde bu haplotip ile ilişkinin *HLA-DRB1*15:01* aleli tarafından yönlendirildiği ve bu haplotipin diğer alelleri ile ilişkinin yalnızca *HLA-DRB1*15:01* ile bağlantı dengesizliğine bağlı olduğu açıktır (11). Ayrıca bu çalışmalarda sınıf 1 bölgesi aleli olan *HLA-A*02:01* koruyucu bir etkiye sahip olduğu bulunmuştur (43,74).

2.8.2.2 İlişkilendirme Çalışmaları

Gen-gen ve gen-çevre etkileşimleri ile ortaya çıkan Mendelyen kalıtım modeline uymayan MS gibi multifaktöriyel hastalıklar için sıklıkla GWAS'lar yürütülmektedir. İnsan Genom Projesi'nin tamamlanmasının ardından tüm genom boyunca popülasyona özgü hastalıkla ilişkili lokusların araştırılmasında binlerce vakanın dahil edildiği GWAS'lar hız kazandı. MS için ilk GWAS, 2007 yılında IMSGC tarafından iki aşamada yapılmıştır. İlk aşamada, etkilenmiş ebeveyn ve çocuklardan oluşan toplam 931 ailenin ortak varyasyonlarını tanımlamak için mikroarray kullanılmıştır. Ardından ilk aşamada seçilen 110 SNV'nin dağılımını analiz etmek için 609 üç vakalı MS aile, 2.322 vaka ve 789 kontrol olmak üzere toplam 12.360 bireyli bir kohort oluşturulmuştur. Bu çalışmada, *IL2RA* ve *IL7RA* genleri üzerindeki iki SNV'nin MS ile ilişkili olduğunu ortaya konulmuştur (75). 2011 yılına kadar orta güçteki (yeterli örneklem içermeyen) GWAS'la 20'den fazla ek risk lokusu tanımlanmıştır. Aslında bu veriler birden fazla varyasyonun hastalığa yatkınlıkta kilit bir role sahip olduğunu göstermektedir. Bu sebeple IMSGC tarafından 2011 yılında

9.772 MS hastası 17.376 kontrol hastası, 465.434 otozomal SNV ile analiz edildiğinde MS için 29 yeni risk lokusu belirlenmiştir. Bu çalışmada bulunan bölgelerin çoğu CD4+ T hücreleri ile ilişkilidir (43). Bu çalışmayı takiben yapılan GWAS'da 48 yeni duyarlılık aleli daha keşfedilmiş ve MHC dışı 103 farklı lokusta MS için 110 risk varyasyonu güvenilir bir şekilde tanımlanmıştır (76).

Yeni nesil dizileme (Next Generation Sequencing, NGS) teknolojisinin gelişmesiyle birlikte, IMSGC, MS için daha fazla SNV içeren GWAS'lar yürütmektedir. Bu çalışmalardan 2017 yılında yapılan da toplamda 32 MHC varyasyonu, 200 MHC dışı otozomal varyasyon ve 1 X kromozomu varyasyonu MS ile ilişkilendirilmştir (77). Bu sonuçlarla yapılan yolak analizlerinde, başta monositler olmak üzere diğer immün hücreleri ile ilgili hücresel yolakların hastalık patogenezinde sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Monosit/makrofaj/mikroglia ekseninin otoimmün sürecin SSS'ye yönlendirilmesinde kilit bir oyuncu olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca SSS yolaklarının MS riskine daha küçük ancak ihmal edilemez katkısı aynı çalışmada ortaya konulmuştur (78). 2019 yılındaki çalışmada 47.429 MS hastası ve 68.374 kontrolün genotip verileri ile duyarlılık varyasyonların fonksiyonel etkileri araştırılmıştır. Daha önce doğrulanmış 233 anlamlı MS ilişkisine ek olarak, istatistiksel anlamlılık düzeyine ulaşmayan ancak MS ile ilişkili olduğu öne sürülebilecek 416 ek varyasyon tanımlanmıştır. Bu çalışmada, MS için tanımlanan tüm ortak varyasyonların kümülatif olarak MS kalıtımsallığının %48'ini oluşturduğu öngörülmüştür. Yine bu çalışmada nöronlar, astrositler ve mikroglialardan elde edilen veriler analiz edildiğinde, MS ile ilişkili lokusların mikroglialar ilişkili olduğu görülmüştür. Ek olarak yapılan korteks RNA-seq veri analizi, bazı duyarlılık varyasyonlarının kortekste gen ifadesini etkilediğini ancak bağışıklık hücrelerinde etkilemediğini ortaya koymuştur (11).

Son GWAS çalışmasında, Avrupa kökenli 12.584 MS hastasının 7,8 milyon otozomal SNV'si ve genişletilmiş özürlülük durum ölçeği (Expanded Disability Status Scale-EDSS: MS'te engellilik düzeyini belirlenmesini sağlayan bir ölçeklendirme) puanları arasındaki ilişkiyi irdeleyerek, MS ilerlemesi ile ilişkili lokuslar belirlenmeye çalışılmıştır. Bu analizde DYSF-ZNF638 lokusundaki rs10191329 varyasyonu anlamlı olarak MS ilerlemesi ile ilişkili bulunmuştur. Risk alelini homozigot taşıyanlarda yürüme yardımına ihtiyaç duyma süresinde medyan 3,7 yıllık bir kısalma

gözlenmiş ve beyin sapı, kortikal bölgelerinde patolojik lezyon sayısının daha fazla olduğu belirlenmiştir. Ayrıca DNM3-PIGC lokusundaki rs149097173 da hastalığın ağır seyri ile anlamlı ilişki görülmüştür. Bu varyasyonların SSS dokularında daha fazla eksprese olması, diğer GWAS çalışmalarından farklı olarak MS patolojisinde SSS elemanlarının da önemli bir rol oynadığını ortaya koymaktadır (79).

2.8.2.3 Nadir Varyasyon Analizi

GWAS yaklaşımı, popülasyonda %1'den fazla sıklığa sahip olan ve MS riski üzerinde düşük-orta düzeyde etkisi olan yaygın varyasyonları aydınlatmada oldukça başarılıdır. Ancak bu yöntem, hastalık riski üzerinde yüksek etkiye sahip olabilecek nadir varyasyonları belirlemek için uygun değildir. Ekzom dizileme analizlerinin gelişmesi ve yaygınlaşmasıyla birlikte, MS kalıtımsallığındaki bilgi açığını kapatmak ve etki eden nadir varyasyonları tespit etmek için birçok çalışma yapılmaktadır. 2018 yılında IMSGC tarafından yapılan bir çalışmada, 32.367 MS vakası ve 36.012 kontrolde 120.991 düşük frekanslı (<%5), kodlanan bölgedeki varyasyonlar incelenmiştir. Bu çalışmada, *GALC, TYK2, PRF1, PRKRA, NLRP8* ve *HDAC7* genlerindeki 7 düşük frekanslı varyasyonun MS ile önemli ölçüde ilişkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca varyasyonların frekansı ile risk katkısı arasında negatif bir korelasyon mevcut olduğu görülmüştür. Çalışma grubu tüm düşük frekanslı varyasyonların MS riski üzerindeki kümülatif etkisini hesaplayarak MS kalıtımsallığının %5'ine kadarının bu varyasyonlar tarafından açıklanabileceğini ortaya koymuştur. Bu çalışmada, daha önce GWAS çalışmalarında MS ile ilişkisi belirtilmeyen dört yeni gen keşfedilmiştir. Bu genlerin CD4+ T hücresi farklılaşmasını düzenlemesi, IFN-γ biyolojisi ve NFkB sinyali gibi önemli biyolojik süreçlerde kilit rolleri olduğu bilinmektedir (80).

Nadir varyasyonların tespitinde genetik yükün daha fazla olduğu düşünülen birden fazla MS olguları olan aileler seçilmektedir. Şiddetli ve ilerleyici MS'in görüldüğü iki farklı aileden yedi MS hastasında bağlantılı bölgeler tespit edilerek bu bölgeler dizilenmiştir. Bu analiz sonucunda ligand bağımlı transkripsiyonel aktivasyon aktivitesi sergileyen nükleer reseptör olan NR1H3 proteininde p.Arg415Gln amino asit (aa) değişikliği yapan varyasyon hastalarda ortak bulunmuştur. Bu aa yüksek oranda korunan bölgede yer aldığı için bu değişikliğin NR1H3 heterodimerizasyonunu ve hedef genlerin transkripsiyonel aktivasyonunu

bozduğu düşünülmüştür. Ancak bu çalışmada *NR1H3* genindeki yaygın varyasyonların ilişkilendirme analizlerinde risk arttığı bulunduğu iddia edilse de IMSGC tarafından bu bilgi doğrulanmamıştır (81,82). 11 MS olgusu bulunan bir ailede yapılan bağlantı analizi sonucunda, bu ailedeki vakaların ortak kalıtılan genom bölgesi 7q11.22-q11.23 olarak tespit edilmiştir. Daha sonra etkilenmiş 4 bireye yapılan WES analizinde bu bölgede bulunan *FKBP6* geninde nadir yanlış anlamlı bir varyasyon hastalıkla ilişkilendirilmiştir (14). Günümüzde bu gendeki bialelik fonksiyon kaybı mutasyonlarının erkek infertilitesi ile sebep olduğu bildirilmektedir (83). İkiden fazla vakası olan 34 MS ailesindeki 132 hasta ile gerçekleştirilen bir ekzom dizileme analizinde, 12 gende muhtemel patojenik nadir varyasyonlar tanımlanmıştır. Bu genler inflamasom toplanmasında (*NLRP12*), Wnt sinyal yolağında (*UBR2, CTNNA3, NFATC2, RNF213*), fibrinoliz ve kompleman yolaklarında (*PLAU, MASP1, C2*), nükleer reseptör kompleks proteini olarak (*NCOA3*) ve katyon kanalı olarak (*KCNG4, SLC24A6, SLC8B1*) görev almaktadır (84). MS prevelansının yüksek olduğu Sardunya adasında bulunan ailesel MS'li olgulara yönelik yapılan genetik araştırmada ise etkilenmiş bireylerde *CUL9, TTBK1, PPP2R5D, MYO16, TNFSF13B, ATP9A* genlerinde protein işlev kaybına yol açabilecek nadir varyasyonlar saptanmıştır (13). Birden fazla nesilde ve üçden fazla MS hastası olan üç İranlı ailede nadir varyasyon tespiti için yapılan WES analizinde *POLD2* ve *NBFP1* genlerinde nadir yanlış anlamlı varyasyonlar hastalıkla ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu çalışmada moleküler dinamik analizle *POLD2* genindeki varyasyonun protein fonksiyonunu bozduğu gösterilmektedir (85). İtalya'da yürütülen bir çalışmada, 3 veya daha fazla MS vakası bulunan 28 aileden 81 MS hastası, 42 aile üyesi ve 38 sağlıklı bireyi içeren bir kohort grubu çalışılmıştır. Tüm hasta bireyleri içeren bir gruba bağlantı analizi ile ortak lokuslar tespit edilmiştir. 5 etkilenmiş bireye ekzom dizilemesi ve bir indeks vakaya da tüm genom dizilemesi yapılmış ve toplamda 34 gen belirlenmiştir. Daha sonra ana gruptaki bireylerde bu genlerdeki mutasyon yükü bakılmıştır. Sonuçta hastalarda 14 gende nadir varyasyonların sıklığının kontrol grubuna kıyasla önemli ölçüde arttığı saptanmıştır (86). Aynı grupta yürütülen bir başka çalışma da ise tüm etkilenmiş bireylere WES yapıldıktan sonra nadir ve düşük frekanslı varyasyonlar, aile segregasyonuna, tahmin programlarına, yolak bilgilerine göre filtrelenmiştir. Ardından bu genlerde yük testi uygulanmaktadır. Yük testi sonucunda 11 gende (*UBR2, MYBPC3, LEF1, PCNXL3, EFCAB13, MLC1, IDE, ECD, NSD1, JARID2 ve*

METTL21B) MS'li bireylerin, etkilenmemiş bireylere kıyasla nadir ve genin işlevini bozduğu düşünülen varyasyon yükünün arttığı belirlemiştir. Bunlar arasında Wnt/β-katenin yolağının modülasyonunda yer alan *UBR2* geni bir başka MS çalışmasında da aday gen olarak gösterilmektedir (84,87).

2.8.2.4 Türkiye'deki Genetik Çalışmalar

Türkiye'de MS'in genetik etiyolojisini araştırmaya yönelik sınırlı sayıda çalışma mevcuttur. Kamışlı ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada, 164 MS hastası ve 146 normal sağlıklı kontrolde *VDR* genindeki rs731236, rs7975232 ve rs2228570 varyasyonları araştırılmıştır. Sonuçlar, rs731236 varyasyonunun MS hastalarında daha sık bulunduğu yönündedir (88). Başka bir çalışmada ise 125 MS hastası ve 160 sağlıklı kontrol, *IL-4* geni intron 3 yerleşimli değişken sayıda ardarda tekrar (VNTR) varyasyon bölgesinin P1 ve P2 alelleri açısından değerlendirilmektedir. Hasta grubu ile kontrol grubu arasında anlamlı bir farklılık saptanmamıştır (89). 409 MS hastası ve 256 sağlıklı bireyden yapılan bir çalışmada, *IL-1A* geninin kodlama yapmayan bölgesinde yer alan rs1800587, *IL-1B* geninin rs16944 ve *IL-1B* geninin rs1143634 numaralı varyasyonu ile *IL-1RN'*de bulunan bir VNTR bölgesi araştırılmıştır. Hasta grubunda *IL-1B* polimorfizmlerinin daha az sıklıkta bulunduğu gözlemlenmiştir (90). *IL18* genotiplerinin çalışıldığı bir çalışmada ise *IL18* geninin 137 nükleotid 5' upstream pozisyonundaki CC genotipinin GG genotipine göre MS riskini 3 kat arttırdığı tespit edilmiştir (91). Şimşek ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise 364 MS hastası ve 191 sağlıklı kontrolün *IL7R*'nin promotöründe yer alan üç polimorfizm bölgesi değerlendirilmiştir. Sonuçlar bazı alellerin frekansının MS hastalığının alt gruplarında daha sık olduğunu göstermiştir. Özellikle genin 449 nükleotid 5' upstream bölgesindeki AA aleli çocukluk çağı başlangıçlı MS'li bireylerde daha sık bulunmuştur (92).

Türkiye'de MS üzerine yapılan çalışmalarda genel olarak MS hastaları ile sağlıklı kontroller arasında belli varyasyonların sıklık farklılıkları araştırılmıştır. Hastalığa neden olabilecek nadir varyasyonların tespitine yönelik çalışmalar ise oldukça sınırlıdır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada birden fazla MS olgusu olan 7 ailede (toplam 25 MS hastası ve 31 etkilenmemiş birey) hasta bireyler arasında ortak genomik bölgeler belirlenerek bu bölgelerdeki nadir varyasyonların hastalık ile ilişkisi irdelenmiştir. Ayrıca bu çalışmada GWAS'larda MS ile ilişkili olduğu belirlenen

SNV'ler kullanılarak poligenik risk skoru hesaplanmıştır. Ailesel MS vakaları, sporadik MS vakaları ve normal kontrol bireyler arasında karşılaştırma yapılmış ve ailesel olgularda poligenik risk skoru yüksek tespit edilmiştir (93).

2.9.Tüm Ekzom Dizileme

İnsan genom projesinin tamamlanması ile genomun %2'sinden azının protein kodladığı ve yaklaşık 20 000 protein kodlayan genin bulunduğu görüldü (94). Ekzon kelimesi "ifade olan bölge" anlamına gelmektedir. Ekzom terimi ise genom içerisinde bulunan tüm protein kodlayan dizileri yani ekzon bölgelerinin tümünü ifade eder (95). WES insan genomundaki yaklaşık 180.000 ekzonun ve bu ekzonların intron birleşim bölgelerini kapsayacak şekilde dizilenmesidir (96). WES'te bireye ait tüm kodlayan gen bölgelerindeki ekzonların nükleotid dizilimleri eş zamanlı olarak belirlenir ve referans genomdan farklılık gösteren nükleotidler (varyasyonlar) ortaya koyulur. Bu yöntemle SNV'ler, küçük delesyon, duplikasyon ve insersiyonlar saptanabilir.

Mendeliyen hastalıklara sebep olan bilinen patojenik değişimlerin yaklaşık %85'i genomun ekzon bölgelerinde yer almaktadır. Ekzom dizileme genomun protein kodlayan segmentlerinin taranmasına yoğunlaşarak hastalıklarda rol oynayan varyasyonları hızlı bir şekilde bulunmasını sağlamaktadır. Analizlerde özellikle kodlama yapmayan bölgelere veya yapısal varyasyona odaklanılmayacaksa, etkilenmiş bireylerde öncelikle WES çalışmak hem iş gücünü hem de maddi yükü azaltmaktadır (95).

Nadir varyasyonlar bir hastalığın patogenezinde rol oynayan yolakları aydınlatmak için çok önemlidir. Aday genlerin ilişkili olduğu yolakların incelenmesi, protein-protein ilişkisi ve hücredeki fonksiyonu hastalığın tedavi çalışmaları için aydınlatıcı rol oynamaktadır. Ayrıca kişiselleştirilmiş tıp yaklaşımları giderek önem kazanmaktadır. Bu bakımdan hasta bireylerde bulunun nadir varyasyonlar tedavi planlanmaları için çok önemlidir. Bu yüzden multifaktöriyel hastalıklarda da WES analizleri giderek yaygınlaşmaktadır (97,98).

Bu çalışmanın amacı multifaktöriyel bir hastalık olan MS'in patogenezinde rol oynayan genlerin tespitidir. Bu amaçla hastalığın nadir bir grubu olan ailesel POMS vakalarında MS ile ilişkili nöroinflamasyon/nörolojik yolaklardaki genlerin varyasyon profilleri belirlenecektir. Ayrıca her ailede belirlenen nadir ortak varyasyonlar ile

yolak analizleri yapılarak hastalık ile ilişkili olabilecek olası yolaklar tespit edilmesi amaçlanmaktadır.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1.Hasta Seçimi

Çalışmaya İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Polikliniğine başvuran ve Çocuk Nöroloji bilim dalında MS tanısı ile takip edilen POMS hastalarından birinci, ikinci veya üçüncü derece akrabalarında MS tanısı olan 5 olgu ve MS tanılı en yakın akrabası dahil edildi. MS tanısı, 2017 yılında revize edilmiş McDonald kriterlerine göre Çocuk Nöroloji bilim dalı ve Nöroloji A.D tarafından konuldu.

Çalışma İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Etik Kurul'u tarafınca 08.08.2023 tarihli toplantıda onaylanmıştır (754378 sayılı karar). Tüm hastalar ve vasileri ile yüz yüze görüşülerek çalışma hakkında bilgi verildi, çalışmanın kapsamını detayları ile anlatan gönüllü onam formu imzalatıldı.

3.2.DNA izolasyonu ve Kantitasyonu

Hasta ve ailelesinde etkilenmiş diğer bireyden EDTA'lı tüpe alınan kan örneklerinden standart kit protokolüne uygun olarak DNA izole edildi, DNA miktarı Nanodrop 1000 cihazı ile ölçüldü. DNA izolasyonu yapıldıktan sonra yeterli örneği olan hastaların arta kalan örnekleri ileri analizler için -80'de saklandı.

3.2.1. Genomik DNA izolasyonu

Spin kolon yöntemi:

1. 1,5 ml'lik ependorf tüpe 500 µl örnek kanı konulduktan sonra her bir örnek üzerine 20 µl Proteinaz K solüsyonu ve 200 µl Buffer BL dağıtıldı ve 56°C 10 dakika (dk) bekletilmiştir.

2. İnkubasyon bittikten sonra her bir örneğin üstüne 200 µl -20°C bekletilen %80 etanol eklendi ve örnekler vortekslendi.

3. Örnekler spin kolonlara aktarıldıktan sonra 6000 rcf'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolonların altındaki toplayıcı tüpe süzülen süpernatant atıldı ve spin kolonlar yeni toplayıcı tüplere aktarıldı.

4. Spin kolonların üzerine 600 µl Buffer BW eklendi ve 6 000 rcf'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolonların altındaki toplayıcı tüpe süzülen süpernatant atıldı ve spin kolonlar yeni toplayıcı tüplere aktarıldı.

5. Spin kolonların üzerine 700 µl Buffer TW eklendi ve 6 000 rcf'de 1 dk santrifüj edildi. Spin kolonların altındaki toplayıcı tüpe süzülen süpernatant atıldı ve spin kolonlar DNA saklanacağı 1,5 ml'lik ependorf tüplere aktarıldı.

6. Spin kolonların üzerine önceden 56°C ısıtılmış 100 µl Buffer AE eklendi, 1 dk oda sıcaklığında beklendikten sonra 13 000 rcf'de 1 dk santrifüj edildi. Santrifüj sonrası spin kolonlar atılarak elde edilen örnekler -20°C saklanmak için kaldırıldı.

3.2.2. DNA Kantitasyonu

DNA izolasyonundan sonra NanoDrop ND1000® Spektrofotometre ile DNA'nın 260 nm dalga boyunda ışığı absorbe etme özelliğinden yararlanarak örneklerin DNA miktar tayini yapıldı. Saf su ölçümünden sonra örneklerden tek tek 1 µl alınarak ölçüm yapıldı. Proteinler 280 nm dalga boyundaki ışığı absorbe ettiğinden dolayı örneklerin A260/A280 oranının 1.8–2.0 arasında olmasına dikkat edildi. Tablo 4'da örneklerin Nanodrop ölçümlerin sonuçları görülmektedir.

Tablo 4. Örneklerin Nanodrop ölçümleri

Örnek	Nükleik Asit (ng/µl)	A_{260}/A_{280}
A1H1	41,5	1,8
A1H2	38,1	1,8
A2H1	44,3	1,8
A2H2	37,7	1,8
A3H1	59,5	1,8
A3H2	31,9	1,8
A4H1	66,2	1,8
A4H2	81	1,9
A5H1	53,2	1,9
A5H2	71,5	1,8

3.3.Tüm Ekzom Dizileme

Tüm ekzom dizileme için bu tez çalışmasında, hedef yakalama ve zenginleştirme (target capture and enrichment) prensibiyle çalışan "Twist Target Enrichment Standard Hybridization v1 kiti" üretici firmanın direktifleri doğrultusunda kullanıldı (kütüphane hazırlama). Daha sonrasında hazırlanan kütüphane flowcell yüklenerek dizileme için MGISEQ-2000 dizileme platformuna uygun şekilde yüklenildi (sekanslama). MGISEQ-2000 platformundan elde edilen ham veriden varyasyonların listelenmesi için bir dizi dosya çevirimi ve biyoinformatik analizin yapılması gerekmektedir. Bu amaçla, standart ya da ileri düzey biyoinformatik veri analizleri kullanılarak cihazdan elde edilen veriden, WES analizinin yapılabildiği "Variant Calling Format (VCF)" dosyası elde edildi (biyoinformatik analiz).

3.3.1. Kütüphane Hazırlanması

Zenginleştirilmiş hedefli kütüphane hazırlama aşamaları özetle 5 teknik aşama içerir; hibridizasyon için kütüphanelerin hazırlanması, (fragmantasyon, açık uç onarımı, A ucu takılması, adaptör ligasyonu), "Capture" probları ile kütüphanenin hibridizasyonu, hibridize olan "target" bölgelerin streptavidin boncuk ile izolasyonu, post-capture polimeraz zincir reaksiyon (polymerase chain reaction, PCR) ile amplifikasyonu ve pürifikasyonu ve elde edilen örneklerin flowcell yüklenmesidir.

1. DNA örnekleri çalışma öncesinde oda sıcaklığına çıkarıldı ve miktarları çift iplikçi sağlam DNA'ya floresans bir boyanın bağlanması ve bu boyanın yaptığı ışımanın Qubit Fluorometer tarafından okunması ile ölçüldü. Daha sonra örnek miktarlarını çalışmaya uygun hale getirmek için sulandırma yapıldı.

2. 300 bp fragmanların eldesi için örnekler Frag/AT Enzimi ile PCR cihazında 37°C 10 dk inkübe edildi. Süre bitiminin hemen ardından örnekler soğuk rack üzerine alındı.

3. Açık uç onarımı, A ucu takılması, adaptör ligasyonu için PCR ürünlerine Twist Universal Adaptör eklendi. Pipetaj yapılarak homojenize olması sağlandı. Daha sonrasında Ligasyon Master Mix eklenir ve pipetaj yapılarak 20 °C'de 15 dk adaptörler eklendi.

4. Pürifikasyon işlemi için manyetik boncuk çözeltisi işlemlerden önce 30 dakika oda sıcaklığına bekletildi. 2 ml'lik ependorf tüplerine her örnek için eklenen DNA volümünün 1,8 katı manyetik boncuk çözeltisi dağıtıldı. Üzerine fragmantasyon basamağı sonrası elde edilen DNA ürünleri eklendi. Vorteks ve spin yöntemleri ile homojenizasyon sağlandı. Manyetik boncukların DNA'ya bağlanmasını sağlamak amacıyla 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından tüpler manyetik standa yerleştirildi ve sıvı şeffaf olduğunda magnetik boncuklar oynatılmadan dikkatlice süpernatant kısım pipetle atıldı. Tüpler manyetik stand üzerindeyken her tüpe 500 µL %80'lik etanol ilave edildi. Otuz saniye bekleme sonrası alkol pipetaj ile uzaklaştırıldı. Bu işlem toplam 2 kez daha tekrarlandı. Alkol tamamen buharlaşana kadar beklendi. Tüpler stand üzerindeyken nükleaz içermeyen su eklendi ve stanttan alındı. Vorteks ve spin sonrası 2 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Tekrar standa yerleştirilip, çözeltinin şeffaflaşması sonrası süpernatant yeni tüplere alındı ve sonraki işlem için hazır hale geldi.

5. Örnek miktarını arttırmak için TWIST UDI Primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltma işlemi uygulandı.

6. Pürifikasyon işlemi yukardı belirtildiği şekilde yapıldı.

7. Prob Hibridizasyonu için kitin içerisinde bulunan Blok miks, Hibridizasyon miks ve Target 'Capture' probları ile hibridizasyon reaksiyon çözeltisi hazırlanıldı. Örnekler bu miksle 16 saat 65°C'de inkübe edildi.

8. Streptavidin bağlayıcı boncuklarına Binding Buffer ile 3 kez yıkandı. Hazırlanan Streptavidin bağlayıcı boncuklarının üzerine hibridizasyondan çıkan örnekler karıştırıcının üzerinde 30 dk yavaşça karıştırıldı. Daha sonrasında örnekler Wash Water 1 bir kez Wash Water 2 ile 3 kez olmak üzere yıkandı. En son yıkamadan sonra manyetik boncukların üzerine DNAz içermeyen su eklenerek çözdürüldü. Böylece hedef bölge yakalama işlemi(capture) tamamlandı.

9. Örnek miktarını arttırmak için TWIST UDI Primerleri kullanılarak PCR ile çoğaltma işlemi uygulandı.

10. Pürifikasyon işlemi yapıldı.

11. Örnekler miktar ölçümleri yapıldı ve miktarlar uygun şekilde eşitlendikten sonra DNA Rapid Ligase ile 37°C 30 dk PCR bırakıldı.

12. PCR sonrası soğuk rocka alınan örneklere digasyon mix 2 µl dağıtıldı ve tekrardan 37°C 30 dk PCR bırakıldı. Böylece örnekler tek iplikçikli hale getirildi.

13. Pürifikasyon aşaması yapıldı.

14. Bu aşamada DNA nanoball (DNB) yapımı işlemine geçildi. Make DNB Buffer örneklerin üzerine dağıtıldıktan ve vorteksten sonra 95°C 1dk ve 65°C 1dk olacak şekilde PCR konuldu. Make DNB Enzyme karışımı örneklere dağıtıldıktan sonra 30°C 25 dk bekletildi. Örneklere DNB Loading Buffer 2 ve Make DNB Enzyme Mix 2 ile yapılan DNB mixten dağıtıldı ve geniş uçlu pipetle pipetaj yapıldı. Bu aşamanın sonunda örnekler flowcell yüklemeye hazır hale geldi.

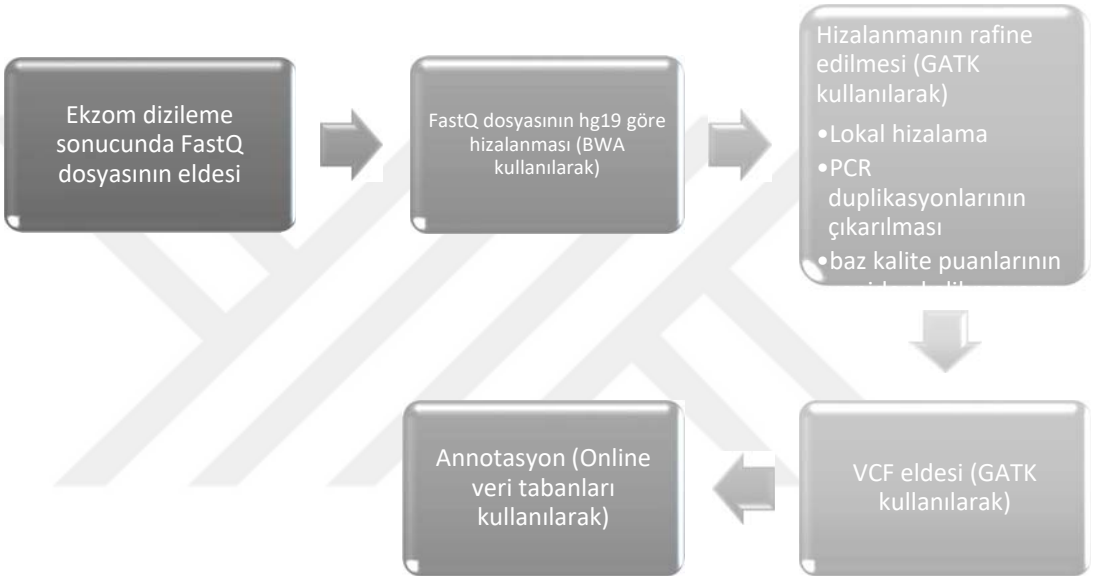
3.3.2. Sekans Aşaması

Her bir DNB, "flow cell" üzerinde bulunan spotlara yerleştirilerek sekanslama işlemi "flow cell" üzerinde gerçekleştirildi. Hazırlanan flowcell MGISEQ-2000 (MGI Tech Co. Ltd., Çin Halk Cumhuriyeti) dizileme platformuna yüklenildi ve aynı zamanda cihaza yüklenecek kartuşlar da uygun şekilde hazırlanıp cihaza yüklenildi. Tamamlanan dizileme işlemi sonrası veri cihazdan FastQ dosyası olarak alındı.

3.3.3. Biyoinformatik Aşaması

Elde edilen FastQ dosyası "Burrows-Wheeler Aligner (BWA) v0.7.15" (123) kullanılarak referansa "Human Genome 19 (hg19)" hizalandı (alignment). Referans dizisine göre okuma konumu bilgisi ve hizalama için bir güven değeri içeren "Sequence Alignment Map (SAM) (dizi hizalama haritası)" olarak adlandırılan bir dosya biçimi olarak hizalama çıktısı elde edildi. SAM'ın küçültülmüş boyutlu, ikili bir sürümü olan binary alignment map (BAM) biçimine dönüştürüldü. Açık kaynaklı yazılım programı Genome Analysis Tool Kit (GATK) kullanılarak PCR kopyaları olarak adlandırılan aynı başlangıç ve bitiş noktalarına sahip okumaların kaldırılması, indel çağrılarının doğruluğunu artırmak için yerel yeniden hizalanması (lokal reallignment) ve baz kalite puanlarının yeniden kalibrasyonu sağlandı ve rafine hizalama gerçekleştirildi. İlk ve rafine hizalamalardan sonra, varyasyonlar, varyasyonların kromozomal konumu, referans baz ve alternatif baz(lar) (örneğin, tek

nükleotid varyantı veya SNV, indel) dahil olmak üzere çeşitli parametreler içeren bir VCF formatına çevrildi. Referansa göre baz değişikliğinin kromozomal konumu, varyasyonun bir gende olup olmadığı ve ilgili konumu (örneğin, ekzon, intron, splice bölgesi), bir kodondaki değişikliğin sonucu (örneğin; eşanlamlı, yanlış anlamı, karşı çerçeve kayması, anlamsız) ve zigotluk (örneğin, homozigot veya heterozigot) gibi birçok özelliği annotasyon işlemi sonucunda elde edildi. Annotasyon için ücretli olan Genemaster, Pairend ve ücretsiz olan Fraklin Genoox online programları kullanıldı (99). Bu aşamalar Şekil 3'de özetlenmektedir.



Şekil 3: Biyoinformatik Analiz Şeması

3.3.4. WES datası Kalite Kontrolü Aşaması

Bu aşamada elde edilen verinin %80'nin kalite skorunun Q40 üstünde olması ve hedef bölgenin okuma derinliğinin 20X olmasına dikkat edildi. Aynı zamanda variyant isimlendirme kontrolu transisyon, transversiyon oranı (Ti/TV) ve heterezigotluğun referans olmayan homozigotluğa oranı (het/nonref-hom) değerlendirildi (100).

3.3.5. Klinik Analiz

Annote edilen varyasyonların hangisinin klinik önemli olduğunu anlamak için çeşitli filtremeler yapıldı. Öncelikle en az 20 okuma derinliği olan, heterozigot varyasyonlar için en az %20, homozigot varyasyonlar için ise en az %95 alel

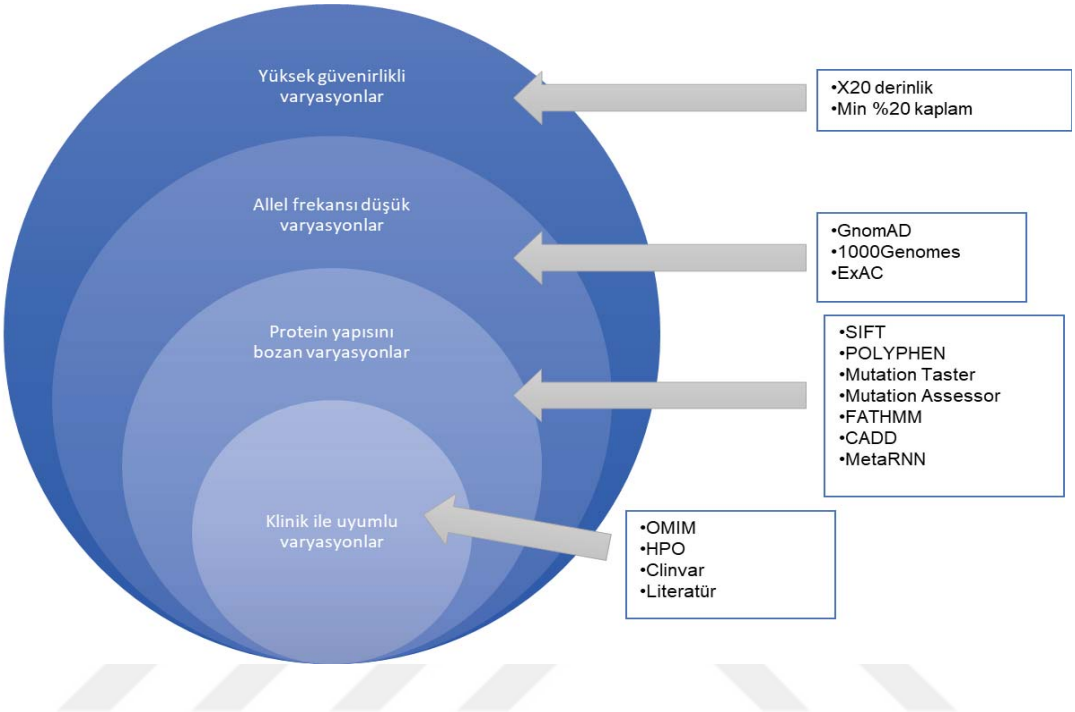
fraksiyonunda görülen varyasyonlar yüksek güvenirlikli varyasyonlar olarak değerlendirildi. Varyasyonları görsel olarak analiz etmek için "Integrative Genomics Viewer (IGV)" programı kullanıldı. RefSeq veri tabanında var olan transkriptler temel alınarak ekzonlarda ve kırpılma bölgelerinde (ekzon-intron sınırı, +10, -10 bp) yerleşen varyansyonlar ele alındı. GnomAD, 1000Genomes, ExAC göre toplumda görülme sıklığı %1 altında olan varyasyonlar önceliklendirildi ancak MS gibi multifaktöriyel hastalıklarda sık görülen SNV'lerin yatkınlığa katkı yapabileceği göz önünde bulunduruldu. "Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Koleji (American College of Medical Genetics and Genomics, ACMG)" ve "Moleküler Patoloji Derneğinin (Association for Molecular Pathology, AMP) 2015 yılında yayınladığı NGS varyantlarını sınıflandırma kılavuzuna göre varyasyonlar patojen, olası patojen, önemi bilinmeyen değişiklik, olası benign, benign olarak sınıflandırıldı (101). Bu kriterler Tablo 5'de özetlenmektedir.

Akışta;

- SIFT, POLYPHEN, Mutation Taster, Mutation Assessor, FATHMM tahmin araç programlarında proteine etkisi olduğu öngörülen ve Combined Annotation Dependent Depletion (CADD) skoru>25, Genomic Evolutionary Rate Profiling (GERP) skoru >4 olan yanlış anlamlı varyasyonlar
- Yüksek olasılıkla fonksiyon kaybına yol açması beklenen anlamsız, çerçeve kaybı varyasyonlar
- Kodlanmayan bölgede olan CADD>20, GERP>3, SPLICE AI>0.4 olanlar

önceliklendirildi. Bu aşamalarda online analiz programları Fraklin Genoox, VarSome ve Genemaster kullanıldı. Ayrıca bu platformlarda bulunan *in silico* araçlardan elde edilen skorlarla ürettiği toplu tahmin skorları ile de varyasyonlar değerlendirildi. Analiz edilen varyasyonlara ait genlerin klinik olarak yorumlanması "Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)" veri tabanı, hastaların klinik bulguları ile ilişkili "Human Phenotype Ontology (HPO)" terimleri kullanılarak ve literatür taraması yapılarak elde edildi. "Clinvar" veri tabanında fenotiple ilişkili patojen bildirilmiş olanlar önceliklendirildi. Genlerin alternatif transkriptlerine "RefSeq" "Ensembl" veri tabanlarından, alternatif protein izoformlarına ve proteinlerin domain bilgilerine "UniProt" veri tabanndan ulaşıldı. Doku spesifik gen ekspresyon bilgileri "Genotype-Tissue Expression (GTEx)" ve "The Human Protein

Atlas" veri tabanlarından sağlandı. Aynı zamanda "The Human Protein Atlas" veri tabanından proteinin hücre içinde lokalizasyonu, fonksiyonu ve hangi dokularda daha çok bulunduğu bilgilerine ulaşıldı. Akış basamakları Şekil 4'de özetlenmektedir.



Şekil 4: Aday Varyasyonların Belirlenmesinde Takip Edilen İş Akışı

Protein- protein etkileşimlerini değerlendirmek için "Metascape", "String" ve "The Human Protein Atlas" online veri tabanları kullanıldı. Hastalarda analiz edilen varyasyonlar listelenerek hangi hücresel yollakta daha fazla varyasyonun bulunduğu "Metascope" veritabanı kullanılarak değerlendirildi. Bu veritabanında KEGG Pathway, GO Biological Processes, Reactome Gene Sets, Canonical Pathways, CORUM ve WikiPathways kullanılarak genlerin hangi yolakta olduğu belirlenir ve p değeri <0,01, minimum 3 gen içeren ve zenginleştirme faktörü >1,5 olan terimler (zenginleştirme faktörü, gözlemlenen sayılar ile şans eseri beklenen sayılar arasındaki orandır) toplanır ve benzerliklerine göre kümeler halinde gruplandırılır. Bu kümeler içindeki istatistiksel olarak en anlamlı terim, kümeyi temsil etmek üzere seçilir.

Tablo 5: ACMG ve AMP varyasyon sınıflandırma kriterleri

Bir varyasyonun patojen olarak sınıflandırma kriterleri	
Patojenite kanıtı	**Kategori**
Çok Güçlü	**PVS1**, bir gende işlev kaybının (LOF) hastalık mekanizması olarak bilindiği durumlarda anlamsız, çerçeve kayması, ±1 veya 2 kırpılma bölgesi, başlangıç kodonu, tekil veya çoklu ekzon delesyonu gibi null varyasyonların patojenik olarak sınıflandırılmasını destekler. Dikkat Edilmesi Gerekenler: LOF hastalık mekanizması olarak bilinmeyen genler için dikkatli olunmalıdır. Örneğin; *GFAP, MYH7* genlerinde işlev kaybı bilinen bir hastalık mekanizması değildir. Genin en uç 3' ucunda yer alan LOF varyantlarının yorumlanmasında dikkatli olunmalıdır. Bu bölgedeki varyasyonlar tam işlev kaybına yol açmayabilir. Ekzon atlamasına yol açması beklenen ancak proteinin geri kalanını bozma ihtimali düşük olan kırpılma bölgesi varyasyonlarını yorumlarken dikkatli olunmalıdır. Bu varyasyonlar protein fonksiyonunu etkilemeyebilir. Çoklu transkript varlığında dikkatli olunmalıdır. Aynı genin farklı transkriptleri olabilir ve bir transkriptte görülen null varyasyon diğer transkriptleri etkilemeyebilir.
Güçlü	**PS1:** Aynı amino asit (aa) değişimi daha önce patojenik olarak sınıflandırılmış bir varyasyon ile aynı amino asit değişikliğine neden olan varyasyonlar, nükleotid değişikliğinden bağımsız olarak patojenik olarak sınıflandırılabilir. Örnek: Aynı kodonda G>C veya G>T ile oluşan Val→Leu amino asit değişimi Dikkat Edilmesi Gereken: Bu kriter, kırpılma bölgesi değişikliklerini değil, amino asit seviyesindeki değişiklikleri kapsar. **PS2:** Her iki ebeveyn tarafından gelen gametlerin analiz edilerek doğrulanan *de novo* varyasyonlar (yeni ortaya çıkan mutasyonlar), hastada hastalık mevcutken aile öyküsü yoksa patojenik sınıflamayı destekler. Not: Sadece babalık doğrulaması yeterli değildir. Yumurta donasyonu, taşıyıcılık anneliği, embriyo transferindeki hatalar vb. durumlarda *de novo* varyasyon yanıltıcı olabilir.

Güçlü (Devamı)	**PS3:** Gen veya gen ürününün işlevini bozucu etkiyi destekleyen iyi karakterize edilmiş *in vitro* (laboratuvar ortamında) veya *in vivo* (canlı organizmada) fonksiyonel çalışmalar, patojenik sınıflamayı destekler. Not: Klinik tanı laboratuvarı ortamında doğrulanmış, tekrarlanabilir ve güvenilir olduğu gösterilen fonksiyonel çalışmalar en yüksek kanıt seviyesi olarak kabul edilir. **PS4:** Etkilenen bireylerde varyasyonun görülme sıklığı, kontrol grubuna kıyasla anlamlı şekilde artmışsa patojenik sınıflamayı destekler. Not 1: Vaka-kontrol çalışmalarından elde edilen bağıl risk veya OR değeri 5.0'dan büyük olmalı ve bu değerin güven aralığı 1.0'ı içermemelidir. Not 2: Çok nadir görülen varyasyonlarda vaka-kontrol çalışmaları istatistiksel olarak anlamlı sonuç vermeyebilir. Bu gibi durumlarda, aynı fenotipe sahip birden fazla ilgisiz hastada varyasyonun gözlemlenmesi ve kontrol grubunda görülmemesi orta düzeyde kanıt olarak kullanılabilir.
Orta	**PM1:** Varyasyon, mutasyon açısından hassas bir bölgede (sıcak nokta) veya genin işlevsel olarak kritik ve iyi tanımlanmış bir alanında (örneğin, bir enzimin aktif bölgesi) bulunuyor ve bu bölgede iyi huylu varyasyonlar gözlenmiyor ise muhtemelen patojenik olarak sınıflandırılabilir. **PM2:** Varyasyon, kontrol gruplarında hiç görülmüyor veya çok düşük sıklıkta bulunuyorsa (resesif kalıtımlıysa) muhtemelen patojenik olarak sınıflandırılabilir. Bu veri Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project veya Exome Aggregation Consortium gibi kaynaklardan elde edilebilir. Dikkat Edilmesi Gereken: Yeni nesil dizi teknikleri insersiyon/delesyon mutasyonlarını doğru tespit etmekte zorlanabilir. Bu nedenle bu tür mutasyonlar için popülasyon verileri güvenilir olmayabilir. **PM3:** Resesif kalıtımlı hastalıklarda, muhtemelen patojenik olarak sınıflandırılan varyasyon, genomda farklı bir alelde bulunan patojenik bir varyasyon ile birlikte tespit edilirse (*trans* konum) bu durum muhtemelen patojenik sınıflandırmasını destekler. Not: Bu kriter için varyantın hangi alelde (anne veya baba tarafından gelen kromozom) bulunduğunun belirlenmesi gerekir. Bu işlem

Orta (Devamı)	için genellikle ebeveynlerin veya çocukların da test edilmesi gereklidir. **PM4:** Tekrarlamayan bir bölgede bulunan çerçeve içi ekleme/silme mutasyonları veya durdurucu kodon kaybı sonucu protein uzunluğunda değişiklik olması muhtemelen patojenik olarak sınıflandırılabilir. **PM5:** Daha önce aynı amino asit pozisyonunda patojenik olduğu kanıtlanmış farklı bir missense mutasyonu bulunan bir gende, yeni bir missense mutasyonu gözlenirse bu durum muhtemelen patojenik sınıflandırmasını destekler. Örnek: Arg156His patojenik ise, Arg156Cys gözlenmesi muhtemelen patojenik sınıflandırmasını düşündürür. Dikkat Edilmesi Gereken: Bu kriter, kırpılma bölgesi değişikliklerini değil, aa seviyesindeki değişiklikleri kapsar. **PM6:** Varyasyonların *de novo* olduğu düşünülüyorsa ancak anne ve baba tarafından gelen gametlerin analizi ile doğrulanmamışsa muhtemelen patojenik olarak sınıflandırılabilir. Bu durumda kanıt gücü daha düşüktür.
Destekleyici	**PP1:** Hastalığa neden olduğu kesin olarak bilinen bir gende, varyasyonun hastalıklı aile üyelerinin çoğunda birlikte görülmesi (segregasyon) etkisi belli olmayan olarak sınıflandırılmasını destekler. Bu kanıtın gücü, segregasyon verisinin artmasıyla güçlenir. Not: Aynı ailenin birden fazla üyesinde hastalık görülüyorsa ve varyasyon bu bireylerde de bulunuyorsa bu durum segregasyon olarak tanımlanır. **PP2:** Missense varyasyonun bulunduğu gende, benign missense varyasyonlarının görülme sıklığı düşükse ve bu gende hastalık genellikle missense varyasyonları ile ilişkiliyse etkisi belli olmayan olarak sınıflandırılmasını destekler. **PP3:** Birden fazla biyoformatik veri tabanından elde edilen veriler (korunma, evrimsel değişiklikler, kırpılma üzerindeki etkisi gibi) gen veya gen ürünü üzerinde zararlı bir etki olduğunu destekliyorsa etkisi belli olmayan olarak sınıflandırılmasını destekler. Dikkat Edilmesi Gereken: Birçok hesaplamalı yöntem benzer girdileri kullandığı için her yöntem bağımsız bir kanıt

Destekleyici (Devamı)	olarak değerlendirilmemelidir. PP3 kriteri, bir varyantı değerlendirilmesinde yalnızca bir kez kullanılabilir. **PP4:** Hastanın fenotipi (hastalık belirtileri) ve aile öyküsü, tek bir genetik nedene sahip spesifik bir hastalık ile tamamen uyumlu ise etkisi belli olmayan olarak sınıflandırılmasını destekler. **PP5:** Saygın bir kaynak tarafından varyasyonun patojenik olarak rapor edilmesi, ancak laboratuvarın bağımsız bir değerlendirme yapmak için yeterli kanıta sahip olmaması durumunda etkisi belli olmayan olarak sınıflandırılabilir.
Bir varyasyonun benign olarak sınıflandırma kriterleri	
Benign kanıtı	**Kategori**
Tek Başına (BA1)	**BA1:** Alel frekansı, Exome Dizileme Projesi, 1000 Genom Projesi veya Exome Aggregation Consortium'da >%5 olan varyasyonlar
Güçlü	**BS1:** Varyasyonun popülasyon sıklığı, söz konusu hastalık için beklenenden daha yüksekse benign olarak sınıflandırılabilir. Bu veri Exome Sequencing Project, 1000 Genomes Project veya Exome Aggregation Consortium gibi kaynaklardan elde edilebilir. **BS2:** Varyasyonun resesif (her iki alelde de bulunan), dominant (sadece bir alelde bulunan) veya X-bağlantılı (X kromozomunda tek bir alelde bulunan) bir hastalıkla ilişkili olduğu düşünülüyorsa ve bu hastalığın erken yaşlarda tam penetrans (taşıyıcılarda hastalık görülme olasılığı %100) gösterdiği biliniyorsa, varyasyonun sağlıklı bir yetişkinde gözlenmesi benign olarak sınıflandırılmasını destekler. **BS3:** *İn vitro* veya *in vivo* yapılan iyi karakterize edilmiş fonksiyonel çalışmalar, varyasyonun protein fonksiyonu veya kırpılma üzerinde zararlı bir etkisi olmadığını gösteriyorsa benign olarak sınıflandırılabilir. **BS4:** Ailede hastalıklı bireylerde varyasyonun birlikte görülmemesi (segregasyon yokluğu) benign olarak sınıflandırılmasını destekleyebilir. Dikkat Edilmesi Gereken: Ortak fenotiplerde (örneğin, kanser, epilepsi) fenotipi taklidi görülebilir. Bu durum, hastalıklı bireylerde segregasyon yokluğu yanılsaması yaratabilir. Otozomal dominant hastalıklarda birden fazla patojenik varyasyonun birlikte bulunması da aile içi segregasyon olmadığı yanılgısına yol açabilir.

Destekleyici	**BP1:** Öncelikle kesici mutasyonların (truncating variants) hastalığa neden olduğu bilinen bir gende missense mutasyon (aa değişikliği) görülüyorsa bu durum benign destekleyici olarak sınıflandırılabilir. **BP2:** Tamamen penetran (taşıyıcılarda hastalık görülme olasılığı %100) dominant kalıtılan bir hastalığın genindeki patojenik varyasyon ile *trans* konumda (farklı alellerde) veya herhangi bir kalıtsal patern ile kalıtılan başka bir patojenik varyasyon ile *cis* konumda (aynı alelde) gözleniyorsa benign destekleyici olarak sınıflandırılabilir. **BP3:** İşlevi bilinmeyen tekrarlayan bir bölgede bulunan çerçeve içi insersiyon/delesyon mutasyonları benign destekleyici olarak sınıflandırılabilir. **BP4:** Birden fazla biyoinformatik kaynaktan elde edilen veriler (korunma, evrimsel değişiklikler, kırpılma bölgeleri üzerindeki etkisi gibi) gen veya gen ürünü üzerinde olumsuz bir etki olduğunu desteklemiyorsa benign destekleyici olarak sınıflandırılabilir. Dikkat Edilmesi Gereken: Birçok hesaplamalı yöntem benzer girdileri kullandığı için her yöntem bağımsız bir kanıt olarak değerlendirilmemelidir. BP4 kriteri, bir varyasyonun değerlendirilmesinde yalnızca bir kez kullanılabilir. **BP5:** Varyasyonun bulunduğu hastada, bu varyanttan bağımsız başka bir moleküler hastalık mekanizması tespit edilirse benign destekleyici olarak sınıflandırılabilir. **BP6:** Saygın bir kaynak tarafından varyasyonun benign olarak rapor edilmesi, ancak laboratuvarın bağımsız bir değerlendirme yapmak için yeterli kanıta sahip olmaması durumunda benign destekleyici olarak sınıflandırılabilir. **BP7:** Herhangi bir aa değişikliğine yol açmayan (sessiz varyasyon) ve kırpılma bölgelerini etkilemeyeceği öngörülen bir varyasyon, ayrıca nükleotidin yüksek oranda korunmuş olmaması durumunda benign destekleyici olarak sınıflandırılabilir.

4. BULGULAR

4.1.Tüm Ekzom Dizileme Bulguları

Bu çalışmada bir tanesi çocukluk çağı başlangıçlı olan ailesel MS hastalarına WES ile hastalığın patogenezinde rol oynayabilecek varyasyonlar araştırıldı. İlk olarak elde edilen verinin ortalama okuma derinliği, Q40 puanı üzerindeki verilerin oranı, en az 20 kere (20x) okunan baz yüzdesi ve en az 50 kere (50x) okunan baz gibi parametrelerine bakılarak kalitesi değerlendirildi. Analiz öncesi elde edilen WES verilerinin kalite parametreleri Tablo 6'de gösterilmektedir.

Tablo 6. WES verisi kalite parametreleri

HASTALAR	OKUMA SAYISI (MİLYON)	ORTALAMA DERİNLİK	ORTALAMA Q40 (%)	20X KAPSAM (%)	50X KAPSAM (%)
A1H1	3105	84,78	96	98,6	86,3
A1H2	2360	64,43	95	98	69,2
A2H1	3352	91,52	96	98,8	87,6
A2H2	2343	63,99	96	98,3	69,9
A3H1	2255	61,56	95	96,2	63,7
A3H2	2422	66,12	96	98,6	73,2
A4H1	2850	77,81	95	98,8	85,0
A4H2	2117	57,81	95	98,1	60,0
A5H1	6963	190,10	96	99,4	98,8
A5H2	7887	215,33	97	99,2	98,7

Yapılan WES analizleri sonucunda hastalarda ortalama 138.292 varyasyon tespit edildi. Kalite aşamasını geçen varyasyonlar arasından ilk olarak GnomAD, 1000Genomes, ExAC veri tabanlarına göre toplumda görülme sıklığı %1 altında olanlar belirlendi. Ardından RefSeq veri tabanında var olan transkriptler temel alınarak ekzonlarda, kırpılma bölgelerinde (ekzon-intron sınırı, +10, -10 bp) ve 3', 5' UTR

bölgelerinde yer alan varyasyonlar filtrelendi. Bu filtrelemeler sonucunda kişi başı ortalama 2548 varyasyon tespit edildi. Bu varyasyonlardan çalışılan diğer aile bireyinde ortak bulunanlar önceliklendirilerek literatürde daha önce MS hastalarında ilişkili bulunan, EAE modellerinde hastalık etiyolojisine katkı sağladığı gösterilen, OMIM'de fenotipik olarak beyaz cevher değişikliği yaptığı bildirilen ve otoimmünite ile ilişkilendirilen genlerde bulunan varyasyonlar etiyolojik neden kabul edilip tartışıldı.

4.2. Olguların Klinik Bilgileri ve WES Sonuçları

Çalışmaya dahil edilen 10 hastanın medyan ilk atak yaşı 17 (12-26 yaş), değerlendirme sırasındaki medyan yaş 23,5 (17- 37 yaş) ve medyan hastalıklı süre 6,5 yıl (2 ay-18 yıl) olarak belirlendi. Hastaların ilk atağının yedisinde oftalmolojik problemler, geri kalan üçünde üst ekstremitede parestezi şikayetleri ile prezente olduğu tespit edildi. Çalışmaya dahil edilen gruptta 6 kadın, 4 erkek hasta bulunmaktadır. Hastalardan birinin klinik seyri SPMS şeklideydi, diğerleri RRMS olarak değerlendirildi. Tablo 7'de hastaların genel klinik bilgileri özetlenmektedir.

Tablo 7. Çalışmaya katılan hastaların genel klinik bilgisi

HASTA	YAŞ CİNSİYET	ATAK SAYISI	İLK ATAK YAŞI	KLİNİK SEYİR	BAŞLANGIÇ KLİNİK	BOS OKB	NÖROLOJİK SEKEL	VİT D DÜZEYİ (µg/l)	EBV ÖYKÜSÜ	SİGARA ÖYKÜSÜ	EK ŞİKAYET
A1H1	34 K	> 10	16	SPMS	Parestezi	+	10 yıldır destekle yürüme, idrar inkontinans şikayeti	13	+	Yok	Yok
A1H2	30 K	2	19	RRMS	Parestezi	+	Yok	6.91	?	Yok	Yok
A2H1	22 E	2	21	RRMS	Diplopi, Geçici strabismus, vertigo	+	Yok	?	?	6 Paket yıl	Yok
A2H2	18 E	3	12	RRMS	Geçici strabismus, vertigo	+	Yok	7.89	+	Yok	Yok
A3H1	25 K	1	18	RRMS	Parestezi	-	Yok	12.1	?	Yok	Arimi
A3H2	17 E	3	15	RRMS	Optik nörit	+	Görme kaybı	10.6	?	Yok	Yok

A4H1	37 K	3-4	26	RRMS	Geçici strabismus	?	Yok	14.4	-	Yok	Yok
A4H2	17 K	1	16	RRMS	Geçici strabismus	+	Yok	11.1	?	Yok	Yok
A5H1	24 E	2	20	RRMS	Optik nörit	?	Yok	?	?	8 Paket yıl	Yok
A5H2	23 K	3	15	RRMS	Diplopi, vertigo	+	Yok	7.35	?	Yok	Yok

A5 ailesindeki hastalar Suriye kökenli olup ergenlik sonrası Türkiye'ye taşınmışlardır. A1 ailesi Rize doğumlu olup ergenlik dönemi öncesi İstanbul'a taşınmış. A4 ailesindeki A4H1 (anne) Kastamonu doğumlu olup ergenlik sonrası İstanbul taşınmıştır. Diğer hastaların hepsi İstanbul doğumludur ve hayatları boyunca İstanbul'da ikamet etmiştir. A2 ailesi İstanbul'a Mersin'den göç ettiğini belirtti. A3 ailesi ise İstanbul'dan önce Adana'da ikamet ettiklerini ifade etmişlerdir.

Olgularda saptanan klinik bulgular ve ekzom dizileme sonuçları aile bazında değerlendirildi.

4.2.1. A1 Ailesi

4.2.1.1 A1H1 ve A1H2 Klinik Bilgiler

A1H1: 34 yaşında kadın hasta 16 yaşında sağ elde uyuşma ve güç kaybı ile başlayan şikayetleri ile MS tanısı almıştır. Birinci ataktan yaklaşık 1 sene sonra ikinci atağı sağ gözde ptozis şeklinde olduğunu ifade etmiştir. Hasta tanı aldığından bu yana yaklaşık 10 kez atak geçirdiğini ancak tam olarak ne zaman ve ne şikayetle olduğunu hatırlamadığını belirtmiştir. Nörolojik fonksiyon kaybının tam olarak ne zaman başladığını bilmemekle beraber 26 yaşından bu yana yürürken destek alımakta, her iki elde hipoestezi, idrar inkontinansı bulunmaktadır. Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normaldir. Nörolojik muayenesinde desteksiz yürüyemediği gözlendi. Her iki üst ekstremite el

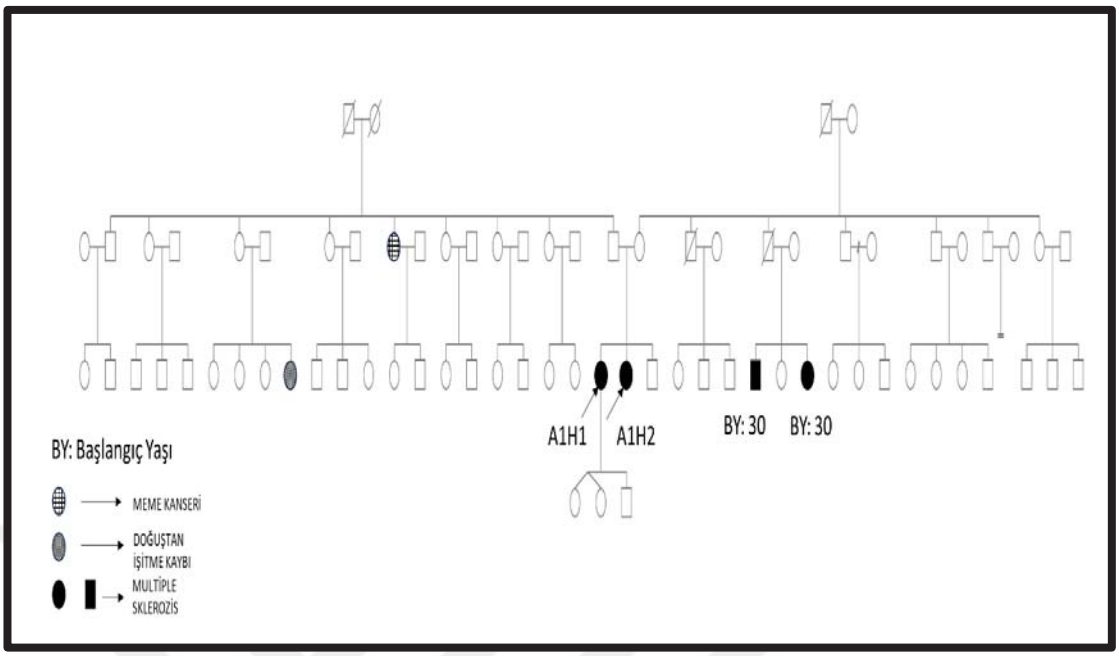
bileğine kadar hipoestezik olduğu saptanmıştır. Anamnez esnasında sorulan sorularda geçmiş klinik öyküsünü hatırlamakta zorlandı dikkati çekmiştir.

Kraniyal MRG'de supratentorial alanda bilateral temporal periventriküler derin ak maddede, her iki sentrum semiovalede, superior frontal girusta jukstakortikal yerleşimli bilateral frontoparietal subkortikal ve periventrüler derin ak maddede, korpus kallozumda kallozaseptal alanda ventriküle dik oryantasyonda, sağ optik sinirde, infratentorial alanda bilateral orta serebellar pedinkülde, solda CN5 kök giriş bölgesinde, mezensefalon, pons ve bulbus her iki yarımında kontrast tutmayan demiyelinizan plaklar saptanmış olup diğer yapılarda patolojik bulgu saptanmamıştır. Servikal ve torakal MRG multisegmenter çok sayıda demyelizan lezyon izlenmiştir. 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L'nin altında saptanmıştır. EBV enfeksiyon öyküsü için yapılan tetkiklerde EBV VCA IgG pozitif ve EBV VCA IgM negatif tespit edilmiştir.

A1H2: A1H1 kız kardeşi olan 30 yaşında kadın hasta 19 yaşında sol kolda uyuşma nedeniyle başvurduğu nöroloji polikliniğinde BOS incelemesinde OKB saptanması sonucu MS tanısı almış olup, ilk atak dışında başka atak geçirmemiştir. Tanı sonrası 4 sene boyunca rebief (İnterferon β-1a) kullanan hastanın son 2 senedir ilaçsız ve ataksız takibi sürmektedir. Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normaldir. İnspeksiyonda dikkati çeken bir bulgu saptanmayan hastanın nörolojik muayenesinde şikayetlerine ek bir bulgu saptanmamıştır.

Kraniyal MRG'de korpus kallozumda, kallozoseptal yüzlerde, bilateral periventriikül ve subkortikal ak maddede ve bilateral serebellar hemisferde yerleşimli multiple T2/FLAIR hiperintens demyelinizan lezyonlar tespit edilmiştir. Torakospinal MRG'de servikomedullar birleşke sağında ve torakoservikal spinal kordda multiple T2/FLAIR hiperintens demyelinizan lezyonlar görülmüştür. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L'nin altında saptanmıştır. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik bir test yapılmamıştır.

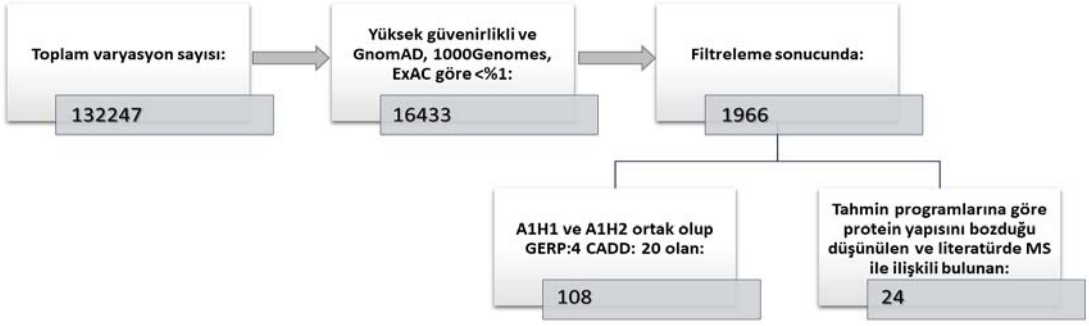
Alınan soygeçmiş öyküsüne göre çizilen pedigri Şekil 5'te gösterilmiştir.



Şekil 5: A1 Ailesine ait pedigri

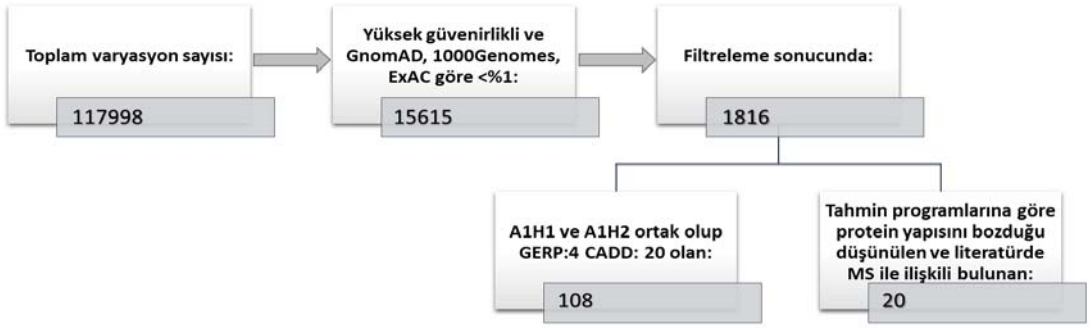
4.2.1.2 A1H1 ve A1H2 WES Bilgileri

A1H1'de biyoinformatik analizlerde 18361 gende 132247 varyasyon saptandı Yapılan filtrelemelerden sonra 1127 gende 1966 varyasyon tespit edildi (Şekil 6). Literatür taraması ile beraber varsyasyon saptanan 24 genin hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 8'de özetlenmiştir.



Şekil 6: A1H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

A1H2'de 17480 gende 117998 varyasyon saptandı. Yapılan filtrelemelerden sonra 1076 gende 1816 varyasyon tespit edildi (Şekil 7). Literatür taraması ile beraber 20 gende bulunan varyasyonların hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 8' de özetlenmektedir.



Şekil 7: A1H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

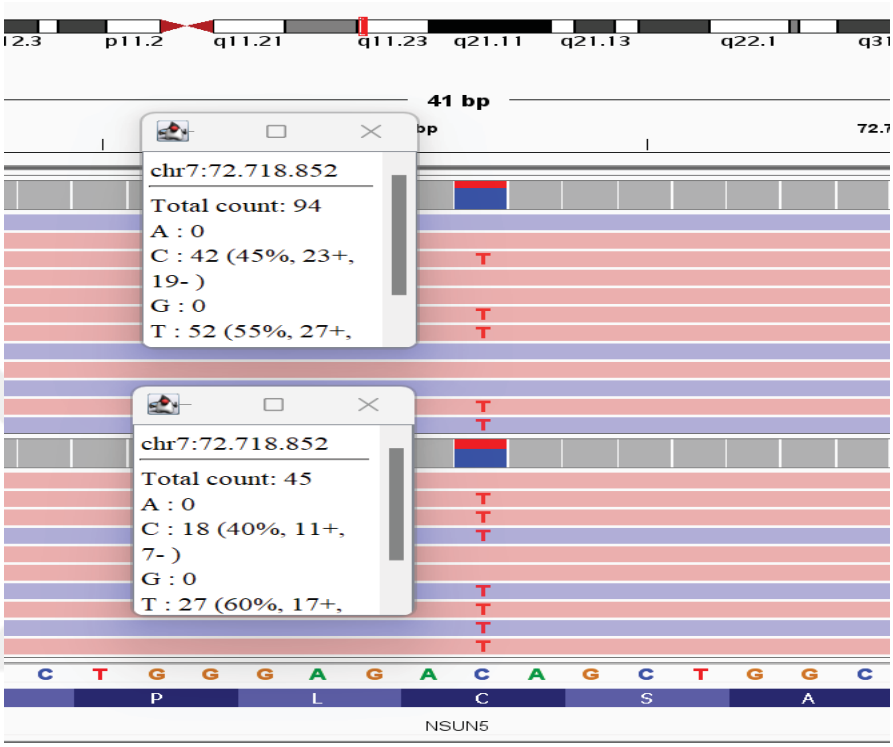
Tablo 8. A1H1 ve A1H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar

GEN* (TRANSKRİPT)	VARYASYON	ZİGOSİTE	SINIFLANDIRMA**	PROTEİNİN FONKSİYONU***	LİTERATÜR
A1H1 ve A1H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki ortak varyasyonlar					
NSUN5 (NM_148956.4)	c.647G>A p.Cys216Tyr	HET	VUS (PM2)	NOP2/Sun RNA Methyltransferase 5; korpus kallozum ve serebral korteks gelişimi	(102)
ARRB2 (NM_004313.4)	c.893A>G p.Asp319Gly	HET	VUS (PM2)	Beta-arrestin-2; G protein reseptörlerinin sinyal iletimini düzenleyen proteini	(103,104)
GAREM2 (NM_001168241.2)	c.1475G>A p.Arg492Gln	HET	VUS (PM2)	Hücre büyüme sinyal yolunda rol oynayan adaptör	(105)
LRIG1 (NM_015541.3)	c.1790-17_1790-8del (-)	HET	VUS (PM2)	Reseptör tirozin kinaz reseptörlerinin negatif regülatörü	(106)
LSP1 (NM_002339.3)	c.680T>C p.Ile355Thr	HET	VUS (PM2)	Lenfosit spesifik protein 1; nötrofil aktivasyonu ve kemotaksi	(107)
MUC19 (NM_173600.2)	c.4320G>A p.Trp856*	HOMO	VUS (PM2)	Gözdeki mukus dengesinde rol oynayan protein	(108)
NAV3 (NM_001024383.2)	c.1579A>G p.Ile527Val	HET	VUS (PM2)	Nöron navigator 3; T hücrelerinin IL2 üretimini düzenleyen protein. Aynı zamanda nöronların yenilenmesinde de rol oynar	(109)
ZC3HAV1 (NM_020119.4)	c.1726T>C p.Phe576Leu	HET	VUS (PM2)	Viral mRNA'ları parçalayarak virüslerin çoğalmasını engelleyen antiviral protein	(110,111)
FAM69B (DIPK1B) (NM_152421.4)	c.401G>A p.Arg134Gln	HET	VUS (PM2)	Divergent protein kinaz domain 1B	(112)
CHD9 (NM_001308319.2)	c.8612G>A p.Gly2855Asp	HET	VUS (PM2)	Kromodomain-helikaz-DNA bağlayıcı protein 9; nükleer reseptörler için transkripsiyonel koaktivatör. ATP'ye bağımlı bir kromatin yeniden modelleme	
SERINC4 (NM_001258031.2)	c.1141-2A>G (-)	HET	VUS (PM2)	Membranlara serini dahil eder ve serinden türetilen iki lipidin, fosfatidilserin ve sfingolipitlerin sentezini kolaylaştırma	(113)
GPM6B (NM_001001995.3	c.48C>A p.Ser16Arg	HET	VUS (PM2)	Nöronal membran glikoproteini M6-b; Sinir sistemi gelişimi ve kemik	(114–116)

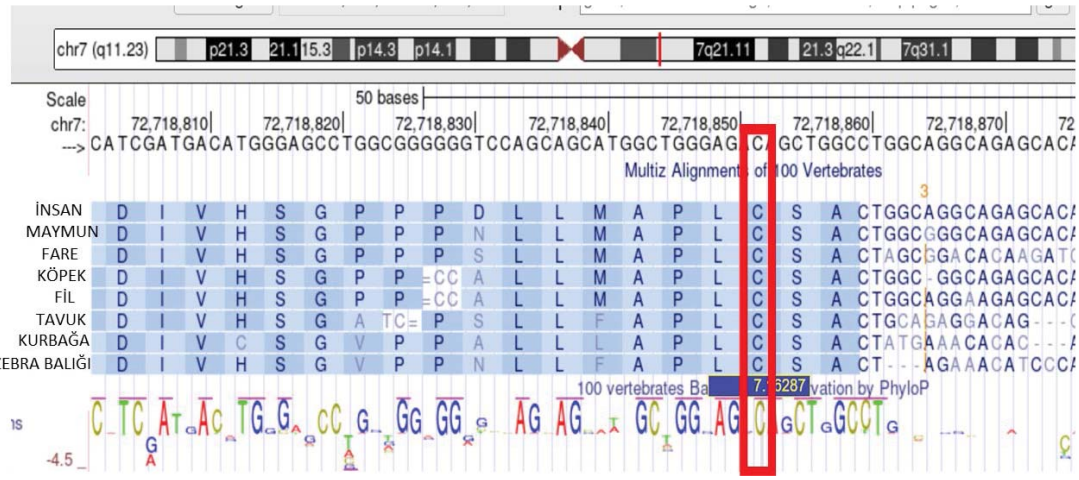
				oluşumu gibi süreçlerde rol oynayan protein	
PDZRN4 (NM_001164595.2)	c.1138G>A p.Glu380Lys	HOMO	VUS (PM2)	PDZ domaini içeren RING parmak proteini 4	(117)
CYTH2 (NM_004228.7)	c.549C>G p.Asp183Glu	HET	VUS (PM2, PP3)	Sitohezin-2; Guanin-nükleotid değişim faktörü (GEF) görevi görür.	(118,119)
RMDN3 (NM_018145.3)	c.187+3_187+14del (-)	HET	VUS (PM2)	Mikrotübül dinamik protein 3'ün düzenleyicisi; Hücresel kalsiyum homeostazisinin düzenlenmesinde rol oynar	
A1H1 MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
NCF1 (NM_000265.6)	c.579G>A p.Trp193*	HET	P (PM2, PM3, PVS1)	Nötrofil sitozol faktörü 1; Latent NADPH oksidazın aktivasyonu için NCF2, NCF1 ve membrana bağlı sitokrom b558 birlikte görev alan protein	
CPSF3L (INTS11) (NM_017871.6)	c.1608-2A>T (-)	HET	LP (PM2, PVS1)	Integrator kompleks subunit 11; small nuclear RNA sentezinde görev alan integratör kompleksin subuniti	
ASAP2 (NM_003887.3)	c.1414A>G p.Arg472Gly	HET	VUS (PM2)	ANK tekrar ve PH domain içeren protein 2; Golgi sonrası keseciklerin oluşumunu düzenler ve Fc gama reseptörünün aracılık ettiği fagositozu modüle eder	(120)
CYP51A1 (NM_000786.4)	c.1407G>T p.Trp469Cys	HET	VUS (PM2)	Lanosterol 14-alfa demetilaz; Kolesterol sentezinde rol oynayan enzim	(121,122)
TRAPPC9 (NM_001160372.4)	c.1262C>T p.Ala519Val	HET	VUS (PM2)	Trafik proteini parçacık kompleksi alt birimi 9; Sinyal iletim yolunu düzenleyen ve sinir hücrelerinin farklılaşmasında rol oynayabilen protein	
CHD8 (NM_001170629.2)	c.733G>C p.Val245Leu	HET	VUS (PM2)	Kromodomain-helikaz-DNA bağlayıcı protein 8; Kromatin yeniden modelleme faktörü olarak görev yapan ve transkripsiyonu düzenleyen DNA helikaz.	
IQCJ-SCHIP1 (NM_014575.4)	c.65A>G p.Asp98Gly	HET	VUS (PM2)	Ranvier düğümleri ve akson başlangıç segmentlerindeki moleküler komplekslerin organizasyonu yoluyla miyelinli hücrelerde aksiyon potansiyeli iletiminde rol oynar	
E2F3 (NM_001949.5)	c.1222C>A p.Gln408Lys	HET	VUS (PM2)	Transkripsiyon faktörü E2F3	(123)
GAA (NM_000152.5)	c.1823G>C p.Arg608Pro	HET	VUS (PM1, PM2, PP2, PP3)	Lizozomal alfa-glukosidaz	
A1H2 MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
IFIH1 (NM_022168.4)	c.1641+1G>C (-)	HET	VUS (PVS1, BS2)	İnterferon kaynaklı helikaz C alanı içeren protein 1; antiviral yanıt aktivasyonunda görevli bağışıklık reseptörü	
DPP4 (NM_001935.4)	c.688G>A p.Asp230Asn	HET	VUS (PM2)	Dipeptidil peptidaz 4 membran formu; T hücresi reseptörü (TCR) aracılı hücre yüzeyi glikoprotein reseptörü	(124–129)
CACNA1H (NM_021098.3)	c.2716G>A p.Val906Met	HET	VUS (PM2, PP3)	Voltaja bağlı T tipi kalsiyum kanalı alt birimi alfa-1H; T tipi kalsiyum kanalları 'düşük voltajla etkinleşenler (LVA)' grubuna aittir.	
ATP13A2 (NM_022089.4)	c.3001G>A p.Val1001Met	HET	VUS (PM2)	Katyon taşıyan ATPase 13A2; Hücre içi katyon homeostazisinde ve nöronal bütünlüğün korunmasında rol oynayan ATPaz	
SFXN3 (NM_030971.4)	c.392A>G p.Asn131Ser	HET	VUS (PM2)	Sideroflexin-3; mitokondriyal transporter	(130)

HET: Heterozigot, HOM: Homozigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'
* MANE Select etiketi alan transkript seçilmiştir.
** Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (101).
***Uniprot veritabanından yararlanılmıştır

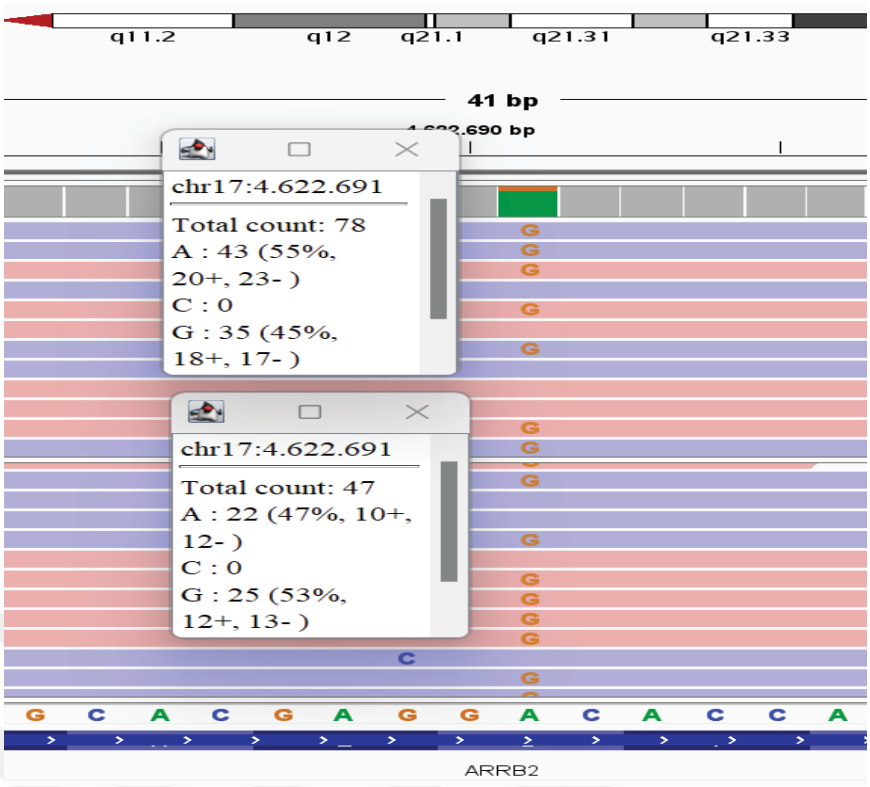
Yapılan analizler sonucunda ailenin her iki üyesinde ortak bulunan, hayvan ve/veya fonksiyonel çalışmalarda MS ile ilişkisi daha kuvvetli gösterilen *NSUN5*, *ARRB2* genlerinde bulunan varyasyonlar tartışılmıştır. Varyasyonlara ait IGV görüntüleri Şekil 8 ve 10'de, varyasyonların ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu Şekil 9 ve 11'da gösterilmiştir.



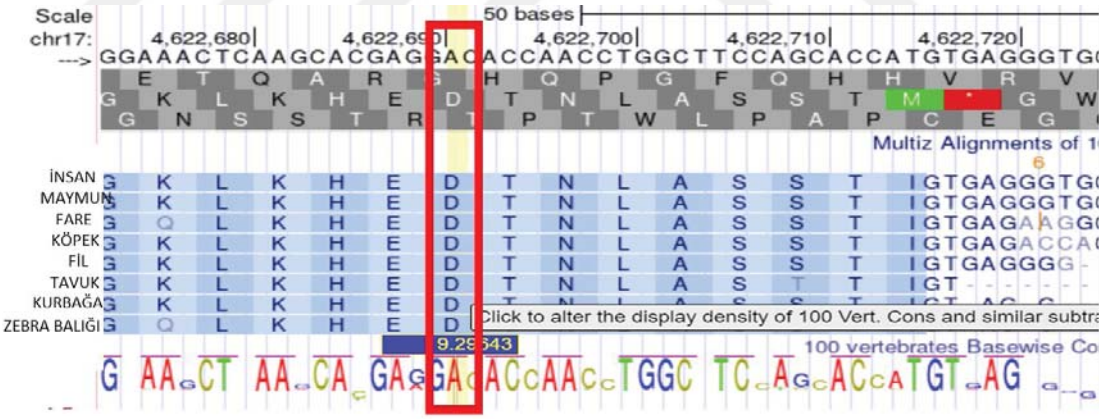
Şekil 8: A1H1 ve A1H2'de bulunan *NSUN5* c.647G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 9: *NSUN5* c.647G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

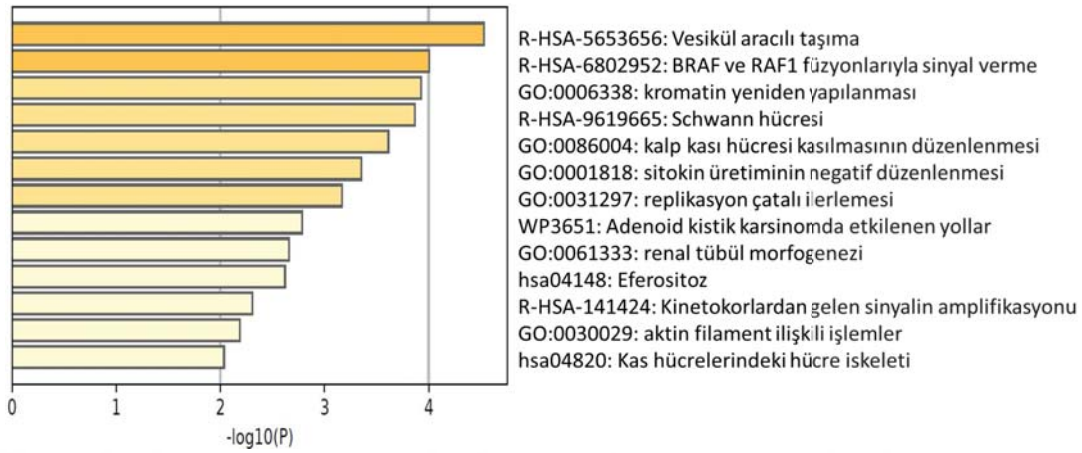


Şekil 10: A1H1 ve A1H2'de bulunan *ARRB2* c.893A>G varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 11: *ARRB2* c.893A>G varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

Yolak analiz için tespit edilen 108 varyasyon Metascape'de ve String çevrimiçi programlarında değerlendirilmiştir (Şekil 12).



Şekil 12: A1 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafiği

4.2.2. A2 Ailesi

4.2.2.1 A2H1 ve A2H2 Klinik Bilgiler

A2H1: 22 yaşında erkek hasta 21 yaşında oksipitalde şiddetli ağrı sonrasında gelişen sağ gözde kayma, diplopi, yürürken dengesizlik hissi, baş dönmesi şikayetleri ile MS tanısı alarak dimetil fumarat tedavisi başlanmıştır. En son atağı sağ vücut yarımı parestezi, güç kaybı şikayetleri ile gelişen hasta, bu ataktan önce 3 kez 2 gün süren baş dönmesi, algılama ve konuşma güçlüğü şikayeti olduğunu ifade etmiştir. Nörolojik yakınmalarına ek olarak sol kasıkta şişkinlik hissi akabinde hematokezya tarifleyen hasta reflü şikayeti sebebi ile MS ilaçlarını tolere edemediğini belirtmiştir. Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normal olan hastanın nörolojik muayenesinde sağ göz kapağının hareketinin zayıf olduğu, sağ gözün sol tarafa bakışının kısıtlı ve sol tarafa bakış sırasında sol gözde nistagmus gözlemlenmiştir.

Kraniyal MRG'sinde sağ serebral hemisferde perivetriküler alanda, pons sağ posteriorunda, pons sol yarısında anterior ve posteriorda ön planda demiyelinizan hastalık tutulumu lehine değerlendirilen lezyonlar izlenmiş ve diğer yapılarda patolojik görüntüleme saptanmamıştır. Spinal MRG'sinde ise MS'e ait bulgu

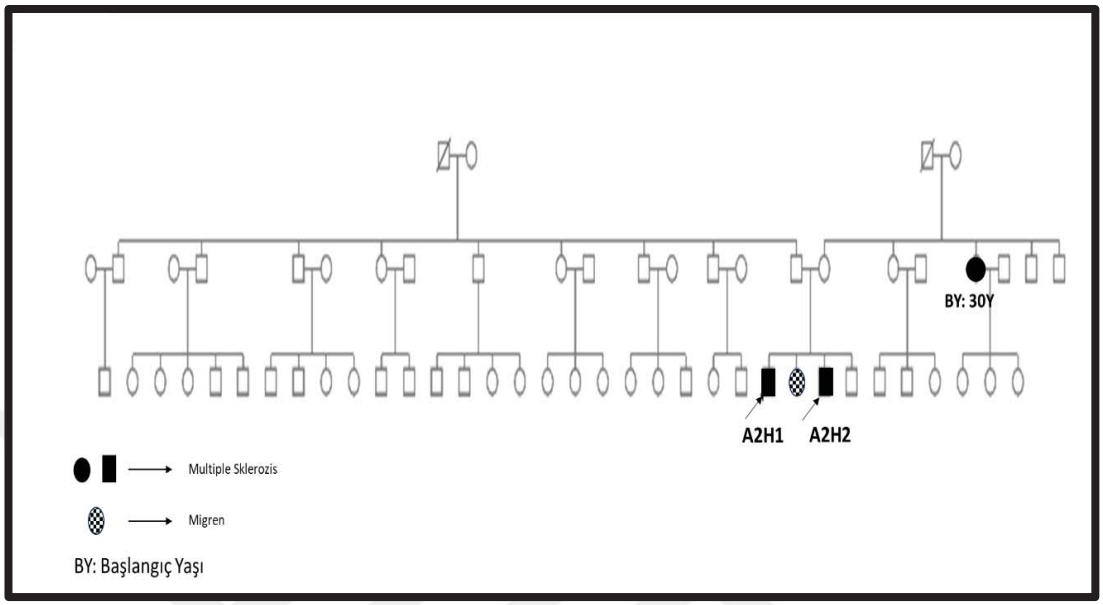
bulunmamaktadır. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L altında saptanmıştır. Tanı zamanı BOS'da OKB saptanmıştır. Nöromiyelitis optika açısından bakılan anti-NMO negatif bulunmuştur. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik test yapılmamıştır.

A2H2: A2H1'in 18 yaşında erkek kardeşi olan hasta, 12 yaşındayken bulantı-kusma, baş ağrısı şikayetlerini takiben iki hafta sonra gelişen sol gözde kayma şikayeti olduğunu daha sonrasında bu şikayetlerine yürüme güçlüğü eklendiğini belirtilmiştir. MS atağı olabileceği düşünülerek betaferon (İnterferon β-1b) tedavisi başlanan hastada tedavi altında 13 yaşındayken sol yanakta uyuşma, yüzün sola kayması şikayetleri gelişmiştir. MS atağı olarak değerlendirilerek 20 gün yatışı yapılmış ve plazmaferez tedavisi uygulanmış ve fingolimod tedavisi ile taburcu edilmiş ancak aritmi sebebi ile kesilerek okrevusa (Ocrelizumab) geçilmiştir. Hasta son iki senedir tedavisini uygulamadığını belirtmiştir. Son 5 yıl içerinde 10-12 atağı mevcut olup son atağı sol kolda ve sol yüz yarısında parestezi şeklindedir. Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normal olan hastanın nörolojik muayenesinde sol yüz yarısında nazolabial çizgi silik izlenmiştir. Sol üst ekstremite kas kuvveti 4/5 olarak değerlendirildi. Belirtilenler dışında ek bulgu saptanmamıştır.

Kraniyal MRG'de sol orta ve inferior serebellar pedünkülde, her iki serebellar hemisferde, sağ trigeminal sinir giriş zon yerleşimli, pons her iki yarımında, sağ talamusta, sağ periventriküler derin ak madde anteriorda, her iki temporal periventriküler alanda, sol parietal lob subkortikal alanda, sağ frontal lob subkortikal alanda, sağ presantral girus düzeyinde subkortikal ve her iki tarafta jukstakortikal alanda, sağ subkortikal alanda, her iki temporal lob subkortikal alanda yeni gelişen belirgin kontrast tutulumu göstermeyen T2 FLAIR hiperintens demyelinizan lezyonlar izlenmiştir ve sağ frontal lob subkortikal alanda ve sol periventriküler derin ak madde posteriorda periferi kontrast tutulumu gösteren T2 FLAIR hiperintens aktif demyelinizan lezyonlar saptanmış olup diğer yapılarda patolojik bulgu saptanmamıştır. Spinal MRG'sinde MS ait bulgu bulunmamaktadır. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L altında saptanmıştır. EBV enfeksiyon öyküsüne

yönelik testlerde EBV VCA IgG pozitif saptanmıştır. Tanı zamanı BOS'da OKB saptanmıştır. Anti-MOG ve anti-NMO saptanmamıştır.

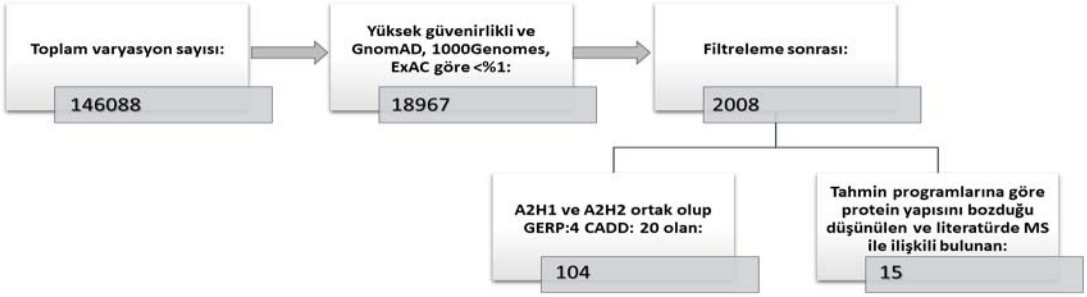
Alınan soygeçmiş öyküsüne göre çizilen pedigri Şekil 13'te gösterilmiştir.



Şekil 13: A2 Ailesine ait pedigri

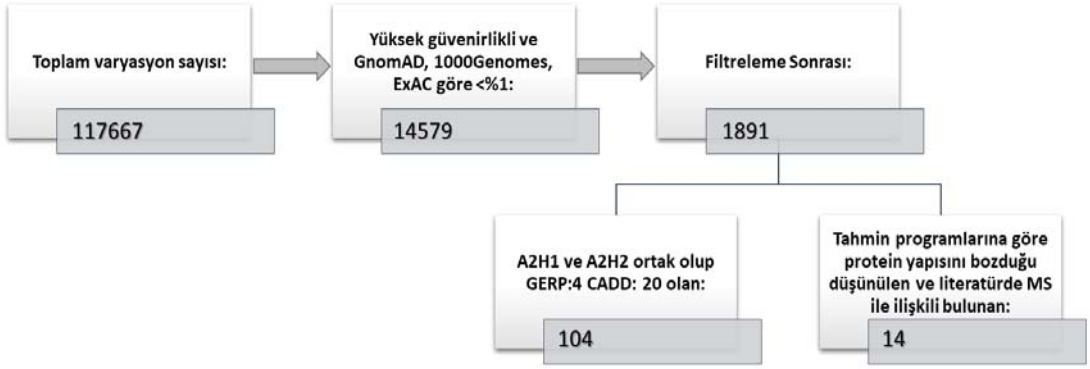
4.2.2.2 A2H1 ve A2H2 WES Bilgileri

A2H1'de biyoinformatik analizlerde 18665 gende 146088 varyasyon saptandı Yapılan filtrelemelerden sonra 1127 gende 2008 varyasyon tespit edildi (Şekil 14). Literatür taraması ile beraber varyasyon saptanan 15 genin hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 9' de özetlenmiştir.



Şekil 14: A2H1'de ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

A2H2'de biyoinformatik analizlerde 17638 gende 117667 varyasyon saptandı. Yapılan filtrelemelerden sonra 1121 gende 1891 varyasyon tespit edildi (Şekil 15). Literatür taraması ile beraber 13 gende bulunan 14 varyasyonun hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 9' de özetlenmektedir.



Şekil 15: A2H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

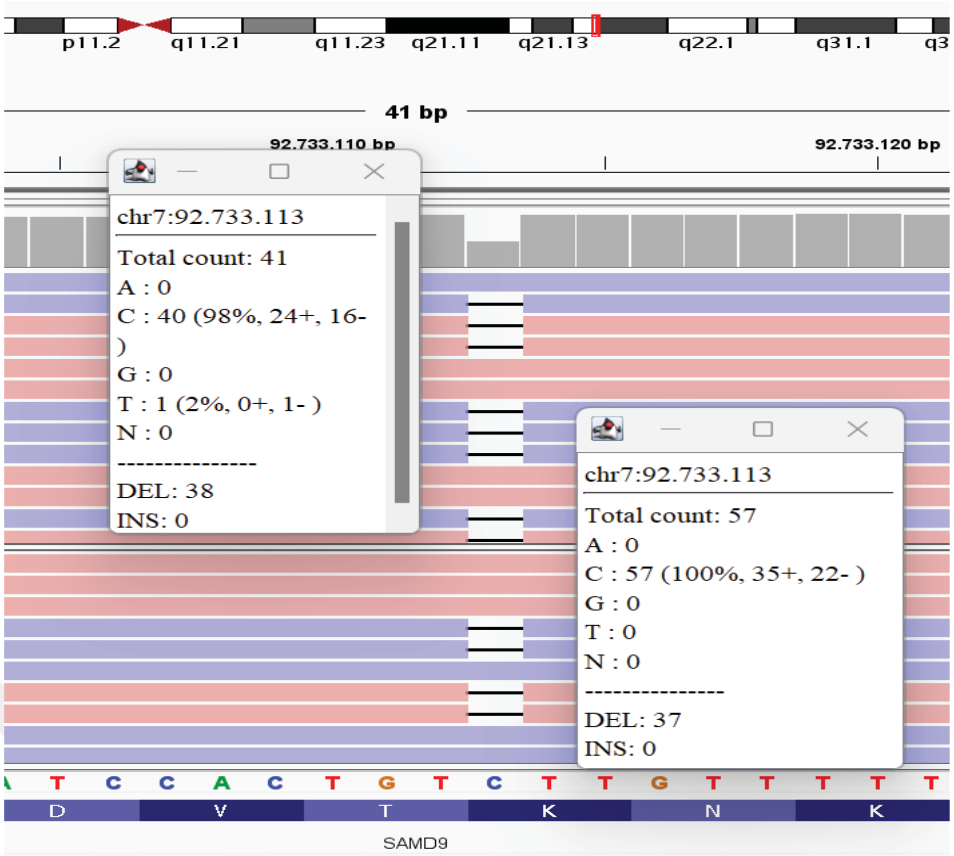
Tablo 9. A2H1 ve A2H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar

GEN* (TRANSKRİPT)	VARYASYON	ZİGOSİTE	SINIFLANDIRMA**	PROTEİNİN FONKSİYONU***	LİTERATÜR
A2H1 ve A2H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki ortak varyasyonlar					
SAMD9 (NM_017654.4)	c.2298del p.Thr767GlnfsTer 11	HET	LP (PVS1, PM2)	Steril alfa motif alanı içeren protein 9; TNF-alfa sinyal yolağında inflamatuar yanıt regülasyonu	
UBR4 (NM_020765.3)	c.3157T>A p.Trp1053Arg	HET	VUS (PM2, BS2)	Ubiquitin protein ligaz E3 bileşeni N ucu tanıma 4; Klatrin ile birlikte membran morfogenezi ve hücre iskeleti organizasyonu	(87,131–133)
DLK1 (NM_003836.7)	c.1030C>T p.Arg344Trp	HET	VUS (PM2, PP3)	Protein delta homologu 1; Nöroendokrin farklılaşma	(134–137)
MGAT5 (NM_002410.5)	c.140G>A p.Arg47His	HET	VUS (PM2, PP2)	Alfa-1,6-mannosilglikoprotein 6-beta-N-asetilglikozaminiltransferaz A; Alfa-N-asetilglukozamin adı verilen bir şeker molekülünün üretimi	(138–141)
MEFV (NM_000243.3)	c.442G>C Glu148Gln	HET	VUS (PP5, PM5, BP4)	Pirin; Doğal bağışıklık ve IFN-gama inflamatuar yanıtın düzenlenmesi	(142)
DPYS (NM_001385.3)	p.Thr136Met	HET	VUS (PM2, PP3)	Dihidropirimidinaz; pirimidin degradasyonu	
POU6F1 (NM_001330422.2)	c.246_250del (-)	HET	VUS (PM2)	POU domain sınıf 6, transkripsiyon faktörü 1	(143,144)
NRXN3 (NM_001330195.2)	c.378_382delinsCGGCA p.Glu128Lys	HET	VUS (PM2, PP2)	Neurexin-3; Hücre tanıma ve hücre yapışmasında rol oynayabilen nöronal hücre yüzeyi proteini	(145–147)
A2H1'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
NDUFS3 (NM_004551.3)	c.251T>G p.Leu84*	HET	LP (PVS1, PM2)	NADH dehidrojenaz [ubikinon] demir-kükürt proteini 3, mitokondriyal; Kompleks I, elektronların NADH'den solunum zincirine transferinde görevli	(148)
OPA1 (NM_130837.3)	c.826G>A p.Glu258Lys	HET	VUS (PM2, PP3)	Dinamin benzeri 120 kDa protein, mitokondriyal; Mitokondriyal füzyon ve mitokondriyal fisyon arasındaki dengeyi düzenleyerek normal mitokondriyal morfoloji için gerekli	(149–151)

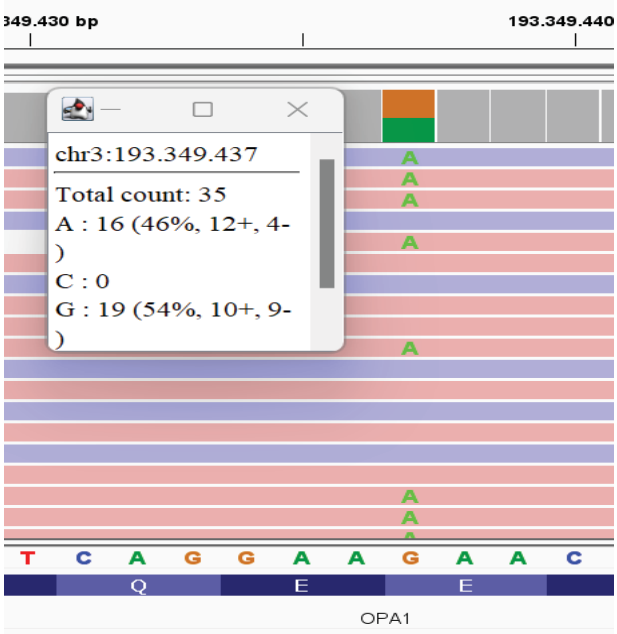
TRAPPC12 (NM_016030.6)	c.701C>A p.Ser234Tyr	HET	VUS (PM2)	Trafik proteini partikül kompleksi alt birimi 12; Endoplazmik retikulum ile Golgi aygıtına geçişi düzenleyen TRAPP kompleksinin bileşeni. Ayrıca kromozom katlanmasın, kinetokorun toplanması ve stabilitesi	(152)
NOS3 (NM_000603.5)	c.2984+3_2984+6 del (-)	HET	VUS (PM2)	Nitrik oksit sentaz, endotelyal	(153)
LRP1 (NM_002332.3)	c.10625G>A p.Arg3542His	HET	VUS (PM2, PP2, PP3)	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlı protein 1 hücre içi domain; Endositoz, apoptotik hücrelerin fagositozu ve lipit homeostazında görevli	(154–156)
CDC42BPB (NM_006035.4)	c.4610C>T p.Pro1537Leu	HET	VUS (PM2, PP2)	Serin/treonin-protein kinaz MRCK beta; hücre iskeletinin yeniden düzenlenmesinde ve hücre göçünün düzenlenmesi	
KCNMA1 (NM_001161352.2)	c.2981C>T p.Thr977Ile	HET	VUS (PM2, PP2)	Kalsiyumla aktifleştirilen potasyum kanalı alt birimi alfa-1	(157)
A2H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
MEFV (NM_000243.3)	c.2177T>C p.Val726Ala	HET	P	Pirin; Doğal bağışıklık ve IFN-gama inflamatuar yanıtın düzenlenmesi	(142)
CSGALNACT1 (NM_001354483.2)	c.802C>T p.Pro268Ser	HET	VUS (PM2, PP3)	Kondroitin sülfat N-asetilgalaktozaminiltransferaz 1; Protein ve lipid glikolizasyonu	(158,159)
SMARCA4 (NM_003072.5)	c.782C>A p.Pro261His	HET	VUS (PM2, PP2)	Transkripsiyon aktivatörü BRG1; Kromatin yeniden yapılanması yoluyla transkripsiyon regülasyonu	
PTPRT (NM_007050.6)	c.3861_3865delinsTTGGT p.Pro1289Ser	HET	VUS (PM2, PP2)	Reseptör tipi tirozin-protein fosfataz T; SSS'de hem sinyal iletiminde hem de hücresel adhezyon	(160)
TRPM2 (NM_003307.3)	c.1282G>T p.Asp428Tyr	HET	VUS (PM2)	Geçici reseptör potansiyeli katyon kanalı alt ailesi M üyesi 2; [İzoform 1]: Na(+) ve Ca(2+) akışına aracılık eden, sitoplazmik Ca(2+) seviyelerinin artmasına yol açan seçici olmayan, voltajdan bağımsız katyon kanalı.	(69,161–163)
KIDINS220 (NM_020738.4)	c.5215C>T p.Arg1739Cys	HET	VUS (PM2, PP2, BP1)	220 kDa'lık kinaz D-etkileşimli substrat; nöronların hayatta kalmasını, aksonlara ve dendritlere farklılaşmayı ve sinaptik plastisiteyi kontrol eden bir transmembran protein	(164–166)

HET: Heterozigot, HOM: Homozigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'
* MANE Select etiketi alan transkript seçilmiştir.
** Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (101) .
***Uniprot veritabanından yararlanılmıştır

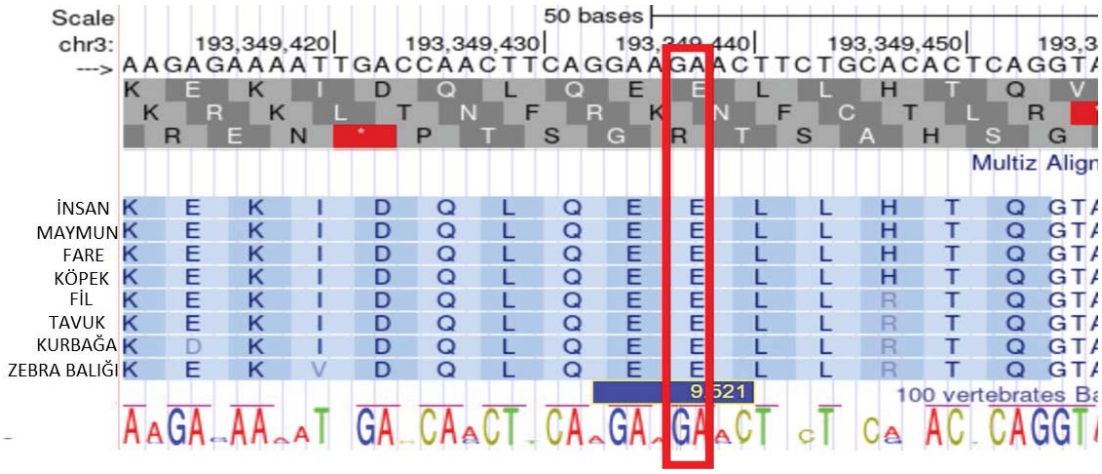
Yapılan analizler sonucunda ailenin her iki üyesinde ortak bulunan, hayvan ve/veya fonksiyonel çalışmalarda MS ile ilişkisi daha kuvvetli gösterilen *SAMD9* geninde bulunan varyasyon tartışılmıştır. Ayrıca A2H1'ni kliniği ile uyumlu olduğu düşünülen *OPA1* genindeki varyasyon tartışmaya dahil edilmiştir. Varyasyonlara ait IGV görüntüleri Şekil 16 ve 17'de gösterilmiştir. *OPA1* genindeki varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu Şekil 18'de gösterilmiştir.



Şekil 16: A2H1 ve A2H2'de bulunan *SAMD9* c.2298delG varyasyonuna ait IGV görüntüsü

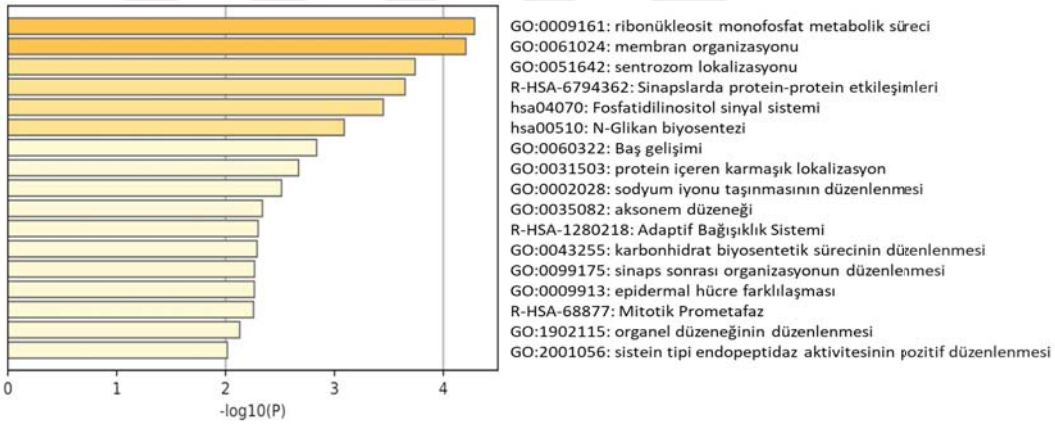


Şekil 17: A2H1'de bulunan *OPA1* c.826G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 18: *OPA1* c.826G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

Yolak analiz için tespit edilen 104 varyasyon Metascape'de ve String çevrimiçi programlarında değerlendirilmiştir (Şekil 19).



Şekil 19: A2 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi.

4.2.3. A3 Ailesi

4.2.3.1 A3H1 ve A3H2 Klinik Bilgiler

A3H1: 25 yaşında kadın hasta, 18 yaşında sol elde parestezi şikayeti sonrasında kortizol tedavisi almış ve ilaçsız izleme alınmıştır. Takiplerinde şikayeti olmayan hastanın kontrol kraniyal MRG'larında aktif lezyon sayısı artışı olması sebebi ile betaferon tedavisi başlanmış ancak bir sene sonrasında karaciğer enzimi yüksekliği gelişmesi ve kraniyal MRG'de lezyonların artması sebebi ile tysabri (natalizumab) tedavisine geçilmiştir. Hasta ilk atak dışında başka atak tariflememektedir. Wolf-Parkinson-White sendromu sebebi ile 2 kez cerrahi ablasyon tedavisi olmuştur.

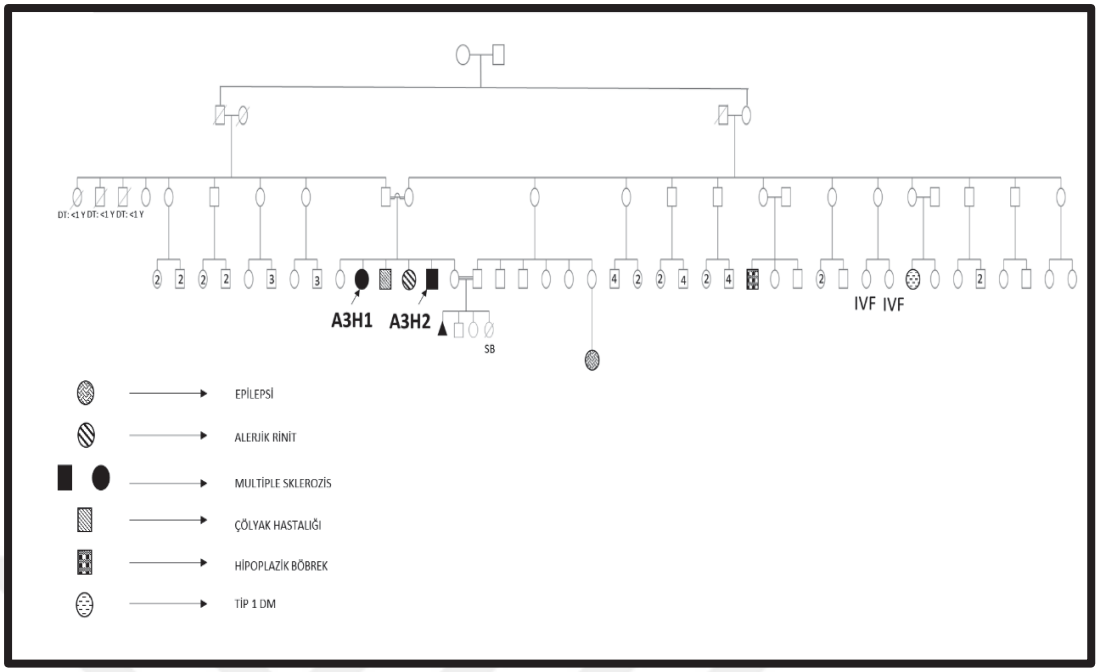
Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış. Yapılan fizik muayenesinde bir bulgu saptanmadı ve antropometrik ölçümleri normaldir.

Kraniyal MRG'sinde korpus kallozumda, periventrüküler derin beyaz cevherde yaygın kronik demyelinizan plaklar izlenmiştir, diğer yapılarda patolojik görüntü saptanmamıştır. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L altında saptanmıştır. Tanı zamanı BOS'da OKB saptanmamıştır. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik test yapılmamıştır.

A3H2: A3H1'in erkek kardeşi olan 17 yaşındaki hasta, 15 yaşında görmede azalma, sağ elde hipoestezi, sağ ayak tabanında parestezi şikayetleri gelişmesi üzerine MS tanısı almıştır. Betaferon tedavisine başlanılan hastada tedavi altında kraniyal MRG'de yeni lezyonlar gelişmesi ve görme kaybı şikayeti gerilememesi üzerine tedavisi değiştirilmiştir. 8 aydır tecfidare (Dimetil fumarat) kullandığını ve bu tedaviye geçtikten sonra görme probleminde düzelme olduğunu belirtmektedir. Hasta ilk atak dışında baş dönmesi, gözlerde kararma, alt ekstremitede parestezi şikayetleri ile 3 kez atak geçirmiştir. Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde bir bulgu saptanmadı ve antropometrik ölçümleri normaldir.

Kraniyal ve orbital MRG servikal, spinal kord, beyin sapı, serebellum ve serebral parankimde, sağ optik sinirde çok yaygın demyelinizan plaklar saptanmıştır şeklinde raporlanmış. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L altında saptandı. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik testlerde EBV VCA IgG pozitif saptanmıştır. Tanı zamanı BOS'da OKB saptanmıştır. Anti-MOG ve anti-NMO saptanmamıştır.

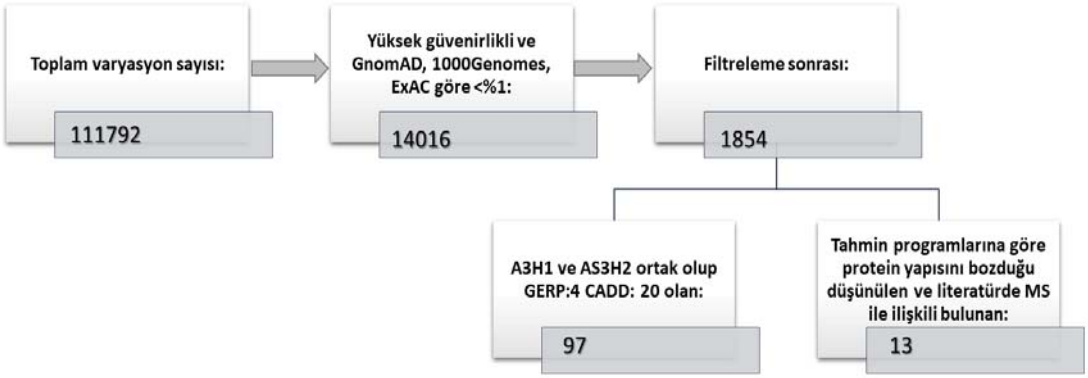
Alınan soygeçmiş öyküsüne göre çizilen pedigri Şekil 20'de gösterilmiştir.



Şekil 20: A3 Ailesine ait pedigri

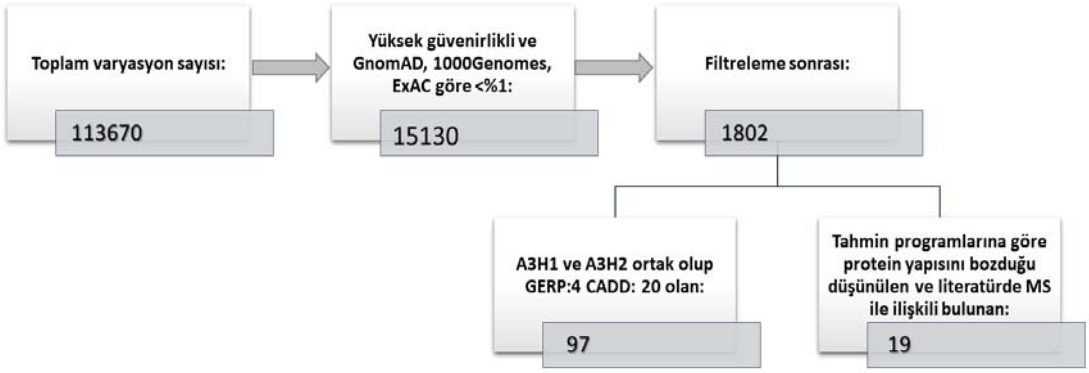
4.2.3.2 A3H1 ve A3H2 WES Bilgileri

A3H1'de biyoinformatik analizlerde 17434 gende 111792 varyasyon saptandı. Yapılan filtrelemelerden sonra 1091 gende 1854 varyasyon tespit edildi (Şekil 21). Literatür taraması ile beraber 13 gende bulunan varyasyonların hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 10' da özetlenmektedir.



Şekil 21: A3H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

A3H2'de biyoinformatik analizlerde 17330 gende 113670 varyasyon saptandı. Yapılan filtrelemelerden sonra 1067 gende 1802 varyasyon tespit edildi (Şekil 22). Literatür taraması ile beraber 19 gende bulunan varyasyonların hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 10' da özetlenmektedir.



Şekil 22: A3H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

Tablo 10. A3H1 ve A3H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar

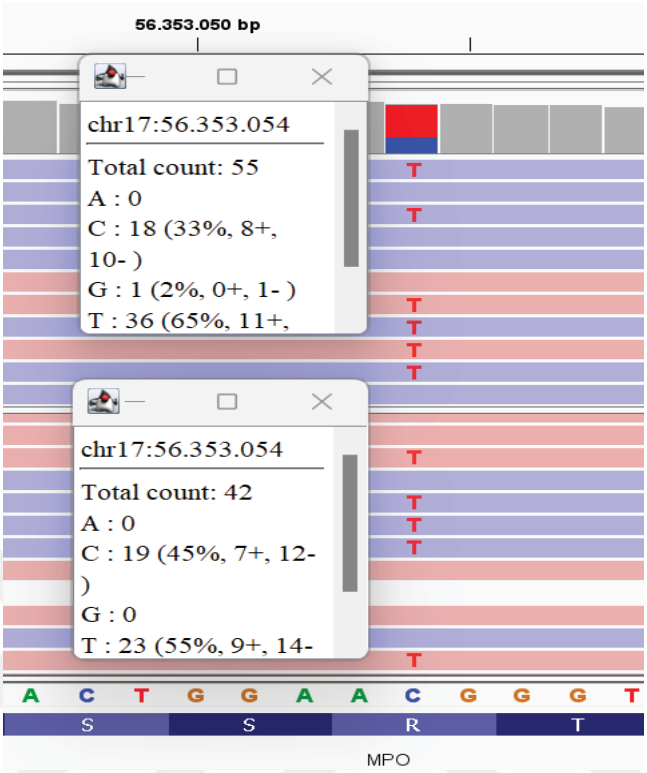
GEN* (TRANSKRİPT)	VARYASYON	ZİGOSİTE	SINIFLANDIRMA**	PROTEİNİN FONKSİYONU***	LİTERATÜR
A3H1 ve A3H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki ortak varyasyonlar					
MPO (NM_000250.2)	c.1214G>A p.Arg405His	HET	VUS (PM2, PP3)	Miyeloperoksidaz ağır zinciri; Bakterisidal reaktif oksijen türleri üreten enzim	(167–171)
UBR4 (NM_020765.3)	c.8318C>T p.Ser2773Leu	HET	VUS (PM2, PP2)	E3 ubikuitin-protein ligaz UBR4; spesifik N-terminal kalıntılarını taşıyan proteinlerin ubikuitinasyonu	(87,131–133)
NAAA (NM_014435.4)	c.999-3C>T (-)	HET	VUS (PM2)	N-asiletanolamin-hidrolize edici asit amidaz alfa alt birimi; Sinir sisteminde önemli bir rol oynayan N-asetilaspartat adı verilen bir amino asidi üreten enzim	(172–174)
LIMK2 (NM_005569.4)	c.932G>A p.Arg311His	HET	VUS (PM2, PP3)	LIM domain kinaz 2; Aktin filament dinamiğinin düzenlenmesinde önemli bir rol oynayan serin/treonin-protein kinaz. Hücre göçü ve bölünmesi gibi önemli hücresel işlemler için gerekli	(175,176)
PLXNB3 (NM_005393.3)	c.4667T>C p.Leu1556Ser	HEMİ HET	VUS (PM2)	Pleksin-B3; Akson gelişimi, istilacı büyüme ve hücre göçünde rol oynayan SEMA5A reseptörü. Nöron büyümesini uyarır ve Ca(2+)/Mg(2+)'ye bağlı hücre toplanmasına aracılık eder	(175,177)
LEF1 (NM_016269.5)	c.35G>C p.Gly12Ala	HET	VUS (PM2, PP3)	Lenfoid arttırıcı bağlama faktörü 1; Wnt sinyal yolunda görevli. T hücresi reseptörü alfa fonksiyonu regülasyonu	(77)
KIF5C (NM_004522.3)	c.2101-3C>T (-)	HET	VUS (PM2, PP3)	Kinesin ağır zincir 5C izoformu; Sinaptik iletimde, mRNA'ların dentritiklere taşınmasında ve akson uzamasında görevli kinesin ailesinden bir protein	(178–180)
LONP2 (NM_031490.5)	c.1836dup p.Ile613Tyrfs*3	HET	VUS (PM2)	Lon proteaz homologu 2, peroksizomal; Peroksizomal matristeki yanlış katlanmış ve	(181–183)

				birleştirilmemiş polipeptitlerin seçici bozulmasına aracılık eden ATP'ye bağımlı serin proteaz	
ARHGAP33 (NM_001366178.1)	c.3262G>A p.Glu1088Lys	HET	VUS (PM2)	Rho GTPaz aktive edici protein 33; hücre göçü ve bölünmesi gibi önemli hücresel süreçleri düzenleme	(184–187)
A3H1'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
GPER1 (NM_001098201.3)	c.776G>A p.Arg259His	HET	VUS (PM2)	G-proteinine bağlı östrojen reseptörü 1; 17-beta-östradiole (E2) yüksek afiniteyle bağlanan, çok sayıda hücre içi sinyal yolunun hızlı ve geçici aktivasyonuna yol açan G-proteinine bağlı östrojen reseptörü.	(188–192)
SRRM2 (NM_016333.4)	c.7632_7638delinsCTCT p.Ser2556del	HET	VUS (PM2, BP3)	Serin/arginin tekrarlayan matris proteini 2; Spliceozomun bileşeni olarak mRNA öncesi birleştirme için gerekli	
IDUA (NM_000203.5)	c.667G>C p.Asp223His	HET	VUS (PM2, PP2, PP3)	Alfa-L-iduronidaz	
GAA (NM_000152.5)	c.546+5G>A (-)	HET	VUS (PM2, PP3)	70 kDa lizozomal alfa-glukosidaz; Glukoserebrosidaz (GAA) enzimi	(193)
A3H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
ETFDH (NM_004453.4)	c.1130T>C p.Leu377Pro	HET	P (PM2, PM3)	Elektron transferi flavoprotein-ubikinon oksidoredüktaz, mitokondriyal	
PANK2 (NM_001386393.1)	c.22C>T p.Gln8*	HET	LP (PVS1, PM2)	Pantotenat kinaz 2, mitokondriyal; CoA biyosentezi	
SLITRK2 (NM_032539.5)	c.943 G>C p.Val315Leu	HEMİ	VUS (PM2)	SLIT ve NTRK benzeri protein 2; Sinaptogenez ve sinaps farklılaşması	(194)
CHRNA7 (NM_000746.6)	c.689C>T p.Thr230Met	HET	VUS (PM2, PP3)	Nöronal asetilkolin reseptörü alfa-7 alt birimi	(195,196)
GRIK2 (NM_021956.5)	c.1073G>A p.Arg358His	HET	VUS (PM2, PP3)	Glutamat reseptörü iyonotropik, kainat 2; İyonotropik glutamat reseptörü	(197,198)
GRIK3 (NM_000831.4)	c.723C>G p.Ile241Met	HET	VUS (PM2)	Glutamat reseptörü iyonotropik, kainat 3; İyonotropik glutamat reseptörü	(197,198)
OPTN (NM_001008212.2)	c.1253T>G p.Val418Gly	HET	VUS (PM2, PP3)	Optinörin; Miyozin VI ve Rab8 ile etkileşimi yoluyla Golgi kompleksinin korunmasında, membran trafiğinde, ekzositozda görevli	(199,200)
PSMC1 (NM_002802.3)	c.1183A>G p.Ile395Val	HOMO	VUS (PM2, PP2)	26S proteazom düzenleyici alt birim 4; 26S proteozomun kompleksi yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinleri ve işlevleri artık gerekli olmayan proteinleri degredasyonudan sorumlu	(201,202)
LRP1 (NM_002332.3)	c.11783G>A p.Ser3928Asn	HET	VUS (PM2, PP2)	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlı protein 1, intraselüler domain; Endositoz ve apoptotik hücrelerin fagositozunda rol oynayan endositik reseptör	(154–156)
ASXL3 (NM_030632.3)	c.2213C>T p.Ser738Phe	HET	VUS (PM2)	Additional Sex Combs Like 3; Putative Polycomb proteini, transkripsiyon faktörü	

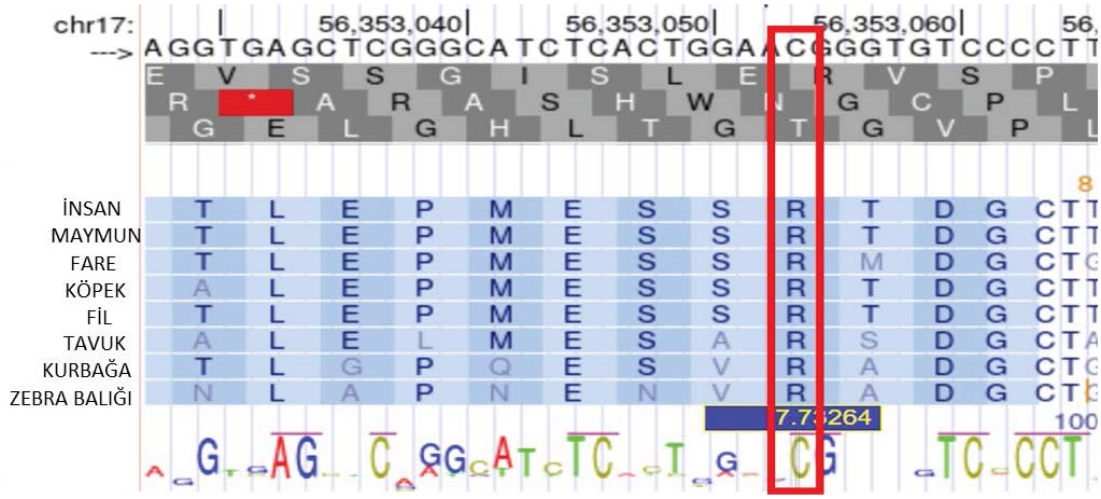
HET: Heterozigot, HOM: Homozigot, HEMİ: Hemizigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'
* MANE Select etiketi alan transkript seçilmiştir.
** Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (101) .
***Uniprot veritabanından yararlanılmıştır.

Yapılan analizler sonucunda ailenin her iki üyesinde ortak bulunan, hayvan ve/veya fonksiyonel çalışmalarda MS ile ilişkisi daha kuvvetli gösterilen *NAAA, MPO* genlerinde bulunan varyasyonlar tartışılmıştır. Ayrıca A3H2'nin kliniğine katkı sağladığı düşünülen *SLITRK2, PSMC1, GRIK2* genlerindeki varyasyon tartışmaya dahil edilmiştir. Varyasyonlara ait IGV görüntüleri Şekil 23, 25, 26, 28 ve 30'da

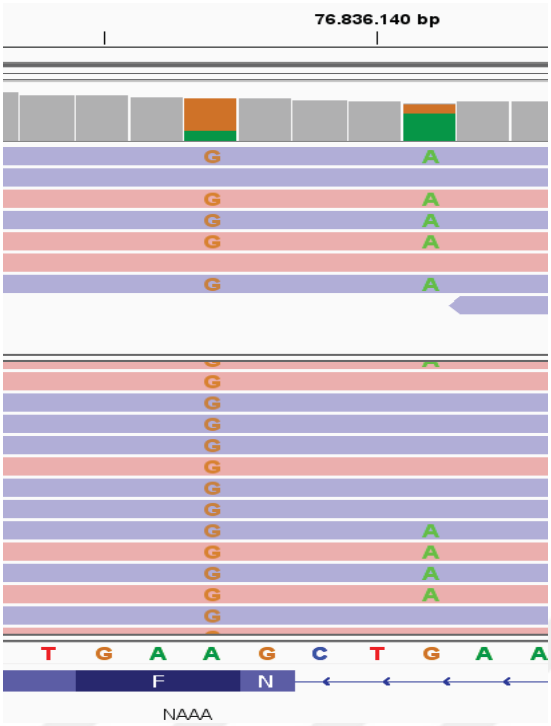
gösterilmiştir. Varyasyonların ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu Şekil 24,27,29 ve 31'de gösterilmiştir.



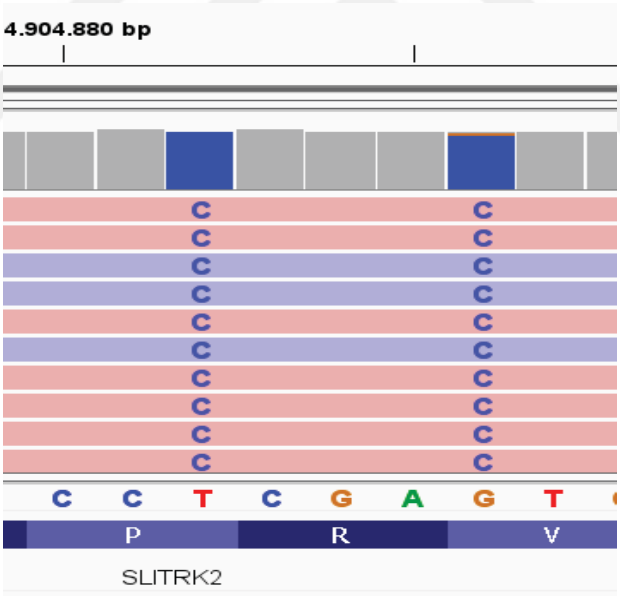
Şekil 23: A3H1 ve A3H2'de bulunan *MPO* c.1214G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü



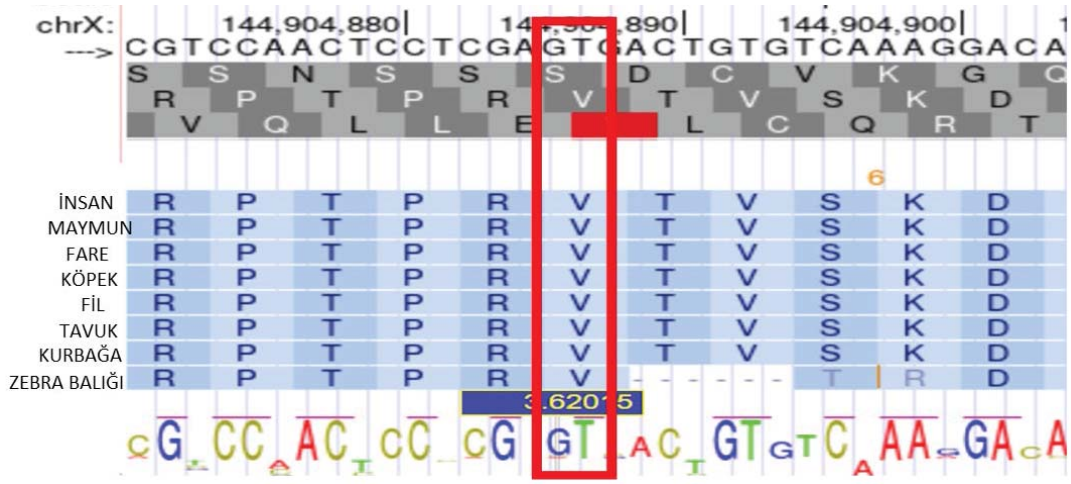
Şekil 24: *MPO* c.1214G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu



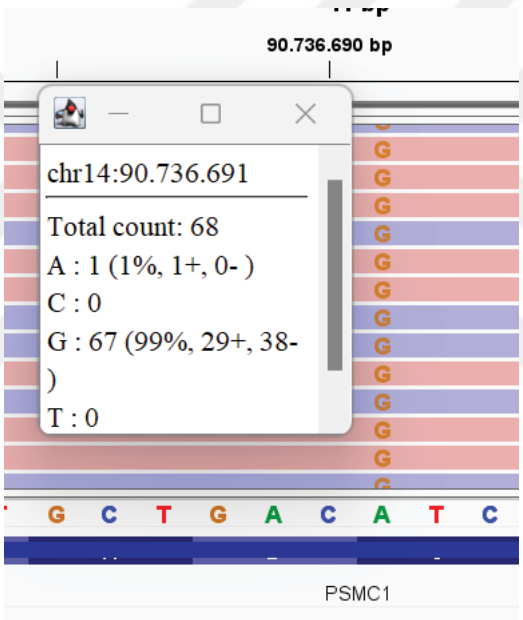
Şekil 25: A3H1 ve A3H2'de bulunan *NAAA* c.999-3C>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü



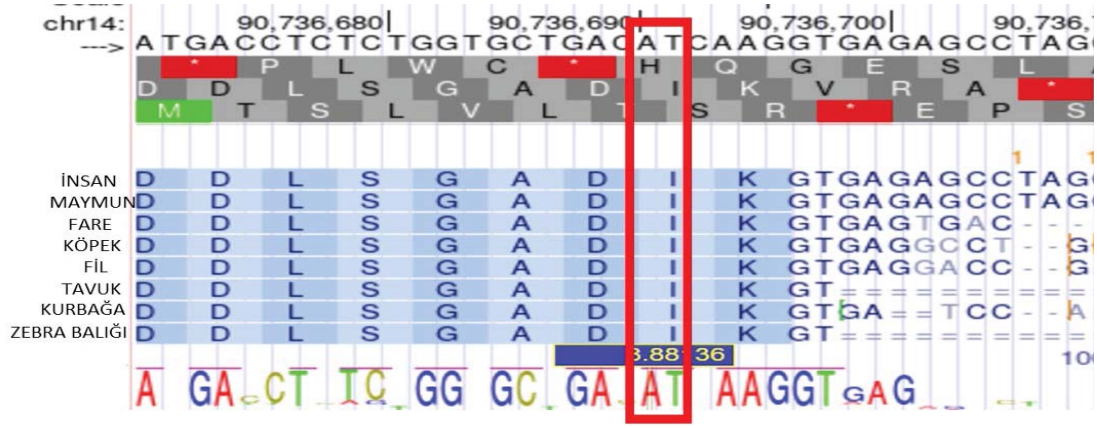
Şekil 26: A3H2'de bulunan *SLITRK2* c.943G>C varyasyonuna ait IGV görüntüsü



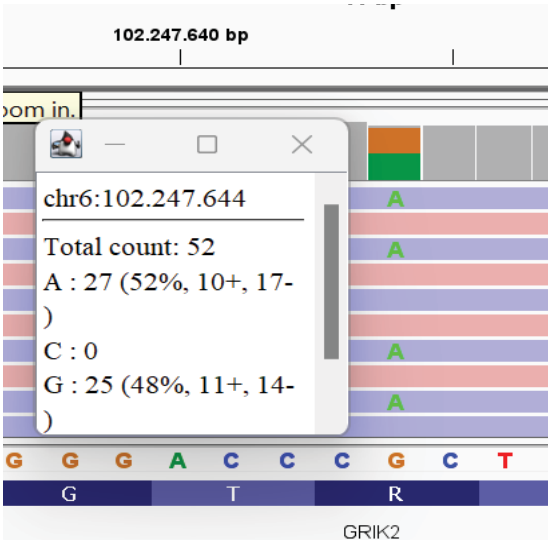
Şekil 27: *SLITRK2* c.943G>C varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu



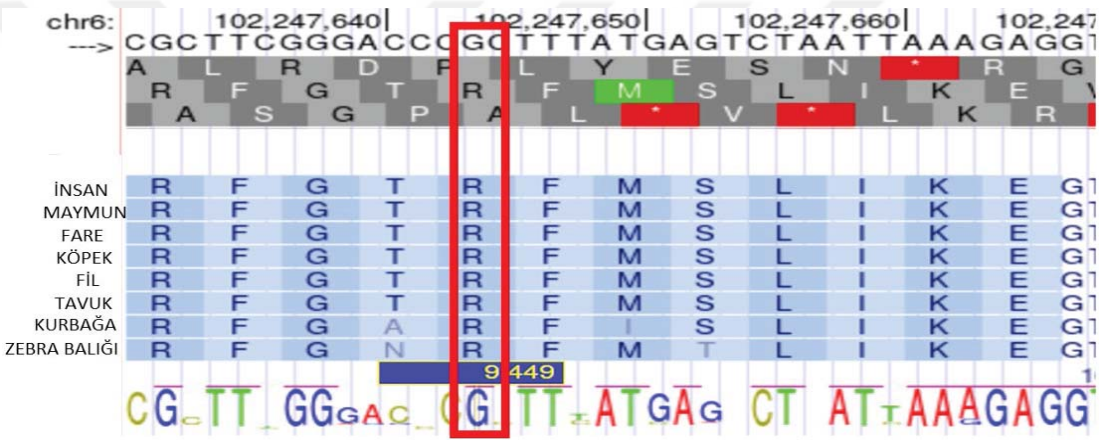
Şekil 28: A3H2'de bulunan *PSMC1* c.1183A>G varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 29: *PSMC1* c.1183A>G varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

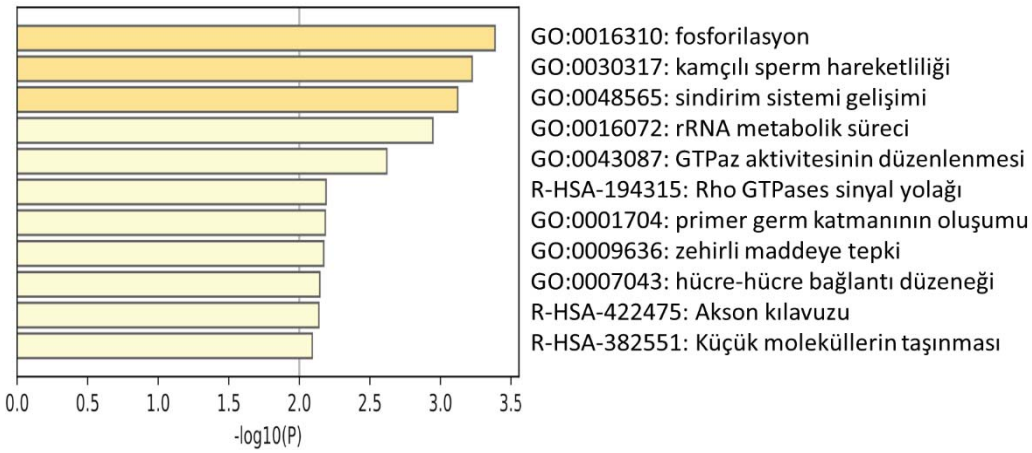


Şekil 30: A3H2'de bulunan *GRIK2* 1073G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 31: *GRIK2* 1073G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

Yolak analiz için tespit edilen 104 varyasyon Metascape'de ve String çevrimiçi programlarında değerlendirilmiştir (Şekil 32)



Şekil 32: A3 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi

4.2.4. A4 Ailesi

4.2.4.1 A4H1 ve A4H2 Klinik Bilgiler

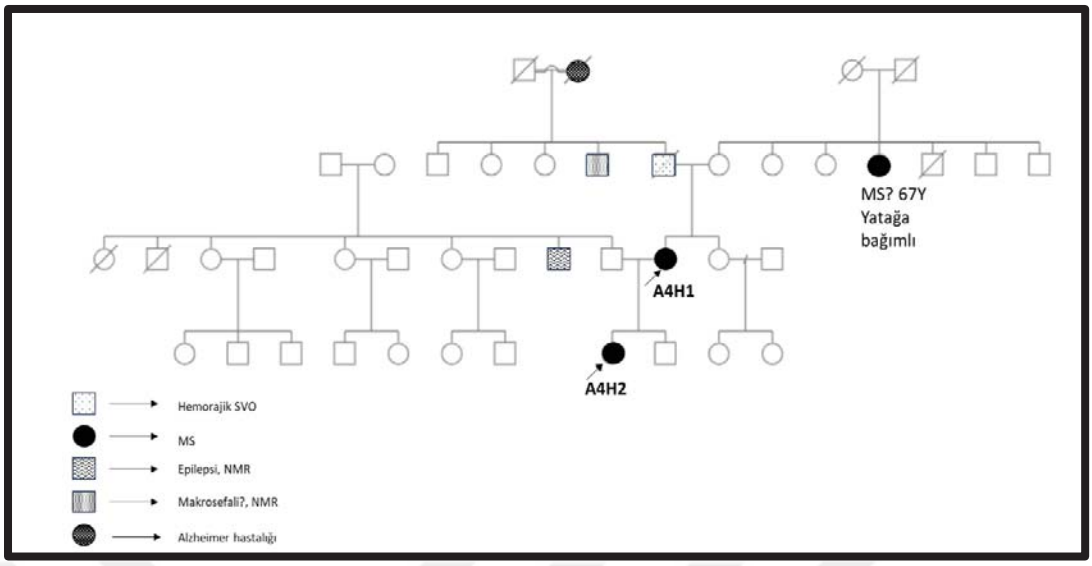
A4H1: 37 yaşında kadın hastanın 2013 yılında 26 yaşındayken bilateral gözlerde içe doğru kayma şikayeti gelişmiş ve 1-2 yıl akabinde ikinci kez aynı şikayetin tekrar etmesi sonucunda yapılan muayenede MS tanısı almıştır. Hasta en sonuncusu 3 yıl önce olmak üzere 4 kez atak geçirdiğini ve hepsinde de ilk ataktaki şikayeti tekrarladığını belirmiştir. Ataklar esnasında 1 gr/gün IVMP tedavisi alan hasta son bir yıldır ilaçsız izlenmektedir. Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde bir bulgu saptanmadı ve antropometrik ölçümleri normaldir.

Kraniyal MRG, solda inferior parietal lobda periventriküler yerleşimli, oval şekilde demyelinizan inflamatuar matürde T2 hiperintens lezyon saptanmıştır. Hastanın spinal MRG'sinde MS ile ilişkili bulunmamaktadır. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L altında saptanmıştır. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik test negatif bulunmuştur.

A4H2: A4H1'in kızı olan 17 yaşında kadın hasta, 16 yaşında sağ gözde dışa kayma şikayeti sebebi ile 1 gr/gün IVMP tedavisi almış. Yapılan tetkikler sonucunda MS tanısı almış olup ilaçsız takip edilmekte ve ilk atağından başka atak tariflememektedir. Antenatal takipleri düzenli ve normal olan hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde bir bulgu saptanmamış olup antropometrik ölçümleri normaldir.

Kraniyal MRG'de, sol lateral ventrikül komşuluğunda ventriküle dik uzanan T2 hiperintens demyelinizan plak tespit edilmiştir. Hastanın BOS incelemesinde OKB pozitif bulunmuştur. Anti-MOG ve anti-NMO saptanmamıştır. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L altında saptanmıştır. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik bir test yapılmamıştır.

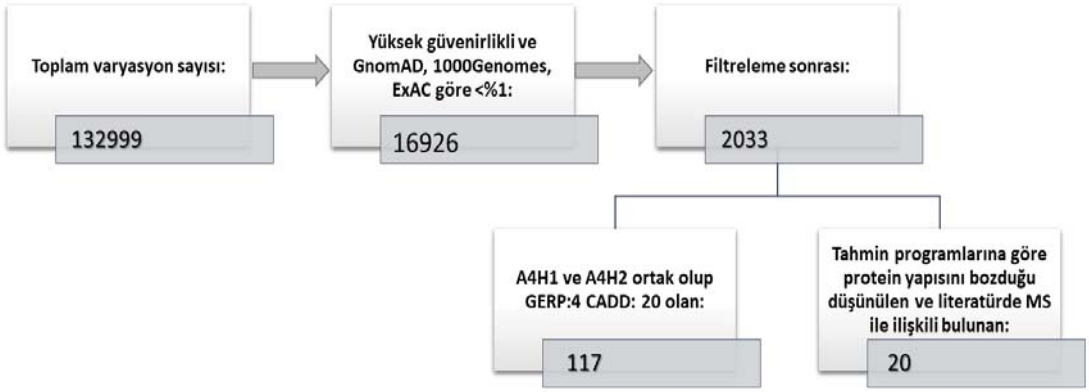
Alınan soygeçmiş öyküsüne göre çizilen pedigri Şekil 33'de gösterilmiştir.



Şekil 33: A4 Ailesine ait pedigri

4.2.4.2 A4H1 ve A4H2 WES Bilgileri

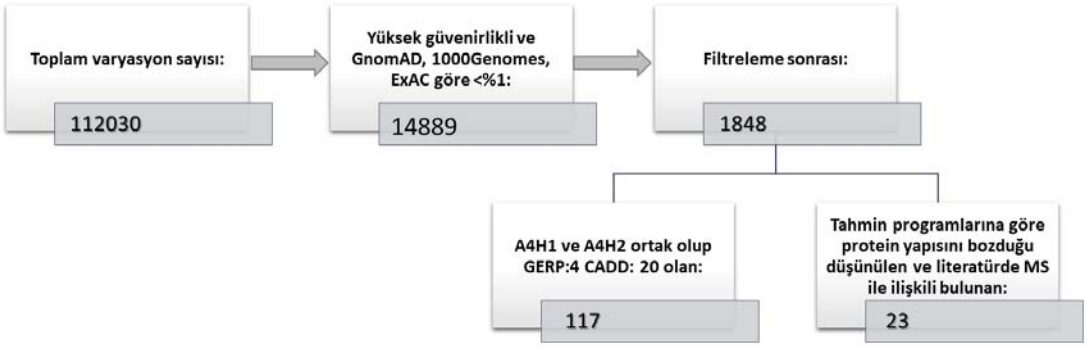
A4H1'de biyoinformatik analizlerde 18457 gende 132999 varyasyon saptandı. Yapılan filtrelemelerden sonra 1176 gende 2033 varyasyon tespit edildi (Şekil 34). Literatür taraması ile beraber 20 gende bulunan varyasyonların hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 11' de özetlenmektedir.



Şekil 34: A4H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

A4H2'de biyoinformatik analizlerde 17302 gende 112030 varyasyon saptandı. Yapılan filtrelemelerden sonra 1062 gende 1848 varyasyon tespit edildi (Şekil 35). Literatür taraması ile beraber 24 gende bulunan varyasyonların hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 11' de

özetlenmektedir.



Şekil 35: A4H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

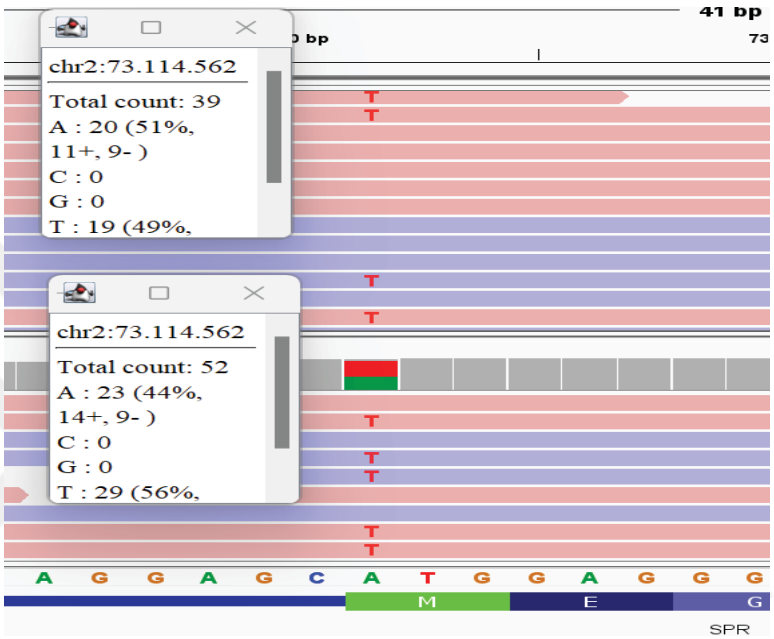
Tablo 11. A4H1 ve A4H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar

GEN* (TRANSKRİPT)	VARYASYON	ZİGOSİTE	SINIFLANDIRMA**	PROTEİNİN FONKSİYONU***	LİTERATÜR
A4H1 ve A4H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki ortak varyasyonlar					
SPR (NM_003124.5)	c.1A>T p.Met1Leu	HET	LP (PS1, PVS1)	Sepiapterin redüktaz; tetrahidrobiopterin biyosentezi	
TYMP (NM_001953.5)	c.1327_1346del (-)	HET	P	Timidin fosforilaz; Anjiogenez	(203–205)
STAT5A (NM_001288718.2)	c.1270A>T p.Ile424Phe	HET	VUS (PM2, PP3)	Sinyal dönüştürücü ve transkripsiyon aktivatörü 5A; sitokin sinyal yollağında görevli	(206–209)
TRIM74 (NM_198853.3)	c.703G>T p.Glu235*	HET	VUS (PM2)	Tripartite motif içeren 74; TRIM-NHL protein ailesi viral enfeksiyonlara karşı bağışıklık savunması	(14,210)
PRICKLE1 (NM_153026.3)	c.1601G>A p.Arg534Gln	HET	VUS (PM2, BP4)	Diken benzeri protein 1; hücre-hücre bağlantısında ve planar hücre kutupluluğunun düzenlenmesi. Nöral tüp kapanmaında etkin	(211)
WDR19 (NM_025132.4)	c.814C>T p.Arg272Cys	HET	VUS (PM2, PP3, PM1)	WD tekrarı içeren protein 19; Silya fonksiyonu ve/veya toplanması	(87)
WDR41 (NM_018268.4)	c.586+3_586+6 del (-)	HET	VUS (PM2, PP3)	WD tekrarı içeren protein 41; Guanin nükleotid değişim faktörü (GEF) aktivitesine sahip olan ve otofajiyi düzenleyen bir kompleks olan C9orf72-SMCR8 kompleksinin katalitik olmayan bileşeni.	(212–214)
ADSL (NM_000026.4)	c.986G>A p.Arg329His	HET	VUS (PM2, PP2, PP3)	Adenilosüksinat liyaz	
LPCAT4 (NM_153613.3)	c.563G>A p.Arg188Gln	HET	VUS (PM2, PP3)	Lizofosfatidilkol asiltransferaz 4; Lipit metabolizması	(215)
PEX1 (NM_000466.3)	c.274G>C p.Val92Leu	HET	VUS (PM2, PP3)	Peroksizom biyogenez faktörü 1; peroksizom matrisine protein taşınması	(216)
ACE (NM_000789.4)	c.1052C>T p.Pro351Leu	HET	VUS (PM2)	Anjiyotensin dönüştürücü enzim	(217–219)
CAT (NM_001752.4)	c.1139G>A p.Arg380His	HET	VUS (PM2)	Katalaz; ücreleri serbest radikallerin neden olduğu hasarlardan korumaya yardımcı	
FAM167A (NM_053279.3)	c.635C>G p.Ser212Cys	HET	VUS (PM2)	Protein FAM167A; Görevi tam bilinmemekte	(76)

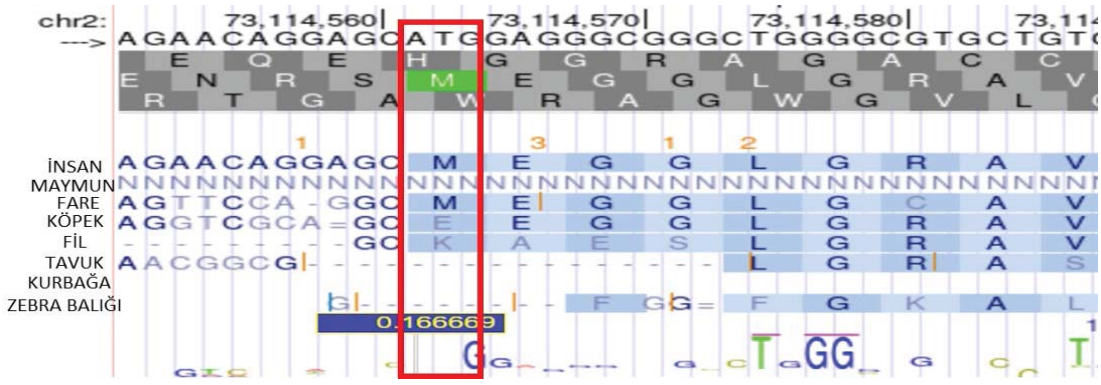
PLD4 (NM_138790.5)	c.703C>T p.Arg235Trp	HET	VUS (PM2)	Phospholipaz D aile numarası 4; tek zincirli DNA konsantrasyonunu azaltarak inflamatuar sitokin yanıtlarını düzenleme	(220,221)
A4H1'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
MEFV (NM_000243.3)	c.2080A>G p.Met694Val	HET	P	Pirin; Doğal bağışıklık ve IFN-gama inflamatuar yanıtın düzenlenmesi	(142)
PIDD1 (NM_145886.4)	c.1767-1G>C (-)	HET	LP (PVS1, PM2)	P53 ile indüklenen death domaini içeren protein 1; p53/TP53'ün aşağısında işlev gören ve hücrenin hayatta kalmasını veya apoptozu destekleyebilen DNA hasarı/stres tepki yolunun bileşeni	(222)
SARM1 (NM_015077.4)	c.799_801delinsCGGCTGCACGCCTGCCTCGCAGTAGC p.Val276Cysfs*7	HET	VUS (PM2)	Sterile Alpha/Beta-alakalı motif-içeren 1; NAD(+) metabolizmasını düzenleyerek yaralanmayı takiben aksonal dejenerasyonda anahtar rol oynayan NAD(+) hidrolaz	(223)
AKNA (NM_001317950.2)	c.1964T>C p.Leu655Pro	HET	VUS (PM2)	AT-hook transkripsiyon factor; Mikrotübül organizasyonunu düzenleme. Ek olarak, antijene bağımlı B hücresi gelişimi için kritik olan, CD40 reseptörü ve onun ligandının ekspresyonunu spesifik olarak aktive eden bir transkripsiyon faktörü	(224,225)
LRP2 (NM_004525.3)	c.2635T>G p.Trp879Gly	HET	VUS (PM2, PP3)	Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörüne bağlı protein 2; Yüksek yoğunluklu lipoproteinlerin endositozu. 25-hidroksivitamin'in renal geri alımı	(226–228)
TRPM6 (NM_017662.5)	c.146T>C p.Leu49Ser	HET	VUS (PM2)	Geçici reseptör potansiyeli katyon kanalı alt ailesi M üye 6; Magnezyum homeostazı	(229)
A4H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
CYP2R1 (NM_024514.5)	c.1241G>A p.Trp414*	HET	LP (PVS1, PM2)	Sitokrom P450 2R1; D Vitamini 25-hidroksilaz	(230–233)
CELF2 (NM_001326325.2)	c.111-2A>G (-)	HET	VUS (PM2)	CUG bağlayıcı Elav benzeri aile proteini 2; alternatif splays, mRNA translayonu ve stabilite	(234–236)
ATAD3B (NM_031921.6)	c.904_906+2del (-)	HET	VUS (PM2)	ATPase ailesi AAA alanı içeren protein 3B; Azalan mitokondriyal metabolizma, düşük mtDNA kopyaları ve parçalanmış mitokondriyal ağ ile karakterize edilen, kök hücrelere özgü bir mitokondriyal ağ organizasyonu	
DAB2 (NM_001343.4)	c.377G>T p.Arg126Leu	HET	VUS (PM2)	Disabled homolog 2; klatrin aracılı endositoz	(237–239)
MCF2L (NM_001112732.3)	c.2154+1G>A (-)	HET	VUS (PM2)	Guanin nükleotid değişim faktörü DBS; RHOA ve CDC42 sinyal yollarının düzenlenmesine katkıda bulunan guanin nükleotid değişim faktörü. Hücre büyümesi, farklılaşması, göçü ve gelişimi için önemli	
MMP12 (NM_002426.6)	c.1A>G p.Met1Val	HET	VUS (PM2)	Makrofaj metaloelastazı; Doku hasarına ve yeniden yapılanma	(240–242)
TTC26 (NM_024926.4)	c.803G>A p.Arg268Gln	HET	VUS (PM2)	Intraflagellar transport protein 56; Hareketlilik ile ilgili spesifik siliyer proteinlerin taşınması için gerekli	
TTC28 (NM_001145418.1)	c.628G>C p.Gly210Arg	HET	VUS (PM2, PP2, PP3)	Tetratrikopeptid tekrar proteini 28; Mitoz sırasında, iğ orta bölgesi mikrotübüllerinin yoğunlaşmasına katılarak orta gövde oluşumu	(243)
UBE2Q2 (NM_173469.4)	c.1064A>G p.Tyr355Cys	HET	VUS (PM2)	Ubiquitin-konjuge enzim E2 Q2; E1 kompleksinden ubikuitini kabul eder ve onun diğer proteinlere kovalent bağlanmasını katalize eder	(87)

HET: Heterozigot, HOM: Homozigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'
* MANE Select etiketi alan transkript seçilmiştir.
** Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (101).
***Uniprot veri tabanından yararlanılmıştır.

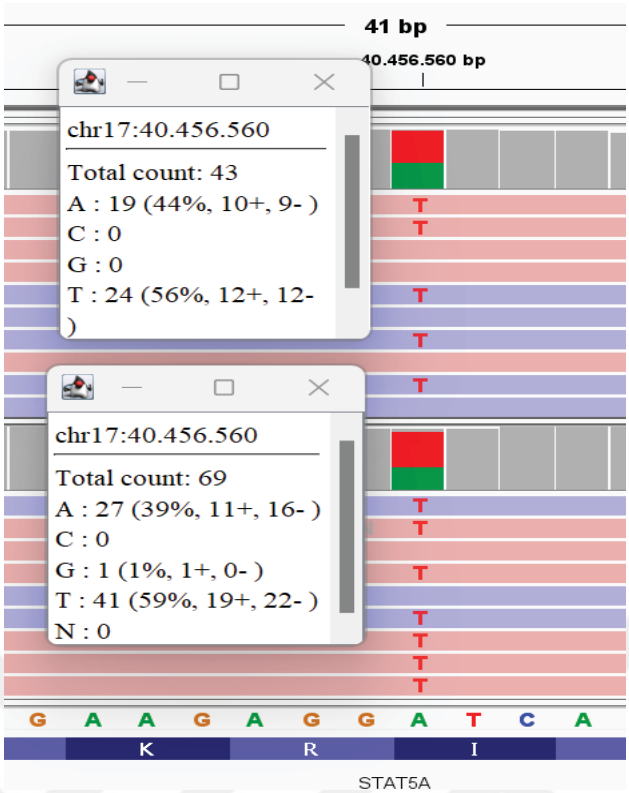
Yapılan analizler sonucunda ailenin her iki üyesinde ortak bulunan ve klinikleri ile ilişkili bulunan *SPR* ve MS etiyolojisi ile ilişki olduğu düşünülen *STAT5A* genlerinde bulunan varyasyonlar tartışılmıştır. Ayrıca A4H1'ni kliniği ile uyumlu olduğu düşünülen *SARM1* ve A4H2'deki *CYP2R1, DAB2* genlerindeki varyasyonlar tartışmaya dahil edilmiştir. Varyasyonlara ait IGV görüntüleri Şekil 36, 38, 40, 41, 43'te gösterilmiştir. Varyasyonların ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu Şekil 37, 39, 42, 44'te gösterilmiştir.



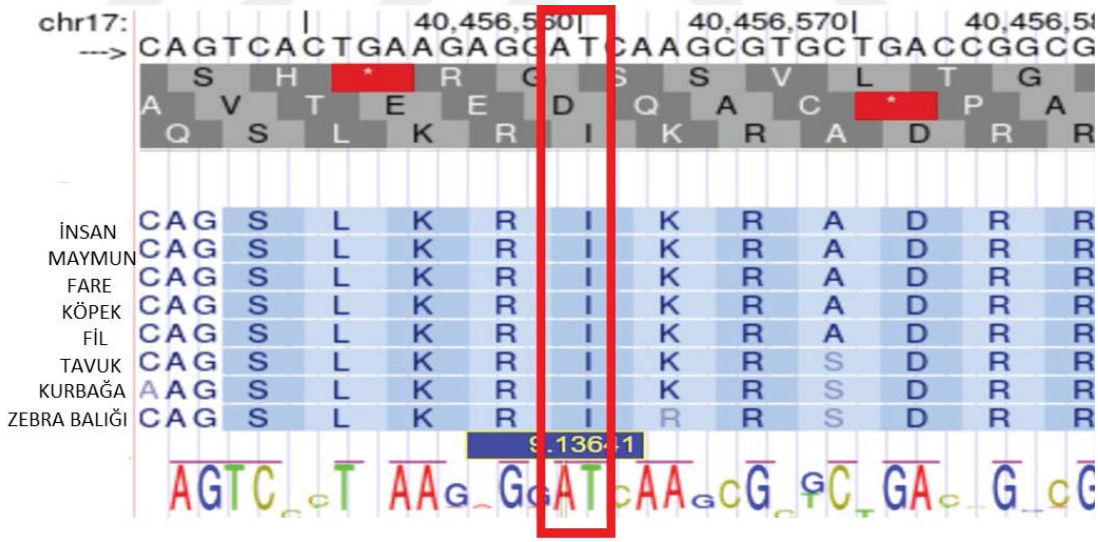
Şekil 36: A4H1 ve A4H2'de bulunan *SPR* c.1A>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü



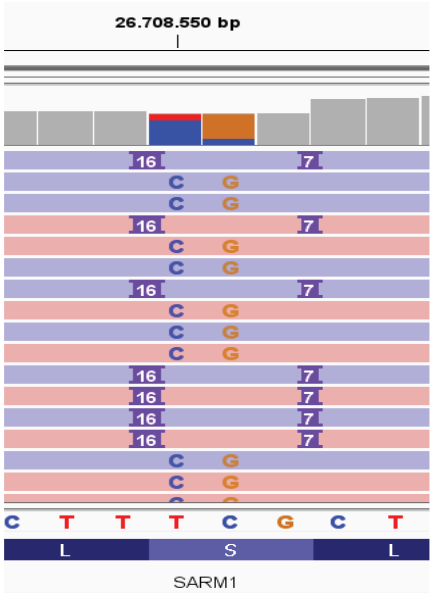
Şekil 37: *SPR* c.1A>T varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu



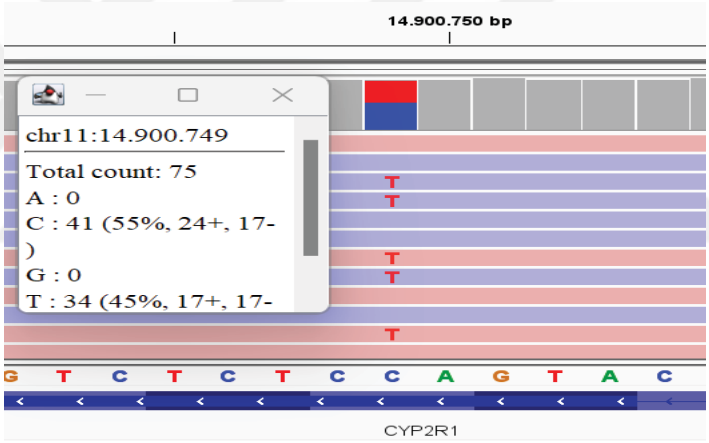
Şekil 38: A4H1 ve A4H2'de bulunan *STAT5A* c.1270A>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü



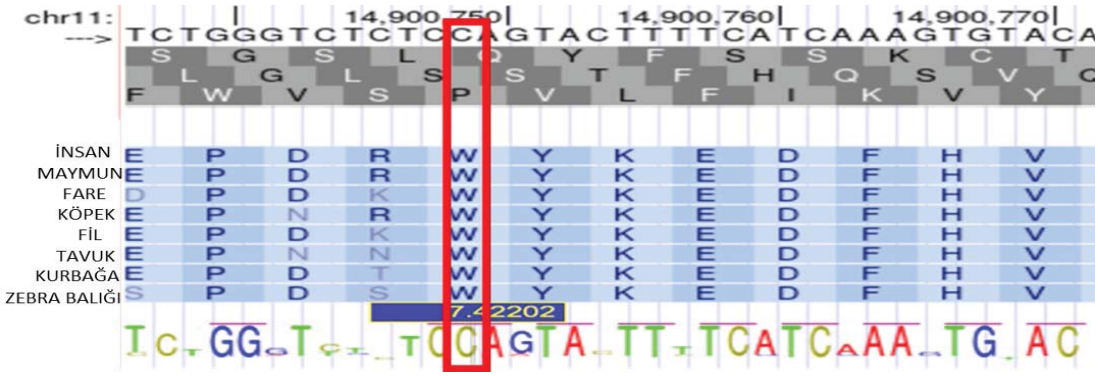
Şekil 39: *STAT5A* c.1270A>T varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu



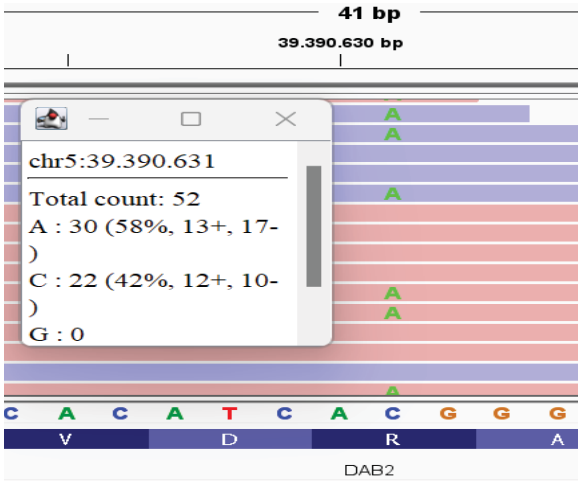
Şekil 40: A4H1'de bulunan *SARM1* c.799_801delinsCGGCTGCACGCCTGCCTCGCAGTAGC varyasyonuna ait IGV görüntüsü



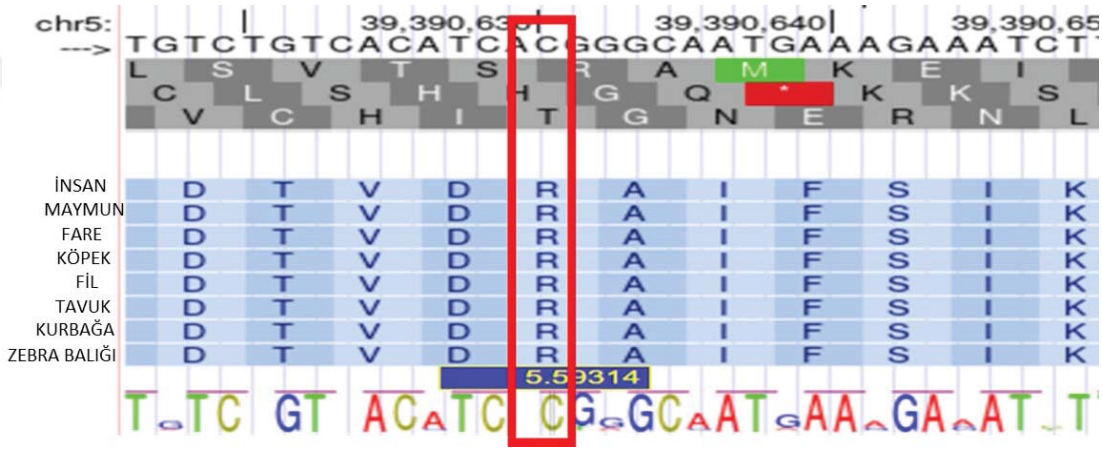
Şekil 41: A4H2'de bulunan *CYP2R1* c.1241G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 42: *CYP2R1* c.1241G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

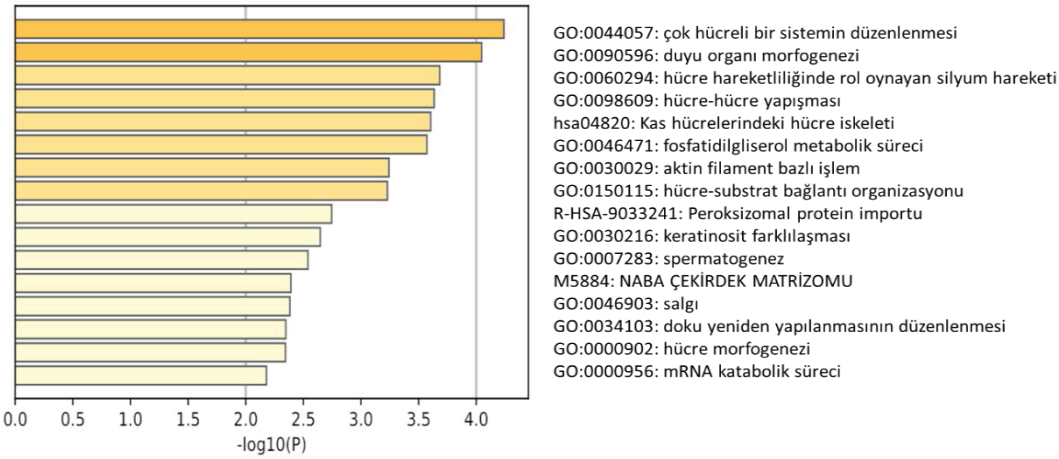


Şekil 43: A4H2'de bulunan *DAB2* c.377G>T varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 44: *DAB2* HET c.377G>T varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

Yolak analiz için tespit edilen 104 varyasyon Metascape'de ve String çevrimiçi programlarında değerlendirilmiştir (Şekil 45).



Şekil 45: A4 ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi

4.2.5. A5 Ailesi

4.2.5.1 A5H1 ve A5H2 Klinik Bilgiler

A5H1: 24 yaşındaki erkek hasta 20 yaşında görme bulanıklığı şikayeti üzerine MS tanısı aldığı öğrenildi. İkinci atağını 2 sene önce aynı şikayetle geçiren hasta bu iki atak dışında atağı bulunmadığını belirtti. Nörolojik sekeli olmayan hasta ilaçsız takiptedir. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde bir bulgu saptanmadı ve antropometrik ölçümleri normaldi. 8 yıl/paket sigara içme öyküsü bulunmaktadır.

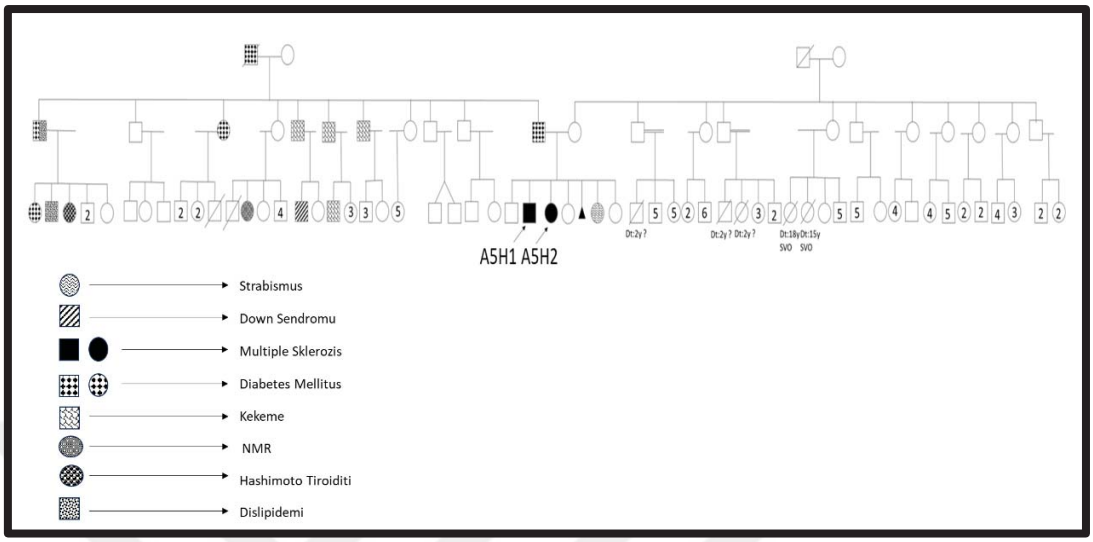
Kraniyal MRG'de, sol frontal lob presantral girus düzeyinde jukstakortikal beyaz cevherde ve bilateral periventriküler beyaz cevherde ventrikül aksına dik uzanan demyelinizan plaklar izlenmiştir. Spinal MRG'de C4 hizasında MS plağı saptanmış. Hastanın 25-hidroksi vitamin D düzeyi değerlendirilememiştir. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik bir test yapılmamıştır.

A5H2: A5H1 kız kardeşi olan 23 yaşında kadın hastanın 15 yaşındayken diplopi, yorgunluk ve baş dönmesi şikayetleriyle ADEM tanısı alarak kortizol tedavisi almıştır. Birinci atağından yaklaşık bir yıl sonra görme bulanıklığı ve sol bacakta aksama şikayetleriyle ikinci atak geçirmesi üzerine MS tanısı ile avonex (İnterferon β-1a) tedavisine başlanılmıştır. Son olarak 5 yıl önce 18 yaşında diplopi şikayetiyle üçüncü atağından sonra tecfidera (dimetil fumarat) tedavisine geçilmiştir. Tespit edilen sola bakışta sol gözde nistagmus son ataktan sonra geliştiğini ifade etmektedir. Antenatal takiplerini bilmeyen hastanın, perinatal ve postnatal öyküsünde bir özellik tanımlanmamaktadır. Gelişim basamakları zamanında tamamlanmış olan olgunun eşlik eden kronik bir hastalığı bulunmamaktadır. Yapılan fizik muayenesinde antropometrik ölçümleri normal saptanmamıştır. Hastanın nörolojik muayenesinde sola bakışta sol gözde nistagmus tespit edilmiştir.

Kraniyal MRG'de, sol frontal lob presantral girus düzeyinde jukstakortikal beyaz cevherde, sol sentrum semiovalede ve bilateral periventriküler beyaz cevherde ventrikül aksına dik uzanan demyelinizan plaklar izlenmiştir. BOS'da OKB

saptanmıştır. Anti-MOG ve anti-NMO saptanmamıştır. 25-hidroksi vitamin D düzeyi 30 µg/L altında saptanmıştır. EBV enfeksiyon öyküsüne yönelik bir test yapılmamıştır.

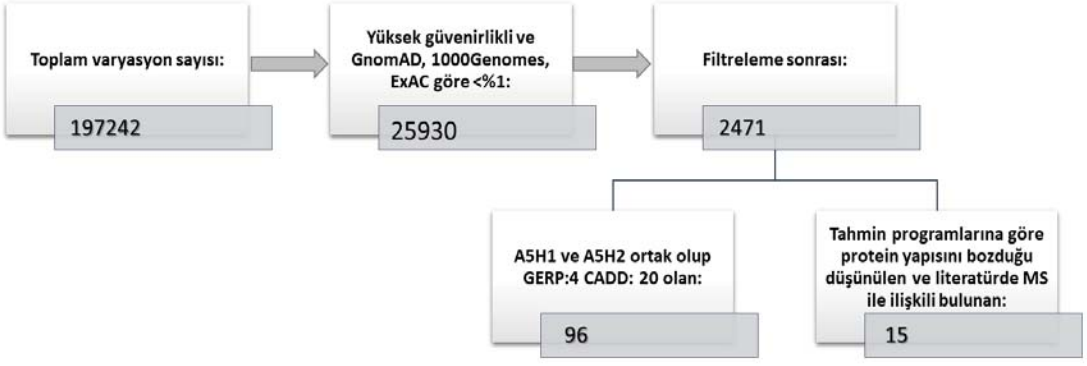
Alınan soygeçmiş öyküsüne göre çizilen pedigri Şekil 46'da gösterilmiştir.



Şekil 46: A5 Ailesine ait pedigri

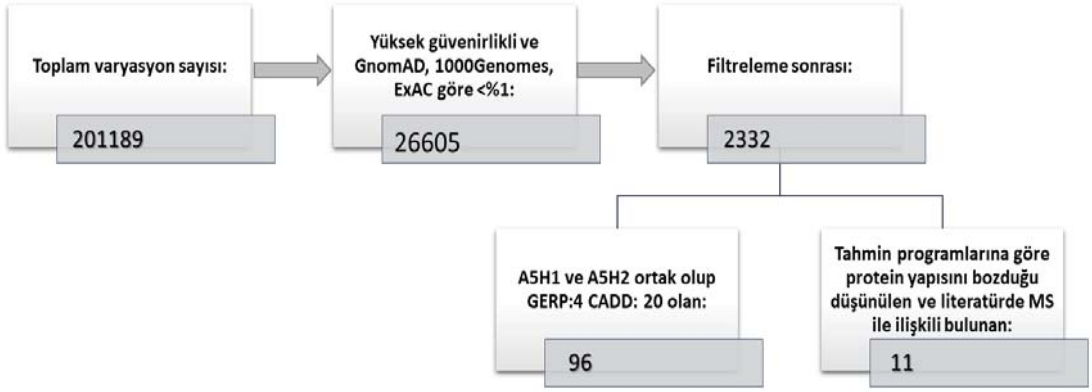
4.2.5.2 A5H1 ve A5H2 WES Bilgileri

A5H1'de biyoinformatik analizlerde 20833 gende 197242 varyasyon elde edildi. Yapılan filtrelemelerden sonra 1404 gende 2471 varyasyon tespit edildi (Şekil 47). Literatür taraması ile beraber 15 gende bulunan varyasyonların hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 12' de özetlenmektedir.



Şekil 47: A5H1'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

A5H2'de biyoinformatik analizlerde 21155 gende 201189 varyasyon saptandı. Yapılan filtrelemelerden sonra 1376 gende 2332 varyasyon tespit edildi (Şekil 48). Literatür taraması ile beraber 11 gende bulunan varyasyonların hastada MS etiyolojisi ile ilişkili olabileceği düşünüldü. Bu varyasyonlar ve ilgili literatür Tablo 12' de özetlenmektedir



Şekil 48: A5H2'e ait WES datasında filtreleme adımlarında bulunan varyasyon sayısı

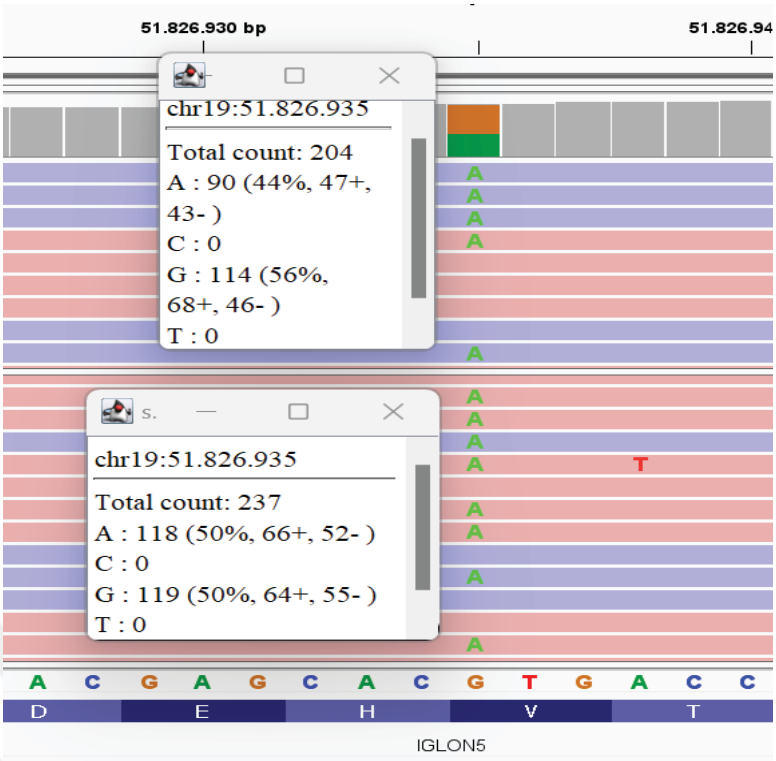
Tablo 12. A5H1 ve A5H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar

GEN* (TRANSKRİPT)	VARYASYON	ZİGOSİTE	SINIFLANDIRMA**	PROTEİNİN FONKSİYONU***	LİTERATÜR
A5H1 ve A5H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki ortak varyasyonlar					
C2CD3 (NM_001286577.2)	c.1910G>A p.Trp637*	HET	LP (PVS1, PM2)	C2 domain içeren protein 3; Primer silyum oluşumu için gerekli	
COL5A2 (NM_000393.5)	c.3411_3412inv p.Asp1138Asn	HET	VUS (PM2, PP2)	Kolajen alfa-2(V) zinciri; Tip V kollajen, Neredeyse her yerde bulunan küçük bir bağ dokusu bileşeni	(244)
VCAN (NM_004385.5)	c.385C>T p.Arg129Cys	HET	VUS (PM2, PP3)	Versican çekirdek proteini; Hücreler arası sinyalleşme ve hücrelerin hücre dışı matrise bağlanmasında görevli	(245)
IGLON5 (NM_001101372.3)	c.178G>A p.Val60Met	HET	VUS (PM2)	İmmünoglobulin süperfamilyası üyesi 5	(246)
PELI3 (NM_145065.3)	c.1226G>T p.Gly409Val	HET	VUS (PM2)	E3 ubikuitin-protein ligaz pellino homologu 3; Ubikuitin kısımlarının substrat proteinlerine kovalent bağlanmasını katalize eden E3 ubikuitin ligaz	(247,248)
HOXB3 (NM_001384749.1)	c.164A>C p.Gln55Pro	HET	VUS (PM2, PP3)	Homeobox proteini Hox-B3; Hücrelere ön-arka eksende belirli konumsal kimlikler sağlayan gelişimsel düzenleyici sistemin bir parçası olan transkripsiyon faktörü	(249)
RGMA (NM_020211.3)	c.307G>A p.Val103Ile	HET	VUS (PM2)	Repulsif rehberlik molekül ailesi üyesi A; akson yol bulma sürecinde rol oynayan bir sinyal molekülü	(250–252)
LGALS1 (NM_002305.4)	c.334C>T p.Arg112Cys	HET	VUS (PM2)	Galektin-1; Apoptozun, hücre çoğalmasının ve hücre farklılaşmasının düzenlenmesi	(253,254)

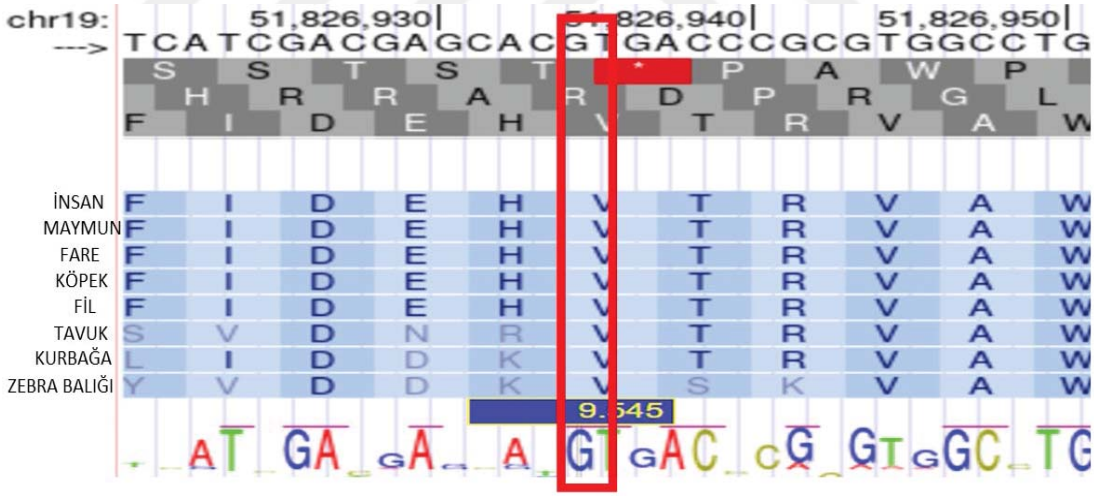
A5H1'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
MEFV (NM_000243.3)	c.2282G>A p.Arg761His	HET	P	Pirin; Doğal bağışıklık ve IFN-gama inflamatuar yanıtın düzenlenmesi	(142)
GJC2 (NM_020435.4)	c.118_123delinsAGGCCATCGCCTAGAT p.Ala40Argfs*33	HET	LP (PVS1, PM2)	Gap bağlantı gama-2 proteini; Santral ve periferik sinir sistemlerinde miyelinasyonda görevli	(255–257)
DARS (NM_001349.4)	c.564+2T>C (-)	HET	LP (PM2)	Aspartat-tRNA ligaz, sitoplazmik	(258,259)
BMP7 (NM_001719.3)	c.524G>A p.Arg175Gln	HET	VUS (PM2, PM5, PP3)	Kemik morfogenetik proteini 7; Kıkırdak ve kemik oluşumu, Ca^{+2} regülasyonu	(250,260)
DPM2 (NM_003863.4)	c.166_167delinsTT p.Ala56Phe	HET	VUS (PM2)	Dolikol fosfat-mannoz biyosentezini düzenleyici protein	
PIP5K1C (NM_012398.3)	c.992G>A p.Arg331His	HET	VUS (PM2)	Fosfatidilinositol 4-fosfat 5-kinaz tip-1 gama; sinyal iletimi, kesecik trafiği, aktin hücre iskeleti dinamiği, hücre yapışması ve hücre hareketliliği gibi çeşitli hücresel süreçleri düzenleyen ikinci habercinin sentezleyen enzim	(261)
MED12L (NM_053002.5)	c.2423A>G p.Asn808Ser	HET	VUS (PM2)	RNA polimeraz II transkripsiyon alt birimi 12 benzeri proteinin aracısı; Neredeyse tüm RNA polimeraz II'ye bağımlı genlerin düzenlenmiş transkripsiyonunda rol oynayan bir ortak aktifleştirici olan Mediator kompleksinin bir bileşeni	
A5H2'de MS etiyolojisi ile ilgili olabileceği düşünülen genlerdeki varyasyonlar					
PTPN6 (NM_002831.6)	c.1099G>C p.Glu367Gln	HET	VUS (PM2, PP2)	Tirozin-protein fosfataz reseptör olmayan tip 6; Reseptör tirozinkinaz sinyallerinin iletilmesinde rol oynayan proteinlerin defosforile ederek hücre sinyali yollarını düzenleme	(262–264)
GBA2 (NM_020944.3)	c.2507G>A p.Gly836Asp	HET	VUS (PM2, PP3)	Lizozomal olmayan glukozilseramidaz; ücresel büyümede, farklılaşmada, yapışmada, sinyalleşmede, hücre iskeleti dinamiğinde ve membran özelliklerinde rol oynayan daha karmaşık glikosfingolipitlerin ana öncüleri olan glukozilseramidlerin parçalanması	(265)
STEAP4 (NM_024636.4)	c.941G>A p.Arg314Gln	HET	VUS (PM2, PP3)	Metaloredüktaz STEAP4; Hücre içindeki demir ve bakır gibi önemli metallerin homeostazi	(265,266)

HET: Heterozigot, HOM: Homozigot, P: Patojenik, LP: 'likely' patojenik, VUS: 'variant of uncertain significance'
* MANE Select etiketi alan transkript seçilmiştir.
** Patojenisite değerlendirmesi ve kriterlerinde ACMG kılavuzu esas alınmıştır (101).
***Uniprot veri tabanından yararlanılmıştır.

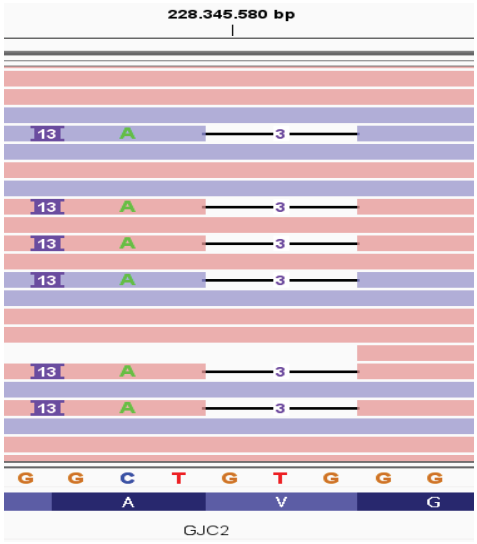
Yapılan analizler sonucunda ailenin her iki üyesinde ortak bulunan ve MS etiyolojisi ile ilişki olduğu düşünülen *IGLON5A* geninde bulunan varyasyon tartışışmıştır. Ayrıca A5H1'de OMIM'de hipomiyelinizasyonla ilişkilendirilmiş genlerdeki varyasyonlar tartışmaya dahil edilmiştir. Varyasyonlara ait IGV görüntüleri Şekil 49, 51 ve 52'te gösterilmiştir. IGLON5A c.178G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu Şekil 50'de gösterilmiştir.



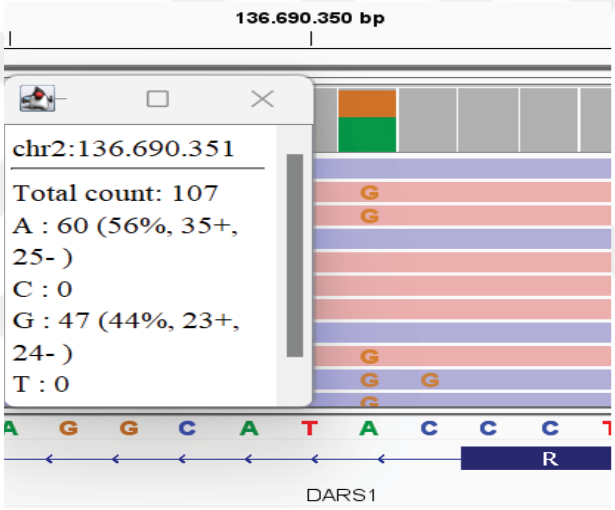
Şekil 49: A5H1 ve A5H2'de bulunan *IGLON5A* c.178G>A varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 50: *IGLON5A* c.178G>A varyasyonun ve sebep olduğu aa değişikliğinin türler arasında korunmuşluğu

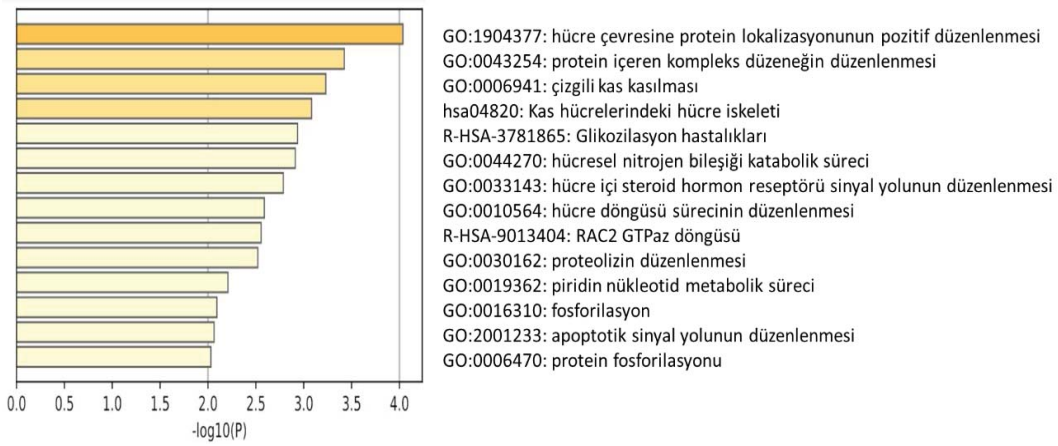


Şekil 51: A5H1'de bulunan *GJC2* c.118_123delinsAGGCCATCGCCTAGAT varyasyonuna ait IGV görüntüsü



Şekil 52: A5H1'de bulunan *DARS* c.564+2T>C varyasyonuna ait IGV görüntüsü

Yolak analiz için tespit edilen 96 varyasyon Metascape'de ve String çevrimiçi programlarında değerlendirilmiştir (Şekil 53).



Şekil 53: A5 Ailesine ait zenginleştirilmiş yolak analiz bar grafi

5. TARTIŞMA

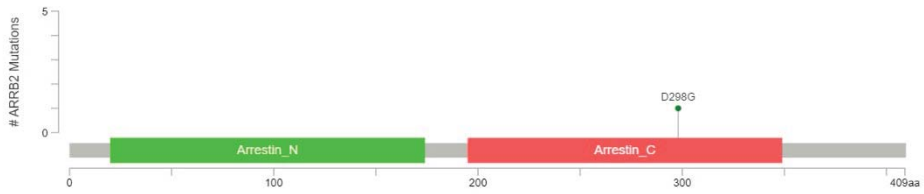
Bu çalışmada, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, Çocuk Nöroloji bilim dalında MS tanısı ile takip edilen hastalardan birinci, ikinci veya üçüncü derece akrabalarında MS tanısı olan hastalar ve onların hasta yakınlarında yapılan WES çalışmasından elde edilen veriler, genotip-fenotip korelasyonu yapılarak yorumlanmıştır. Çalışmaya dahil edilen ailelerde 13 kişide MS tanısı mevcuttu ve bunlardan 8 tanesi kadın 5 tanesi erkekti. Genel popülasyona baktığımızda kadın erkek oranın 2:1 şeklinde olduğu görülmektedir (2). Türkiye'de yapılan anket çalışmasında vakaların %71,5 kadın olduğu belirtilmektedir (25). Ancak çocukluk çağı başlangıçlı MS hastalarında özellikle ergenlik öncesi kadın erkek oranı 1:1'dir (7). Bu da bizim kohorttumuzdaki genel popülasyonda görülen orandan farklı olmasını açıklamaktadır. Çalışmaya alınan hastaların yedisinde ilk atağının oftalmolojik problemler, geri kalan üçünde üst ekstremitede parestezi şikayetleri ile prezente olduğu tespit edildi. Türkiye'de hastalarda ilk başvuru şikayetinin en sık %37,6 oranla alt ve üst ekstremitelerde parestezi-hipoestezi ve %30,6 ile çift görme-görme sorunları olduğu bilinmektedir (25).

MS'in genetik etiyolojisi tam olarak aydınlatılmamıştır. Bugüne kadar yapılan çalışmalarda sıklıkla immün sistem genleri suçlansa da çalışmamızda miyelinizasyon defektiyle ve/veya nörolojik bulgularla ilişkili ve oligodendrositlerin gelişimi ve maturasyonu için önemli olan genlerde varyasyonlar saptanmıştır. Bu sonuç, çalışmamızı diğer ailesel MS çalışmalarından ayırmaktadır. Çalışmamızda ayrıca kazanılmış immünite ile ilişkili *ARRB2, STAT5A* ve doğal immünite ile ilişkili *MPO*, *NAAA* genlerinde tespit edilen varyasyonların EAE çalışmalarına dayanarak hastalığın patogenezinde olası adaylar olabileceği öngörülmektedir. A2 ve A3 ailelerinde *UBR4* geninde klinik önemi bilinmeyen nadir varyasyonlar tespit edilmiştir. Bu gen daha önce ailesel MS olgularında aday gen olarak belirlenen *UBR2* ile beraber ubiquitin protein ligaz E3 oluşturmaktadır (84,87). A1 ailesinde tartışılan *NSUN5* geni ve A4 ailesinde nadir nonsense varyasyon saptanan *TRIM74* geni daha önce MS ile ilişkili olduğu bildirilen 7q11.23 bölgesinde yer almaktadır (14). A2H1, A2H2, A4H1 ve

A5H1'de *MEFV*(NM_000243.3) geninde sırasıyla bulunan c.442G>C p.(Glu148Gln), E148Q, c.2177T>C p.(Val726Ala), V726A, c.2080A>G p.(Met694Val), c.2282G>A p.(Arg761His) varyasyonlar ülkemizde sık görülen bir otoinflamatuar hastalığı olan Ailesel Akdeniz Ateşi ile ilişkilendirilmiştir. Bu gen doğal bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde görev alan pirin proteinini kodlamaktadır. Türkiye'de yapılan çalışmalarda, MS hastalarında *MEFV* genindeki M694V, E148Q V726A ve M680I varyasyonlar, etkilenmemiş etnik olarak eşleştirilmiş kontrollere kıyasla daha sık görülmüştür (142,267)

A1H1 ve A1H2'de *NSUN5* geninde heterozigot c.647G>A p.(Cys216Tyr) varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır. Patojenisitesi yüksek olan varyasyon (CADD:29.3; MetaRNN: orta derece patojenik) evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almaktadır (GERP:4.5) ve popülasyon veri tabanlarında sadece 2 kişide heterozigot olarak görülmüştür (gnomAD Exomes f = 0.00000137). NSUN5 proteini Nop2/sun RNA methyltransferaz ailesine aittir ve hücrelerde 28S rRNA'nın 3782'inci sitozinin C5 metil modifikasyonundan sorumludur (268,269). Bu metilasyonun yokluğunun, ribozomun yapısal konformasyonunu değiştirdiği ve translasyon doğruluğunu azalttığı gösterilmiştir (270). Nop2/sun RNA methyltransferaz ailesindeki proteinleri kodlayan genlerden *NSUN2*, OR entelektüel gelişim bozukluğu 5 ile, *NSUN3* kombine oksidatif fosforilasyon eksikliği 48 ile ilişkilendirilmektedir. Kombine oksidatif fosforilasyon eksikliği 48 olan hastaların birinde T2 ağırlıklı kraniyal MRG'de serebral hemisferlerde beyaz cevher hiperintensiteleri görülmüştür (271). 7q11.23 delesyonundan kaynaklanan Williams-Beuren sendromu multisistemik belirtiler gösteren karmaşık bir nöro-gelişimsel bozukluktur ve bu kromozomal bölgede yer alan *NSUN5* geni delesyonu hastaların %95'inde görülmekte olup sıklıkla sendromun nörolojik bulgularının nedeni olarak gösterilmektedir. Nsun5 geni monoalelik susturulmuş farelerde, miyelinli akson sayısında azalma ve gevşek miyelin kılıf tespit edilmiştir (272). Nsun5 geni oligodendrosit öncü hücrelerinde ve oligodendrositlerde yüksek oranda ifade edilmektedir (102). Bu sebeple daha önce hiçbir hastalıkla ilişkilendirilmeyen *NSUN5* geninin MS etiyolojinde rol alabileceğini öngörmekteyiz.

A1H1 ve A1H2'de *ARRB2* geninde heterozigot c.893A>G p.(Asp298Gly) varyasyonu saptanmıştır. Klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılan varyasyon şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir. Varyasyon evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almakta olup (GERP:5.5) *in silico* tahmin araçlarına göre patojenik (CADD:29.7 MetaRNN: orta derece patojenik) olarak değerlendirilmektedir. *ARRB2* geni Arrestin/beta-arrestin protein ailesinden olan arrestin beta 2 (βarr2) proteini kodlamaktadır. Bu protein ailesinin üyelerinin, G-protein-bağlı reseptörlerin agonist aracılı duyarsızlaştırılmasına katıldığı ve hormonlar, nörotransmiterler veya duyusal sinyaller gibi uyaranlara karşı hücresel tepkilerin spesifik olarak azalmasına neden olduğu düşünülmektedir. Uniprot veri tabanına göre hastalarda bulunan varyasyon TRAF6 proteini ile etkileşim kurulan domaini etkilemektedir (Şekil 54). TRAF6 proteininin IL-17R reseptörünün uyarılmasıyla Act1 aracılığıyla ubikitinasyonu sonrasında otoubikitinasyona uğrayarak kanonik yol üzerinden NF-κB yolağını aktive ettiği düşünülmektedir (273). βarr2, TRAF6 ile birleşip TRAF6 oligomerizasyonunu ve otoubikitinasyonunu engelleyerek NF-κB sinyalini inhibe etmektedir (274). Ayrıca yapılan çalışmada βarr2 eksikliği olan EAE farelerinde alevlenmiş ve sürekli semptomlarını sergilediğini gösterilmektedir. Hücresel düzeyde βarr2 eksikliği EAE farelerinin periferal lenfoid organlarında Foxp3+ CD4+ regulatör T (Treg) hücrelerinin sayısında azaldığı saptanmıştır. Aynı çalışmada, *in vitro* olarak βarr2 kaybının Foxp3–CD4+ T hücrelerinin Foxp3+ CD4+ Treg hücrelerine dönüşümünü engellediği gösterilmiştir (103) CD4+ T hücre alt küme hücreleri olan Th1, Th17 ve Treg'ler arasındaki dengenin bozulmasının ve Treg hücrelerinin fonksiyon kaybının MS'teki inflamasyon yanıtın oluşmasında kritik bir öneme sahip olduğu hem hayvan hem de etkilenmiş birey çalışmaları ile gösterilmiştir (39). Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde hastalarımızda bulduğumuz varyasyonun hastaların kliniğine katkı sağladığı düşünülmektedir.



Şekil 54: *ARRB2* c.893A>G varyasyonun proteindeki bulunduğu bölge

A2H1 ve A2H2'de *SAMD9* geninde heterozigot c.2298delG p.(Thr767Glnfs*11) varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik muhtemel patojenik olarak sınıflandırılmaktadır ve şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir. *SAMD9* (steril bir motif alanı içeren protein 9), 1.589 amino asitlik bir proteini kodlamaktadır. SAMD9 proteinin moleküler rolü tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte viral konak savunma mekanizmalarında, hücre çoğalmasında, endozomal füzyonda ve tümör baskılanmasında görev aldığı düşünülmektedir (275). *SAMD9*'daki heterozigot fonksiyon kazanım varyasyonları otozomal dominant (OD) MIRAGE sendromu (miyelodisplazi, enfeksiyon, büyüme kısıtlılığı, adrenal hipoplazi, genital (gonadal) fenotipler ve enteropati) (OMIM: 617053) olarak adlandırılan, multisistemi etkileyen bir hastalıkla ilişkilendirilmektedir (276). Fonksiyon kazanımı varyasyonlar, SAMD9'un hücresel proliferasyonun negatif düzenleyicisi olarak etkisini artırmaktadır. Bu gendeki heterozigot fonksiyon kaybı varyasyonları miyelodisplazi ve lösemi sendromu 2 (OMIM: 619041) ile ilişkilendirilmektedir. MIRAGE sendromlu hastalarda mikrosefali, hidrosefali, beyaz cevher anormallileri ve perivasküler kalsifikasyonlar gibi nöropatolojik bulgular tespit edilmiştir (277). Aynı zamanda bu hastalarda kronik ishal başta olmak üzere, reflü, hematemezis, hematokezya, melena gibi gastrointestinal şikayetler görülmektedir. MIRAGE sendromuna sahip kişilerde *SAMD9* geninde ikincil somatik varyasyonlar saptanmaktadır. Geni susturacak varyasyon kazanan hücreler klonal çoğalma avantajı kazanmakta bu da hastaları myelodisplaziye yatkın hale gelmesine sebep olmaktadır. Yine de ikincil gelişen varyasyonlar hastalığın kliniğini hafifleterek kazanım sağlamaktadır. Gerek ikincil varyasyonlar gerek de hastalığın değişken fenotipi (her hastada adrenal bulguların görülmemesi gibi) hastalığın teşhisini zorlaştırmaktadır. Şu ana kadar MIRAGE sendromlu bireylerde *SAMD9* geninde missense varyasyonlar bildirilmiştir (275). Bu bulgular doğrultusunda bakıldığında özellikle A2H1'de gördüğümüz kliniğin bu hastalıkla kısmı uyumlu olduğu görülmektedir. Hastalarda sendromun diğer bulgularının olmaması değişken fenotiple açıklanabilir. Hastalarımızda çerçeve kayması yapan bir varyasyon belirledik. Aslında erken sonlandırma kodonu (PTC) taşıyan transkriptler genellikle nonsense-mediated decay (NMD) tarafından yıkılır ve bu da fonksiyon kaybına neden olur. Bununla birlikte, tüm PTC'ler fonksiyon kaybıyla sonuçlanmaz ve bu tür bazı transkriptler NMD'den

kaçar ve güdük proteinler meydana getirerek fonksiyon kazanımına sebep olup fenotip gösterebilirler (278).

A2H1'de bulunan *OPA1* geninde heterozigot c.826G>A p.(Glu276Lys) varyasyonu saptanmıştır. Klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılan varyant şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir. Değişim tahmin araçlarına göre patojenik (CADD:33, MetaRNN: patojenitesi desteklenen) olarak değerlendirilmiş olup evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almaktadır (GERP:5.5). *OPA1*, mitokondriyal füzyon ve fisyon arasındaki denge, mitokondriyal solunum zinciri komplekslerinin stabilitesi ve mitokondriyal krista içinde tutulan proapoptotik sitokrom moleküllerinin kontrollü salınımı dahil olmak üzere bir dizi önemli işlevi düzenleyen bir iç mitokondriyal membran proteinini kodlar. *OPA1* genindeki mutasyonlar Leber kalıtsal optik nöropatisine benzer şekilde, iç retinadaki retinal ganglion hücrelerinin kaybı ile karakterize OD optik atrofi (OMIM: 165500) sebebidir (279). Bazı hastalarda Optik atrofi plus sendromu diye adlandırılan miyopati, serebellar ataksi, aksonal sensörinöral polinöropatinin ve progresif eksternal oftalmopleji gibi nörolojik bulguların eşlik ettiği klinik tablo görülür (OMIM: 125250) (280). Yapılan bir çalışmada *OPA1* geninde varyasyon taşıyıcılarında kraniyal MRG'de beyaz cehver değişiklikleri saptanmıştır (281,282). Diğer çalışmalarda da MS benzeri semptom gösteren hastalarda *OPA1* geninde patolojik varyasyon saptanmıştır (283,284). Hastamızda atak esnasında gelişen göz küresi hareket kısıtlılığı, sağ göz kapağı kırpma kusuru gibi bulgular bu varyasyonun kliniğin gelişmesinde önemli olabileceğini düşündürtmüştür.

A3H1 ve A3H2'de *MPO* geninde c.1214G>A p.(Arg405His) varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve daha önce popülasyon veri tabanlarında nadir olarak görülmüştür (gnomAD Exomes f = 0.0000318). Patojenik etkisi olduğu düşünülen varyasyon (CADD:32, MetaRNN: güçlü patojenik) evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almaktadır (GERP:4.5). Myeloperoksidaz nötrofillerde, monositlerde, makrofajlarda ve mikroglialarda bulunan lizozomal bir enzim olup doğal immün sistemde rol oynar (167). *MPO* genindeki varyasyonlar OR myeloperoksidaz eksikliği ve OD Alzheimer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Şu ana kadar yapılan birçok çalışmada MS hastaların beyin dokusunda artmış myeloperoksidaz aktivitesi

gösterilmiştir (168,170). Tespit ettiğimiz varyasyon enzimin katalitik bölgesinde bulunmaktadır (285). Bu yüzden hastalarımızda bulunan *MPO* varyasyonun enzim kinetiğini bozarak MS patogenezine katkı yapabileceği öngörülmektedir.

A3H1 ve A3H2'de *NAAA* geninde heterozigot c.999-3C>T (kırpılma bölgesinde) varyasyonu saptanmıştır. Klinik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılan varyasyon şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında çok az kişide görülmüştür (gnomAD Exomes $f = 0.00112$) görülmemiştir. *NAAA* geni varyasyonları herhangi hastalık ile ilişkilendirilmemiştir. N-Acylethanolaminler, arachidonyl ethanolamide, oleoylethanolamide (OEA) ve N-palmitoylethanolamide (PEA) dahil olduğu uzun zincirli yağ asidi olup NAE'ler inflamasyon, ağrı, nöroproteksiyon, iştah ve lipid metabolizması gibi çeşitli fizyolojik tepkilerin düzenlenmesinde rol oynamaktadır. N-asetiletanolamin-hidrolize edici asit amidaz (NAAA), NAE'lerin parçalanarak inaktive edilmesinde görev alır. *NAAA* geni fonksiyon artışı PEA ve OEA anti-inflamatuar özellikliğe sahip moleküllerin azalışına sebep olmaktadır (174). MS'in EAE modelinde Naaa ekspresyonunun arttığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada Naaa geninin delesyonun EAE farelerinde hastalığın başlangıcını geciktirdiği ve semptom yoğunluğunu azalttığı saptanmıştır. Naaa'yı aşırı eksprese eden makrofajların verildiği farelerde EAE indüksiyonuna karşı vahşi tip yavrularına kıyasla daha agresif bir klinik yanıt vermiştir (172). Ayrıca NAAA inhibe eden moleküller sıklıkla potent MS tedavisi ajanı olarak araştırılmaktadır (173). Tüm bu çalışmalar değerlendirildiğinde hastalarımızda *NAAA* genindeki varyasyon genin fonksiyon kazanımını sağlayıp hastalığın patogenezinde rol alabileceği düşünülmüştür. WES analizinin, sadece tanı koymada değil, aynı zamanda uygun ilaç tedavisini belirlemede ve uygun ilaç klinik araştırmalarına katılımda da önemli bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

A3H2'de *SLITRK2* geninde c.943 G>C p.(Val315Leu) hemizigot varyasyonu saptanmıştır. Ayrıca bu varyasyona *cis* pozisyonda gnomAD Exome $f = 0.902$ frekansta bulunan c.939 T>C p.(Pro313=) hemizigot varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır, şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir ve iki değişikliğin ortak etkisini *in silico* veritabanları göstermemektedir. *SLITRK2* geni yakın zamanda XL Entelektüel gelişim bozukluğu (OMIM: 301107) ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastaların bir kısmında

kraniyal MRG'de beyaz cevher değişiklikleri saptanmıştır. Ayrıca bildirilen vakalarda nörogelişimsel basamakları normalken regresyon gösterenler mevcuttur. Vakaların hiçbirinde olgumuzdaki bulgulara benzer göz bulgusu yoktur. Bu gende hastalığa neden olan varyasyonlar belli bir domainde kümelenmemiş olup daha önce bir hastada bizim tespit ettiğimiz varyasyona yakın yerde konumlanan ve p.(Thr312Ala) değişikliği yapan bir varyasyon tespit edilmiştir (194). Ancak hastalığın henüz yeni tanımlanmış olması ve vaka sayısının azlığı sebebi ile tüm fenotipik özelliklerinin ortaya çıkmamış olması muhtemeldir.

A3H2'de *PSMC1* geninde c.1183A>G p.(Ile395Val) homozigot varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında nadir olarak heterozigot durumda görülmüştür (gnomAD Exomes f = 0.000004) ancak homozigot bildirimi yoktur. Değişimin *in silico* araçlara göre patojenik etkisi olduğu düşünülmüş (CADD:23.8, MetaRNN: önemi bilinmeyen) olup evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almaktadır (GERP:5.17). *PSMC1* geni çoklu protein kompleksi olan proteazom 26S'in alt bileşenlerinden birini kodlamaktadır. Bu kompleks, hücresel fonksiyonları bozabilecek yanlış katlanmış veya hasar görmüş proteinleri ve işlevleri artık gerekli olmayan proteinleri uzaklaştırarak protein homeostazisinin korunmasında önemli bir rol oynar (286). *PSMC1* varyasyonları OR kalıtılan gelişimsel gecikme, bozulmuş entelektüel gelişim, konuşma kaybı, merkezi hipotoni ile birlikte spastik tetrapleji, kore, yürüyememe, işitme kaybı ile karakterize ciddi nörogelişimsel bozukluk olan Birk-Aharoni sendromu (OMIM: 620071) ile ilişkilendirilmiştir (287). Aynı zamanda bazı çalışmalarda nörodejeneratif hastalıklarla ve nöroinflamasyonla ilişkili bulunmuştur (201,202).

A3H2'de *GRIK2* geninde c.1073G>A p.(Arg358His) heterozigot varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında az sayıda bireyde heterozigot olarak görülmüştür (gnomAD Exomes f = 0.0000398). Varyasyon evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almakta (GERP:5.3) olup *in silico* analizler patojenik olabileceğini (CADD:32 ve MetaRNN: önemi bilinmeyen) öngörmektedir. *GRIK2* geni Glutamat kapılı katyon kanalı olan Kainat reseptörlerinin (KAR'lar) alt birimini kodlamaktadır *GRIK2* geninde fonksiyon kaybı OR Entelektüel gelişim bozukluğu ile (OMIM:

611092) ve yakın zamanda fonksiyon kazanım varyasyonları OD Dil bozukluğu ve ataksi ile nöbetlerin eşlik ettiği veya etmediği nörogelişimsel bozukluğu ile ilişkilendirilmiştir (OMIM: 619580). OD formunda bildirilen vakaların bir kısmında kraniyal MRG'de beyaz cevherde T2 hiperintens lezyonlar saptanmıştır. *GRIK2* genindeki fonksiyon kazanımı yapan varyasyonların proteinin M3 transmembran domaini etkilediği belirtilmektedir (288). Bazı çalışmalarda MS hastalarının beyinlerinde glutamat miktarının arttığı ve glutamat reseptör genlerinin varyasyonlarının beyin hacminin küçülmesi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (197). Aynı zamanda bu gendeki varyasyonlar IFN-β tedavisinin etkinliğini belirlemekte ve yanıt verenlerin makrofaj hücrelerinde genin ekspresyonu azalmaktadır (198). Hastamızın kliniği her ne kadar *GRIK2* ilişkili fenotiplere kıyasla daha hafif olsa da bu fenotiplerle ilgili az vaka bildirilmiş olması dolayısıyla olası fenotip heterojenitesi göz önünde bulundurulduğunda ayırıcı tanıda bu açıdan değerlendirmek uygun olacaktır. IFN-β tedavisinden yanıt alamamış olması *GRIK2*'deki olası fonksiyon kazanımına bağlı olabilir ve bu da genetik incelemenin tedavi stratejisini belirlemede önemini göstermektedir.

A4H1 ve A4H2'de *SPR* geninde c.1A>T p.(Met1Leu) varyasyonu saptanmıştır. Patojenik olarak sınıflandırılan bu değişiklik, şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir. *SPR* geni sepiapterin redüktaz enzimini kodlar ve bu enzim tetra-hidrobiopterin biyosentezini sağlayarak dopa yolağında görev almaktadır. Bu gendeki fonksiyon kaybı sepiapterin redüktaz eksikliğine bağlı dopaya duyarlı distoni ile ilişkilendirilmektedir (OMIM: 612716). Bu hastaların fenotipik özellikleri arasında hastalarımızdakilere benzer şekilde okülomotor apraksi ve okulojirik kriz gibi göz bulguları görülmektedir (289). İzole servikal distoni hastalarında yapılan genetik analizde bir hastada SPR geninde c.1A>C p.(Met1Leu) heterozigot saptanmıştır (290). Bu gendeki hareket bozukluklarının dopaya duyarlı olması hastalara yapılan genetik analizin tedaviye katkı sağlayacağını göstermektedir.

A4H1 ve A4H2'de *STAT5A* geninde heterozigot c.1270A>T p.(Ile424Phe) varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir. Varyasyon evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almakta (GERP:5) olup *in silico* analizler patojenik olabileceğini (CADD:27.6 ve MetaRNN: orta patojen)

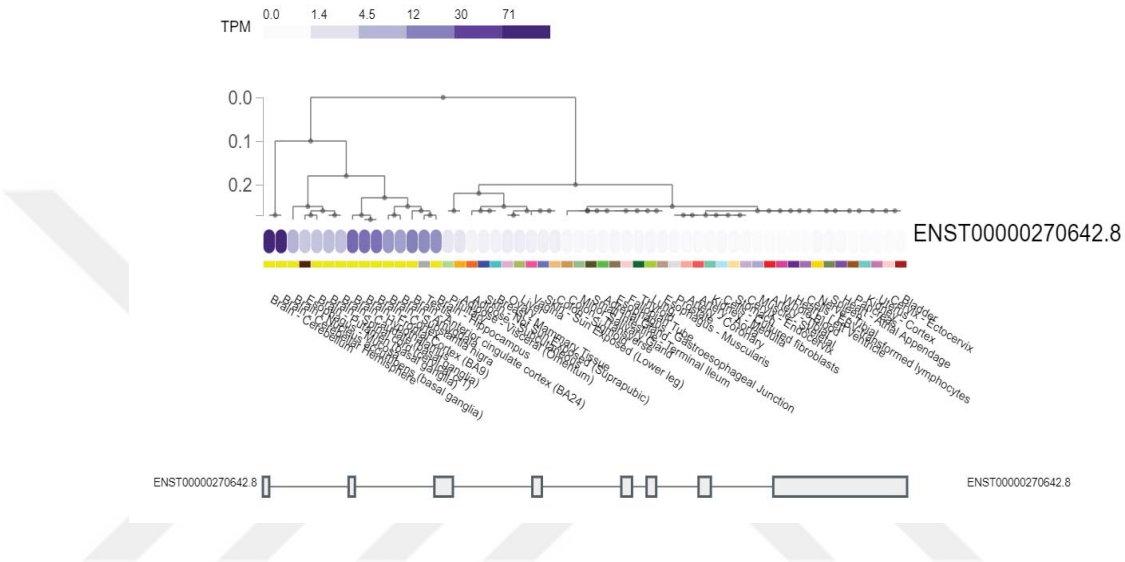
öngörmektedir. Sinyal iletici ve transkripsiyon aktivatörü (STAT) protein ailesinin üyesi olan STAT5A bir transkripsiyon faktörüdür. Çeşitli sitokinlerin spesifik hücre yüzeyi reseptörlerine bağlanması JAK aktivasyonuna ve kinaz aktivitelerinin artmasına yol açar. Aktive edilmiş JAK'lar, reseptör kompleksinin hücre içi tirozin kalıntılarını fosforile ederek STAT'ların toplanmasını ve fosforillenmesini sağlar. Aktive edilmiş STAT'lar homo ve heterodimerler oluşturur ve hedef genlerin transkripsiyonunu indüklemek için spesifik gen promoterlerine bağlandıkları çekirdeğe hızla yer değiştirirler. Burada genlerin ifadesini değiştirerek immün hücrelerin farklılaşmasını sağlarlar (207). Bugüne kadar *STAT5A* geni herhangi bir fenotiple ilişkilendirilmemiş olmakla birlikte aynı gen ailesinden *STAT3* geni OD kalıtımlı multisistemik otoimmünite ile ilişkilendirilmiştir (OMIM: 615952). Stat5a/b'nin susturulmuş farelerde Foxp3 eksprese eden CD4 (+) T hücrelerinde yoğun azalmaya yol açtığı ve Treg hücre farklılaşmasının azaldığı gösterilmiştir (291). MS'in Th1 ve Th17 hücrelerinin aracılık ettiği bir otoimmün hastalık olduğu ve Treg hücrelerinin miktarının azaldığı bilinmektedir. Stat5a/5b susturulmuş farelerde çoklu organı etkileyen tolerans kaybı ve otoimmünite gözlenmiştir (206). Ayrıca yapılan bir çalışmada MS hastalarında kontrollere kıyasla daha düşük *STAT5A* ekspresyonu gözlenmiştir (207). Tüm bu çalışmalar bulduğumuz varyasyonun MS etiyolojisi için önemli olabileceğini düşündürtmektedir.

A4H1'in kliniğin hafif seyirli olduğu ve son bir yıldır ilaç kullanmadığı öğrenilmiştir. Bu hastamızda bulduğumuz *SARM1* geninde c.799_801delinsCGGCTGCACGCCTGCCTCGCAGTAGC (p.Val276Cysfs*7) heterozigot varyasyon saptanmıştır. Bu değişiklik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir. SARM1 proteininin aksonal dejenerasyon ve inflamasyonda önemli bir rol oynadığı ve bu proteinin yol açtığı aksonal hasarı engellemenin nörodejeneratif hastalıkların tedavisinde etkili olabileceği üzerine birçok bilimsel makale mevcuttur (292,293). Sarm1 genin ekspresyonun EAE modellerinde upregüle olduğu bulunmuştur. Ayrıca, astrositik Sarm1 genin susturulması EAE farelerinde hastalığın başlamasını geciktirmiş, demyelinizasyonu ve nöron ölümünü engellemiştir (223). Bu çerçeve kayması mutasyonu proteini fonksiyon kaybına yol açıp hastanın kısmen de olsa daha hafif klinik göstermesine sebep olmuş olabilir.

A4H2'de *CYP2R1* geninde heterozigot c.1241G>A p.(Trp414*) ve *DAB2* geninde heterozigot c.377G>T p.(Arg126Leu) varyasyonları saptanmıştır. Bu varyasyonlar sırasıyla olası patojen, önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve her ikisi de korunmuş bölgede yer alıp, popülasyon veritabanlarında daha önce bildirilmemişlerdir. *CYP2R1* geni vitamin D öncü moleküllerinin C–25'e bir hidroksil grubu ekleyerek 25-hidroksivitamin D oluşmasını sağlar. DAB2 proteini böbreklerden vitamin D emiliminde rol oynamaktadır (294). Vitamin D düzey düşüklüğünün MS dahil olmak üzere diğer otoimmün hastalıklarına yatkınlık oluşturduğu bilinmektedir (230). Ayrıca her iki gendeki polimorfik varyasyonların MS hastalarında ve normal bireylerdeki dağılımını inceleyen birçok çalışma mevcuttur (232,294). Vitamin D immün hücre fonksiyonlarını ve farklılaşmalarını düzenlediği bilinmektedir. Hastamızda da bugüne kadar yapılan ölçümlerde vitamin D sevyelerinin düşük olduğu gözlenmiştir. Bu iki gendeki varyasyonun düşük vitamin D düzeylerine yol açarak hastada immün regülasyonun bozulmasına sebep olduğu düşünülmektedir.

A5H1 ve A5H2' de *IGLON5* geninde c.178G>A p.(Val60Met) varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik önemi bilinmeyen varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında az sayıda kişide heterozigot olarak (gnomAD Exomes f = 0.00000404) görülmüştür. Değişimin *in silico* araçlara göre proteine etkisi olduğu (CADD: 32, MetaRNN: önemi belirsiz) görülmüş olup evrimsel olarak korunmuş bir bölgede yer almaktadır (GERP:5). IgLON5, IgLON ailesine ait bir hücre yapışma molekülüdür. Bu ailenin üyeleri bir N-terminal sinyal peptidi, üç Ig benzeri alan ve bir glikozilfosfatidilinositol çapası ile karakterize edilir. Hastalarda tespit ettiğimiz varyasyon Ig benzeri alanda yer almaktadır. IgLON ailesi opioid bağlayıcı protein/hücre yapışma molekülü (OPCML), nörotrimin (NTM), limbik sistem ilişkili membran proteini (LSAMP), nöral büyüme düzenleyicisi 1 (NEGR1) ve IgLON ailesi üyesi 5 (IgLON5) olmak üzere beş üyeden oluşmaktadır. Bu genlerin germline varyasyonları herhangi bir fenotiple ilişkilendirilmemiştir. İnsanlarda, IgLON5 proteinleri esas olarak beyin ve testiste ifade edilir (Şekil 55). Beyinde, en yüksek IgLON5 protein seviyeleri serebellumda bulunur. IgLON5 proteinin nöral büyüme ve akson rehberliğinde görev aldığı düşünülmekle birlikte tam olarak fonksiyonu bilinmemektedir. IgLON5 proteinine karşı otoantikorlarla ilişkili nadir bir otoimmün nörolojik bozukluk olan anti-IgLON5 hastalığı nörodejeneratif bir

hastalıktır. Hastalar uyku bozuklukları, bulbar sendromu, yürüme dengesizliği, bilişsel bozukluk ve hareket bozuklukları ile başvurabilir ancak hastalığın kliniği heterojendir. Hastalık sinsi başlangıçlı olup progresyon göstermektedir (246). Günümüzde hastalık ile *IgLON5* varyasyonu ile ilişkisini gösteren bir çalışma bulunmamakla birlikte bu gendeki varyasyonların protein yapısını bozarak tıpkı proteine karşı gelişen antikorların zarar vermesi gibi işlev kaybına yol açıp klinik oluşturabileceği öngörülebilir.



Şekil 55: *IGLON5* dokulara göre transkripsiyonu

A5H1'de *DARS* genin kırpılma bölgesinde heterozigot c.564+2T>C varyasyonu saptanmıştır. Bu değişiklik olası patojenik varyasyon olarak sınıflandırılmaktadır ve şu ana kadar popülasyon veri tabanlarında görülmemiştir. Varyasyonun *in silico* analizi kırpılmayı bozabileceğini öngörmektedir. Sitozolik aspartil tRNA sentetazı (AspRS) kodlayan *DARS*, kalıtsal bir beyaz cevher bozukluğu olan OR kalıtımlı Beyin sapı ve omurilik anormallikleri ve bacak spastisitesi ile birlikte hipomiyelinizasyondan sorumlu olan gendir (OMIM: 615281). Bir çalışmada *DARS* kaynaklı hipomyelinizasyonun adolesans dönemde başlayabileceği ve MS ile karışabileceği belirtilmiştir (259). Yine aynı hastada *GJC2* geninde c.118_123delinsAGGCCATCGCCTAGAT p.(Ala40Argfs*33) heterozigot varyasyon saptanmıştır. *GJC2* geni konneksin 47 ve gap junction-α12 olarak bilinen gap junction proteinini kodlar ve oligodendrositlerde yüksek oranda ifade edilir. *GJC2* gendeki homozigot fonksiyon kayıpları aynı zamanda lökodistrofi hipomiyelinizan tip 2 (HLD2) olarak da adlandırılan Pelizaeus-Merzbacher benzeri hastalıkla

ilişkilendirilmiştir (OMIM:608804) (295). HLD2 hastalarının başlangıç belirtisi nistagmus olup orta derecede gelişimsel gecikme, spastisite ve trunkal instabilte ile karakterizedir. Bu hastaların MRG'de hipomyelinizasyona bağlı T2 hiperintens lezyonlar görülmektedir. HLD2'den daha hafif kliniği olan beynin beyaz maddesindeki MRI değişiklikleriyle ilişkili, geç başlangıçlı, ilerleyici spastik yürüyüş bozukluğu görülen bir ailede homozigot missese varyasyon tanımlanmıştır. Ayrıca subklinik lökodistrofisi olan bir yetişkinde de homozigot bir *GJC2* mutasyonunu rapor edilmiştir. Bu sonuçlar, Cx47'nin kısmi fonksiyon kaybına neden olan mutasyonların daha hafif SSS fenotiplerine neden olabileceğini düşündürtmektedir (296). MS hastaların postmortem beyin dokusunda yapılan incelemede gap junction proteinlerin azaldığı gösterilmiştir (256).

6. SONUÇLAR

1. Bu çalışmada en az biri çocukluk çağı başlangıçlı olmak üzere ailesel MS olgularının genetik etiyolojisi tüm ekzom dizileme yöntemi ile araştırılmıştır. Literatür taramasında ailesel MS olgularına yönelik araştırılmalar olsa da özellikle çocukluk çağı başlangıçlı ailesel MS olgularını irdeleyen çalışma sayısı oldukça azdır. Hastalarda varyasyon tespit edilen genlerin ağırlıklı olarak oligodendrositlerde ve nöronlarda önemli fonksiyonu olan genler olduğu belirlenmiştir.

2. Çalışmada yer alan 5 ailenin 2'sinde *SAMD9* ve *SPR* genlerinde muhtemel patojenik varyasyonlar saptanmıştır. Ayrıca daha önce herhangi bir fenotip ile ilişkilendirilmemiş olan *NSUN5* geninin bu çalışmanın sonucunda MS ile ilişkili olabileceği düşünülmüştür. Bu gen daha önce bir başka ailesel MS çalışmasında aday bölge olarak belirlenen 7q11.23 bölgesinde yer almaktadır.

3. Ailelerde daha erken başlayan ve klinik seyri daha ağır olan bireylerde MS ile ilişkili olabileceği düşünülen varyasyon sayısı daha fazla bulunmuştur. Ayrıca klinik seyri hafif olan ve ilaçsız takip edilen bir olguda bu klinikten sorumlu olabileceği düşünülen *SARM1* geni çerçeve kayması varyasyonu tespit edilmiştir. Yine bazı ailelerde tedavi yönetimi ile ilişkili varyasyonlar belirlenmiştir. Ailesel MS hastalarında tüm ekzom dizileme ile tüm kodlayan bölgelerin dizilenmesi, hastalığın patogenezini anlama, seyrini belirleme ve hasta takibini planlamada kullanılabilen önemli bir yaklaşım olmaktadır.

6. Sonuç olarak, tüm ekzom dizilemenin multifaktöriyel ve poligenik bir hastalık olan MS için tek başına yeterli bir değerlendirme yöntemi olmasa da MS ayırıcı tanısına giren nadir kalıtsal hastalıkları dışlamak ve MS ile ilişkili genleri belirlemek için önemli olduğu ortaya koyulmuştur. Ancak bulunan aday varyasyonların, ailedeki etkilenmemiş bireylerde de değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca tespit edilen aday genlerin MS etiyolojisindeki rolünün kesinleştirilmesi için daha geniş kohortlu çalışmalar ve fonksiyonel araştırmalar yapmak gerekmektedir.

7. WES tüm ekzom bölgelerin dizilendiği bir testtir. Bu sebeple genomdaki epigenetik modifikasyonları, intronik ve gen dışı DNA dizileri, yöntemin kısıtlılıkları dolayısıyla tespit edilemeyen büyük delesyon/duplikasyonları, genomik yapısal yeniden düzenlemeleri tespit edememektedir. Ayrıca nükleer genomdan ayrı olan mitokondriyal genomdaki varyasyonlar ve delesyon/duplikayonlar saptanamamaktadır. Atipik kalıtım modellerin (di-poligenik) yorumlanma güçlüğü diğer bir kısıtlılıktır. Tüm bunlar göz önüne alındığında MS'nin genetik etiyolojisinin aydınlatılması için daha fazla çalışmanın yapılması gerekmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Ropper AH, Samuels MA, Klein J, Prasad S. Adams and Victor's principles of neurology.

2. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, et al. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. Multiple Sclerosis Journal. 2020 Dec 1;26(14):1816–21.

3. Börü ÜT, Alp R, Sur H, Gül L. Prevalence of multiple sclerosis door-to-door survey in Maltepe, Istanbul, Turkey. Neuroepidemiology. 2006 Jul;27(1):17–21.

4. Börü ÜT, Duman A, Kulualp AŞ, Güler N, Taşdemir M, Yılmaz Ü, et al. Multiple sclerosis prevalence study the comparison of 3 coastal cities, located in the black sea and mediterranean regions of Turkey. Medicine (United States). 2018 Oct 1;97(42).

5. Börü ÜT, Bilgiç AB, Toksoy CK, Yılmaz AY, Tasdemir M, Sensöz NP, et al. Prevalence of multiple sclerosis in a Turkish city bordering an iron and steel factory. Journal of Clinical Neurology (Korea). 2018 Apr 1;14(2):234–41.

6. Akdemir N, Terzi M, Arslan N, Onar M. Prevalence of multiple sclerosis in the middle black sea region of Turkey and demographic characteristics of patients. Noropsikiyatri Arsivi. 2017 Mar 1;54(1):11–4.

7. Yan K, Balijepalli C, Desai K, Gullapalli L, Druyts E. Epidemiology of pediatric multiple sclerosis: A systematic literature review and meta-analysis. Vol. 44, Multiple Sclerosis and Related Disorders. Elsevier B.V.; 2020.

8. Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. Vol. 23, Annual Review of Immunology. 2005. p. 683–747.

9. Ehtesham N, Rafie MZ, Mosallaei M. The global prevalence of familial multiple sclerosis: an updated systematic review and meta-analysis. BMC Neurol. 2021 Dec 1;21(1).

10. Murúa SR, Farez MF, Quintana FJ. The Immune Response in Multiple Sclerosis. Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease Annu Rev Pathol Mech Dis 2022 [Internet]. 2022;17:2021. Available from: https://doi.org/10.1146/annurev-pathol-052920-

11. Patsopoulos NA, Baranzini SE, Santaniello A, Shoostari P, Cotsapas C, Wong G, et al. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. Science (1979). 2019 Sep 27;365(6460).

12. Salehi Z, Keramatipour M, Talebi S, Arab SS, Naser Moghadasi A, Sahraian MA, et al. Exome sequencing reveals novel rare variants in Iranian familial multiple sclerosis: The importance of POLD2 in the disease pathogenesis. Genomics. 2021 Jul 1;113(4):2645–55.

13. Fazia T, Marzanati D, Carotenuto AL, Beecham A, Hadjixenofontos A, McCauley JL, et al. Homozygosity haplotype and whole-exome sequencing analysis to identify potentially functional rare variants involved in multiple sclerosis among sardinian families. Curr Issues Mol Biol. 2021 Dec 1;43(3):1778–93.

14. Mescheriakova JY, Verkerk AJMH, Amin N, Uitterlinden AG, van Duijn CM, Hintzen RQ. Linkage analysis and whole exome sequencing identify a novel candidate gene in a Dutch multiple sclerosis family. Multiple Sclerosis Journal. 2019 Jun 1;25(7):909–17.

15. Yılmaz Ü, Anlar B, Gücüyener K, Yaramış A, Cansu A, Ünalp A, et al. Characteristics of pediatric multiple sclerosis: The Turkish pediatric multiple sclerosis database. European Journal of Paediatric Neurology. 2017 Nov 1;21(6):864–72.

16. Jia X, Baranzini SE, Hauser SL. Multiple sclerosis. In: Rosenberg's Molecular and Genetic Basis of Neurological and Psychiatric Disease: Volume 2. Elsevier; 2020. p. 271–300.

17. Dendrou CA, Fugger L, Friese MA. Immunopathology of multiple sclerosis. Vol. 15, Nature Reviews Immunology. Nature Publishing Group; 2015. p. 545–58.

18. Sand IK. Classification, diagnosis, and differential diagnosis of multiple sclerosis. Vol. 28, Current Opinion in Neurology. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 193–205.

19. Murray TJ. History of Multiple Sclerosis. In: Multiple Sclerosis and Related Disorders [Internet]. New York, NY: Springer Publishing Company; 2018. Available from: http://connect.springerpub.com/lookup/doi/10.1891/9780826125941.0001

20. Pearce JMS. Historical descriptions of multiple sclerosis: The stories of Augustus d'Este and The Journal of a Disappointed Man. Vol. 54, European Neurology. 2005. p. 49–53.

21. Grzegorski T, Losy J. Multiple sclerosis-the remarkable story of a baffling disease. Rev Neurosci. 2019 Jul 1;30(5):511–26.

22. Aarli JA, Abramsky O, Browne P, Chandraratna D, Angood C, Tremlett H, et al. Section Editors Global Perspectives ATLAS OF MULTIPLE SCLEROSIS 2013: A GROWING GLOBAL PROBLEM WITH WIDESPREAD INEQUITY [Internet]. 2014. Available from: http://www.msif.org/about-ms/publications-

23. Koch-Henriksen N, Magyari M. Apparent changes in the epidemiology and severity of multiple sclerosis. Vol. 17, Nature Reviews Neurology. Nature Research; 2021. p. 676–88.

24. Harirchian MH, Fatehi F, Sarraf P, Honarvar NM, Bitarafan S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. Vol. 20, Multiple Sclerosis and Related Disorders. Elsevier B.V.; 2018. p. 43–7.

25. Demir S, Tutuncu M, Uzunkopru C, Gumus H, Sen S, Gunduz T, et al. A comprehensive assessment of patient experience and disease-related awareness in multiple sclerosis: A questionnaire-based nation-wide survey in Turkey. Mult Scler Relat Disord. 2021 Jul 1;52.

26. Hüsnü Efendi Demet Yandım Kuşcu E. MULTİPL SKLEROZ TANI VE TEDAVİ KILAVUZU 2018 [Internet]. Available from: www.galenos.com.tr

27. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, et al. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. Lancet Neurol. 2018 Feb 1;17(2):162–73.

28. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Soelberg Sørensen P, Alan Thompson DmsJ, et al. VIEWS & REVIEWS Defining the clinical course of multiple sclerosis The 2013 revisions. 2014.

29. Kumar V, Abbas AK, Aster JC, Perkins JA. Robbins basic pathology. 935 p.

30. Calabrese M, Filippi M, Gallo P. Cortical lesions in multiple sclerosis. Vol. 6, Nature Reviews Neurology. 2010. p. 438–44.

31. Gh Popescu BF, Pirko I, Lucchinetti CF. Pathology of Multiple Sclerosis: Where Do We Stand? [Internet]. Available from: www.ContinuumJournal.com

32. Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, et al. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. Brain. 2009 May;132(5):1175–89.

33. Popescu BFG, Lucchinetti CF. Pathology of demyelinating diseases. Vol. 7, Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease. 2012. p. 185–217.

34. Lucchinetti C, Brück W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: Implications for the pathogenesis of demyelination. Ann Neurol. 2000;47(6):707–17.

35. Kuhlmann T, Moccia M, Coetzee T, Cohen JA, Correale J, Graves J, et al. Multiple sclerosis progression: time for a new mechanism-driven framework. Vol. 22, The Lancet Neurology. Elsevier Ltd; 2023. p. 78–88.

36. Geurts JJ, Barkhof F. Grey matter pathology in multiple sclerosis. Vol. 7, The Lancet Neurology. 2008. p. 841–51.

37. Preziosa P, Rocca MA, Pagani E, Stromillo ML, Enzinger C, Gallo A, et al. Structural MRI correlates of cognitive impairment in patients with multiple sclerosis: A Multicenter Study Structural MRI Correlates of Cognitive Impairment in Patients With Multiple Sclerosis: A Multicenter Study Cognitive Impairment and Brain Damage in MS Preziosa et al. Hum Brain Mapp. 2016 Apr 1;37(4):1627–44.

38. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. Vol. 14, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2015. p. 183–93.

39. Bar-Or A, Li R. Cellular immunology of relapsing multiple sclerosis: interactions, checks, and balances. Vol. 20, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2021. p. 470–83.

40. Baranzini SE, Oksenberg JR. The Genetics of Multiple Sclerosis: From 0 to 200 in 50 Years. Vol. 33, Trends in Genetics. Elsevier Ltd; 2017. p. 960–70.

41. Ann Gerdes L, Janoschka C, Eveslage M, Mannig B, Wirth T, Schulte-Mecklenbeck A, et al. Immune signatures of prodromal multiple sclerosis in monozygotic twins. Available from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.2003339117

42. Zhu J, Paul WE. Peripheral CD4+ T-cell differentiation regulated by networks of cytokines and transcription factors. Immunol Rev. 2010 Nov;238(1):247–62.

43. Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CCA, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Vol. 476, Nature. 2011. p. 214–9.

44. Sospedra M, Martin R. Immunology of Multiple Sclerosis. Semin Neurol. 2016 Apr 1;36(2):115–27.

45. Gerhards R, Pfeffer LK, Lorenz J, Starost L, Nowack L, Thaler FS, et al. Oligodendrocyte myelin glycoprotein as a novel target for pathogenic autoimmunity in the CNS. Acta Neuropathol Commun. 2020 Dec 1;8(1).

46. Hohlfeld R, Dornmair K, Meinl E, Wekerle H. The search for the target antigens of multiple sclerosis, part 1: Autoreactive CD4+ T lymphocytes as pathogenic effectors and therapeutic targets. Vol. 15, The Lancet Neurology. Lancet Publishing Group; 2016. p. 198–209.

47. Annunziato F, Cosmi L, Liotta F, Maggi E, Romagnani S. Human T helper type 1 dichotomy: origin, phenotype and biological activities. Immunology. 2015 Mar 1;144(3):343–51.

48. Kunkl M, Frascolla S, Amormino C, Volpe E, Tuosto L. T Helper Cells: The Modulators of Inflammation in Multiple Sclerosis. Vol. 9, Cells. NLM (Medline); 2020.

49. Tahmasebinia F, Pourgholaminejad A. The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders. Vol. 79, Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry. Elsevier Inc.; 2017. p. 408–16.

50. Brambilla R. The contribution of astrocytes to the neuroinflammatory response in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Vol. 137, Acta Neuropathologica. Springer Verlag; 2019. p. 757–83.

51. Rahman MT, Ghosh C, Hossain M, Linfield D, Rezaee F, Janigro D, et al. IFN-γ IL-17A, or zonulin rapidly increase the permeability of the blood-brain and small intestinal epithelial barriers: Relevance for neuro-inflammatory diseases. Biochem Biophys Res Commun. 2018 Dec 9;507(1–4):274–9.

52. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, et al. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. American Journal of Pathology. 2008;172(1):146–55.

53. Volpe E, Battistini L, Borsellino G. Advances in T helper 17 cell biology: Pathogenic role and potential therapy in multiple sclerosis. Vol. 2015, Mediators of Inflammation. Hindawi Publishing Corporation; 2015.

54. Venken K, Hellings N, Thewissen M, Somers V, Hensen K, Rummens JL, et al. Compromised CD4+ CD25high regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level. Immunology. 2008;123(1):79–89.

55. Groom JR. Regulators of T-cell fate: Integration of cell migration, differentiation and function. Vol. 289, Immunological Reviews. Blackwell Publishing Ltd; 2019. p. 101–14.

56. Attfield KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. Vol. 22, Nature Reviews Immunology. Nature Research; 2022. p. 734–50.

57. Hollenbach JA, Oksenberg JR. The immunogenetics of multiple sclerosis: A comprehensive review. Vol. 64, Journal of Autoimmunity. Academic Press; 2015. p. 13–25.

58. Obermeier B, Mentele R, Malotka J, Kellermann J, Kümpfel T, Wekerle H, et al. Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. Nat Med. 2008 Jun;14(6):688–93.

59. Brändle SM, Obermeier B, Senel M, Bruder J, Mentele R, Khademi M, et al. Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Jul 12;113(28):7864–9.

60. Lutterotti A, Martin R. Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis. Vol. 7, The Lancet Neurology. 2008. p. 538–47.

61. Hauser SL, Bar-Or A, Comi G, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, et al. Ocrelizumab versus Interferon Beta-1a in Relapsing Multiple Sclerosis. New England Journal of Medicine. 2017 Jan 19;376(3):221–34.

62. Sadovnick AD, Armstrong H, A Rice GP, Bulman D, Hashimoto L, Paty DW, et al. A Population-Based Study of Multiple Sclerosis in Twins: Update A population-based scudy of multiple sclerosis in twins: update. Vol. 33, Ann Neurol. 1993.

63. Alonso A, Hernán MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. Neurology. 2008 Jul 8;71(2):129–35.

64. Koch-Henriksen N, Sørensen PS. The changing demographic pattern of multiple sclerosis epidemiology. Vol. 9, The Lancet Neurology. 2010. p. 520–32.

65. Nielsen NM, Corn G, Frisch M, Stenager E, Koch-Henriksen N, Wohlfahrt J, et al. Multiple sclerosis among first-and second-generation immigrants in Denmark: A population-based cohort study. Brain. 2019 Jun 1;142(6):1587–97.

66. Sintzel MB, Rametta M, Reder AT. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. Vol. 7, Neurology and Therapy. Springer Healthcare; 2018. p. 59–85.

67. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, et al. MULTIPLE SCLEROSIS Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis [Internet]. Vol. 375, Science. 2022. Available from: https://www.science.org

68. Soldan SS, Lieberman PM. Epstein–Barr virus and multiple sclerosis. Vol. 21, Nature Reviews Microbiology. Nature Research; 2023. p. 51–64.

69. Poorolajal J, Bahrami M, Karami M, Hooshmand E. Effect of smoking on multiple sclerosis: A meta-analysis. Journal of Public Health (United Kingdom). 2017 Jun 1;39(2):312–20.

70. Degelman ML, Herman KM. Smoking and multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis using the Bradford Hill criteria for causation. Vol. 17, Multiple Sclerosis and Related Disorders. Elsevier B.V.; 2017. p. 207–16.

71. Nielsen NM, Westergaard T, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H, Wohlfahrt J, et al. Familial risk of multiple sclerosis: A nationwide cohort study. Am J Epidemiol. 2005 Oct;162(8):774–8.

72. Compston A, Sci F, Sawcer S. Genetic Analysis of Multiple Sclerosis. Curr Neurol Neurosci Rep. 2002;2:259–66.

73. Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis [Internet]. Vol. 3, THE LANCET Neurology. 2004. Available from: http://neurology.thelancet.com

74. Patsopoulos NA, Barcellos LF, Hintzen RQ, Schaefer C, van Duijn CM, Noble JA, et al. Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. PLoS Genet. 2013 Nov 1;9(11).

75. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. New England Journal of Medicine. 2007 Aug 30;357(9):851–62.

76. Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kemppinen A, Cotsapas C, et al. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet. 2013;45(11):1353–62.

77. De Jager PL. Title: The Multiple Sclerosis Genomic Map: Role of peripheral immune cells and resident microglia in susceptibility. Available from: https://doi.org/10.1101/143933

78. Madireddy L, Patsopoulos NA, Cotsapas C, Bos SD, Beecham A, McCauley J, et al. A systems biology approach uncovers cell-specific gene regulatory effects of genetic associations in multiple sclerosis. Nat Commun. 2019 Dec 1;10(1).

79. Locus for severity implicates CNS resilience in progression of multiple sclerosis. Nature. 2023 Jul 1;619(7969):323–31.

80. Mitrovič M, Patsopoulos NA, Beecham AH, Dankowski T, Goris A, Dubois B, et al. Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk. Cell. 2018 Nov 29;175(6):1679-1687.e7.

81. Wang Z, Sadovnick AD, Traboulsee ALL, Ross JPP, Bernales CQQ, Encarnacion M, et al. Nuclear Receptor NR1H3 in Familial Multiple Sclerosis. Neuron. 2016 Jun 1;90(5):948–54.

82. Antel J, Ban M, Baranzini S, Barcellos L, Barizzone N, Beecham A, et al. NR1H3 p.Arg415Gln Is Not Associated to Multiple Sclerosis Risk. Neuron. 2016 Oct 19;92(2):333–5.

83. Wyrwoll MJ, Gaasbeek CM, Golubickaite I, Stakaitis R, Oud MS, Nagirnaja L, et al. The piRNA-pathway factor FKBP6 is essential for spermatogenesis but dispensable for control of meiotic LINE-1 expression in humans. Am J Hum Genet. 2022 Oct 6;109(10):1850–66.

84. Vilariño-Güell C, Zimprich A, Martinelli-Boneschi F, Herculano B, Wang Z, Matesanz F, et al. Exome sequencing in multiple sclerosis families identifies 12 candidate genes and nominates biological pathways for the genesis of disease. PLoS Genet. 2019 Jun 1;15(6).

85. Salehi Z, Keramatipour M, Talebi S, Arab SS, Naser Moghadasi A, Sahraian MA, et al. Exome sequencing reveals novel rare variants in Iranian familial multiple sclerosis: The importance of POLD2 in the disease pathogenesis. Genomics. 2021 Jul 1;113(4):2645–55.

86. Barizzone N, Cagliani R, Basagni C, Clarelli F, Mendozzi L, Agliardi C, et al. An investigation of the role of common and rare variants in a large italian multiplex family of multiple sclerosis patients. Genes (Basel). 2021 Oct 1;12(10).

87. Mascia E, Clarelli F, Zauli A, Guaschino C, Sorosina M, Barizzone N, et al. Burden of rare coding variants in an Italian cohort of familial multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2022 Jan 15;362.

88. Fazia T, Marzanati D, Carotenuto AL, Beecham A, Hadjixenofontos A, McCauley JL, et al. Homozygosity haplotype and whole-exome sequencing analysis to identify potentially functional rare variants involved in multiple sclerosis among sardinian families. Curr Issues Mol Biol. 2021 Dec 1;43(3):1778–93.

89. Karakus N, Yigit S, Kurt GS, Cevik B, Demir O, Ates O. Association of interleukin (IL)-4 gene intron 3 VNTR polymorphism with multiple sclerosis in Turkish population. Hum Immunol. 2013 Sep;74(9):1157–60.

90. Isik N, Arman A, Canturk IA, Gurkan AC, Candan F, Aktan S, et al. Multiple sclerosis: Association with the interleukin-1 gene family polymorphisms in the Turkish population. International Journal of Neuroscience. 2013 Oct;123(10):711–8.

91. Karakas Celik S, Öz ZS, Dursun A, Unal A, Emre U, Cicek S, et al. Interleukin 18 gene polymorphism is a risk factor for multiple sclerosis. Mol Biol Rep. 2014;41(3):1653–8.

92. Simsek H, Geckin H, Sensoz NP, List EO, Arman A. Association Between IL7R Promoter Polymorphisms and Multiple Sclerosis in Turkish Population. Journal of Molecular Neuroscience. 2019 Jan 1;67(1):38–47.

93. Everest E, Ahangari M, Uygunoglu U, Tutuncu M, Bulbul A, Saip S, et al. Investigating the role of common and rare variants in multiplex multiple sclerosis families reveals an increased burden of common risk variation. Sci Rep. 2022 Dec 1;12(1).

94. William S. Klug, Michael R. Cummings, Charlotte A. Spencer, Michael A. Palladino, Darrell Killian - Concepts of Genetics-Pearson (2019).

95. Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? Vol. 48, Journal of Medical Genetics. 2011. p. 580–9.

96. Ng SB, Turner EH, Robertson PD, Flygare SD, Bigham AW, Lee C, et al. Targeted capture and massively parallel sequencing of 12 human exomes. Nature. 2009 Sep 10;461(7261):272–6.

97. Cirulli ET, Goldstein DB. Uncovering the roles of rare variants in common disease through whole-genome sequencing. Vol. 11, Nature Reviews Genetics. 2010. p. 415–25.

98. Bodmer W, Bonilla C. Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases. Vol. 40, Nature Genetics. 2008. p. 695–701.

99. Netto GJ, Kaul KL. Genomic Applications in Pathology.

100. Wang J, Raskin L, Samuels DC, Shyr Y, Guo Y. Genome measures used for quality control are dependent on gene function and ancestry. Bioinformatics. 2015 Jul 15;31(3):318–23.

101. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, et al. Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: A joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. Genetics in Medicine. 2015 May 8;17(5):405–24.

102. Yuan Z, Chen P, Zhang T, Shen B, Chen L. Agenesis and hypomyelination of corpus callosum in mice lacking nsun5, an rna methyltransferase. Cells. 2019 Jun 1;8(6).

103. Zhang Y, Liu C, Wei B, Pei G. Loss of β-arrestin 2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis with reduced number of Foxp3+ CD4+ regulatory T cells. Immunology. 2013 Dec;140(4):430–40.

104. Cai Y, Yang C, Yu X, Qian J, Dai M, Wang Y, et al. Deficiency of β-Arrestin 2 in Dendritic Cells Contributes to Autoimmune Diseases. The Journal of Immunology. 2019 Jan 15;202(2):407–20.

105. Narayanan M, Huynh JL, Wang K, Yang X, Yoo S, McElwee J, et al. Common dysregulation network in the human prefrontal cortex underlies two neurodegenerative diseases. Mol Syst Biol. 2014 Jul;10(7).

106. Moon JS, Ho CC, Park JH, Park K, Shin BY, Lee SH, et al. Lrig1-expression confers suppressive function to CD4+ cells and is essential for averting autoimmunity via the Smad2/3/Foxp3 axis. Nat Commun. 2023 Dec 1;14(1).

107. Khrunin A V., Khvorykh G V., Arapova AS, Kulinskaya AE, Koltsova EA, Petrova EA, et al. The Study of the Association of Polymorphisms in LSP1, GPNMB, PDPN, TAGLN, TSPO, and TUBB6 Genes with the Risk and Outcome of Ischemic Stroke in the Russian Population. Int J Mol Sci. 2023 Apr 1;24(7).

108. Imani SZH, Hojati Z, Khalilian S, Dehghanian F, Kheirollahi M, Khorrami M, et al. Expression and clinical significance of IL7R, NFATc2, and RNF213 in familial and sporadic multiple sclerosis. Sci Rep. 2021 Dec 1;11(1).

109. Läderach F, Münz C. Altered Immune Response to the Epstein–Barr Virus as a Prerequisite for Multiple Sclerosis. Vol. 11, Cells. MDPI; 2022.

110. Cagliani R, Guerini FR, Fumagalli M, Riva S, Agliardi C, Galimberti D, et al. A trans-specific polymorphism in ZC3HAV1 is maintained by long-standing balancing selection and may confer susceptibility to multiple sclerosis. Mol Biol Evol. 2012 Jun;29(6):1599–613.

111. Afrasiabi A, Ahlenstiel C, Swaminathan S, Parnell GP. The interaction between Epstein–Barr virus and multiple sclerosis genetic risk loci: insights into disease pathogenesis and therapeutic opportunities. Vol. 12, Clinical and Translational Immunology. John Wiley and Sons Inc; 2023.

112. Alcina A, Fernández Ó, Gonzalez JR, Catalá-Rabasa A, Fedetz M, Ndagire D, et al. Tag-SNP analysis of the GFI1-EVI5-RPL5-FAM69 risk locus for multiple sclerosis. European Journal of Human Genetics. 2010 Jul;18(7):827–31.

113. Inuzuka M, Hayakawa M, Ingi T. Serine, an activity-regulated protein family, incorporates serine into membrane lipid synthesis. Journal of Biological Chemistry. 2005 Oct 21;280(42):35776–83.

114. Combes P, Bonnet-Dupeyron MN, Gauthier-Barichard F, Schiffmann R, Bertini E, Rodriguez D, et al. PLP1 and GPM6B intragenic copy number analysis by MAPH in 262 patients with hypomyelinating leukodystrophies: Identification of one partial triplication and two partial deletions of PLP1. Neurogenetics. 2006;7(1):31–7.

115. Möbius W, Patzig J, Nave KA, Werner HB. Phylogeny of proteolipid proteins: Divergence, constraints, and the evolution of novel functions in myelination and neuroprotection. Vol. 4, Neuron Glia Biology. 2008. p. 111–27.

116. Werner HB, Krämer-Albers EM, Strenzke N, Saher G, Tenzer S, Ohno-Iwashita Y, et al. A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system. Glia. 2013 Apr;61(4):567–86.

117. Cavanillas ML, Fernández O, Comabella M, Alcina A, Fedetz M, Izquierdo G, et al. Replication of top markers of a genome-wide association study in multiple sclerosis in Spain. Genes Immun. 2011;12(2):110–5.

118. Ito H, Nagata KI. Functions of CNKSR2 and Its Association with Neurodevelopmental Disorders. Vol. 11, Cells. MDPI; 2022.

119. Yuasa-Kawada J, Kinoshita-Kawada M, Tsuboi Y, Wu JY. Neuronal guidance genes in health and diseases. Vol. 14, Protein and Cell. Oxford University Press; 2023. p. 238–61.

120. Schmied MC, Zehetmayer S, Reindl M, Ehling R, Bajer-Kornek B, Leutmezer F, et al. Replication study of multiple sclerosis (MS) susceptibility alleles and correlation of DNA-variants with disease features in a cohort of Austrian MS patients. Neurogenetics. 2012 May;13(2):181–7.

121. Allimuthu D, Hubler Z, Najm FJ, Tang H, Bederman I, Seibel W, et al. Diverse Chemical Scaffolds Enhance Oligodendrocyte Formation by Inhibiting CYP51, TM7SF2, or EBP. Cell Chem Biol. 2019 Apr 18;26(4):593-599.e4.

122. Hrastelj J, Andrews R, Loveless S, Morgan J, Bishop SM, Bray NJ, et al. CSF-resident CD4+T-cells display a distinct gene expression profile with relevance to immune surveillance and multiple sclerosis. Brain Commun. 2021 Jul 1;3(3).

123. 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.

124. Tejera-Alhambra M, Casrouge A, de Andrés C, Ramos-Medina R, Alonso B, Vega J, et al. Low DPP4 expression and activity in multiple sclerosis. Clinical Immunology. 2014 Feb;150(2):170–83.

125. Preller V, Gerber A, Wrenger S, Togni M, Marguet D, Tadje J, et al. TGF-1-Mediated Control of Central Nervous System Inflammation and Autoimmunity through the Inhibitory Receptor CD26 1 [Internet]. Vol. 178, The Journal of Immunology. 2007. Available from: http://journals.aai.org/jimmunol/article-pdf/178/7/4632/1240088/zim00707004632.pdf

126. Yazbeck R, Howarth GS, Abbott CA. Dipeptidyl peptidase inhibitors, an emerging drug class for inflammatory disease? Vol. 30, Trends in Pharmacological Sciences. 2009. p. 600–7.

127. Sellebjerg F, Ross C, Koch-Henriksen N, Soelberg Sørensen P, Frederiksen JL, Bendtzen K, et al. CD26 + CD4 + T cell counts and attack risk in interferon-treated multiple sclerosis. Multiple Sclerosis. 2005 Dec;11(6):641–5.

128. Ammitzbøll C, Börnsen L, Romme Christensen J, Ratzer R, Romme Nielsen B, Søndergaard HB, et al. Smoking reduces circulating CD26hiCD161hi MAIT cells in healthy individuals and patients with multiple sclerosis. J Leukoc Biol. 2017 May 1;101(5):1211–20.

129. Reinhold D, Hemmer B, Gran B, Born I, Faust J, Neubert K, et al. Inhibitors of dipeptidyl peptidase IVrCD26 suppress activation of human MBP-specific CD4 q T cell clones. Vol. 87, Journal of Neuroimmunology. 1998.

130. Ledahawsky LM, Terzenidou ME, Edwards R, Kline RA, Graham LC, Eaton SL, et al. The mitochondrial protein Sideroflexin 3 (SFXN3) influences neurodegeneration pathways in vivo. FEBS Journal. 2022 Jul 1;289(13):3894–914.

131. Haakonsen DL, Heider M, Ingersoll AJ, Vodehnal K, Witus SR, Uenaka T, et al. Stress response silencing by an E3 ligase mutated in neurodegeneration. Nature. 2024 Feb 22;626(8000):874–80.

132. Aguilan JT, Pedrosa E, Dolstra H, Nur Baykara R, Barnes J, Zhang J, et al. Proteomics and phosphoproteomics profiling in glutamatergic neurons and microglia in 1 an iPSC model of Jansen de Vries Syndrome 2. Available from: https://doi.org/10.1101/2023.07.08.548192

133. Conroy J, McGettigan P, Murphy R, Webb D, Murphy SM, McCoy B, et al. A novel locus for episodic ataxia: UBR4 the likely candidate. European Journal of Human Genetics. 2014;22(4):505–10.

134. Ruhrmann S, Stridh P, Kular L, Jagodic M. Genomic imprinting: A missing piece of the Multiple Sclerosis puzzle? Vol. 67, International Journal of Biochemistry and Cell Biology. Elsevier Ltd; 2015. p. 49–57.

135. Baulina N, Kiselev I, Favorova O. Molecular Sciences Imprinted Genes and Multiple Sclerosis: What Do We Know? J Mol Sci [Internet]. 2021;22:1346. Available from: https://doi.org/10.3390/ijms

136. Baulina NM, Kabaeva AR, Boyko AN, Favorova OO. Analysis of miRNA Expression from the DLK1-DIO3 Locus in CD4+ and CD14+ Cells in Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis. Neurosci Behav Physiol. 2023 May 1;53(4):475–82.

137. Baulina N, Osmak G, Kiselev I, Popova E, Boyko A, Kulakova O, et al. Mirnas from DLK1-DIO3 imprinted locus at 14q32 are associated with multiple sclerosis: Gender-specific expression and regulation of receptor tyrosine Kinases Signaling. Cells. 2019 Feb 6;8(2).

138. Brynedal B, Wojcik J, Esposito F, Debailleul V, Yaouanq J, Martinelli-Boneschi F, et al. MGAT5 alters the severity of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2010 Mar 30;220(1–2):120–4.

139. Li CF, Zhou RW, Mkhikian H, Newton BL, Yu Z, Demetriou M. Hypomorphic MGAT5 polymorphisms promote multiple sclerosis cooperatively with MGAT1 and interleukin-2 and 7 receptor variants. J Neuroimmunol. 2013 Mar 15;256(1–2):71–6.

140. Lee SU, Li CF, Mortales CL, Pawling J, Dennis JW, Grigorian A, et al. Increasing cell permeability of N-acetylglucosamine via 6-acetylation enhances capacity to suppress T-helper 1 (TH1)/TH17 responses and autoimmunity. PLoS One. 2019 Mar 1;14(3).

141. Chien MW, Fu SH, Hsu CY, Liu YW, Sytwu HK. The modulatory roles of N-glycans in t-cell-mediated autoimmune diseases. Vol. 19, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2018.

142. Unal A, Dursun A, Emre U, Tascilar NF, Ankarali H. Evaluation of common mutations in the Mediterranean fever gene in Multiple Sclerosis patients: Is it a susceptibility gene? J Neurol Sci. 2010 Jul 15;294(1–2):38–42.

143. Tossberg JT, Crooke PS, Henderson MA, Sriram S, Mrelashvili D, Vosslamber S, et al. Using biomarkers to predict progression from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis. J Clin Bioinforma. 2013 Oct 3;3(1).

144. Tossberg JT, Crooke PS, Henderson MA, Sriram S, Mrelashvili D, Chitnis S, et al. Gene-expression signatures: Biomarkers toward diagnosing multiple sclerosis. Genes Immun. 2012 Feb;13(2):146–54.

145. Marchese E, Valentini M, Di Sante G, Cesari E, Adinolfi A, Corvino V, et al. Alternative splicing of neurexins 1–3 is modulated by neuroinflammation in the prefrontal cortex of a murine model of multiple sclerosis. Exp Neurol. 2021 Jan 1;335.

146. Cuttler K, Hassan M, Carr J, Cloete R, Bardien S. Emerging evidence implicating a role for neurexins in neurodegenerative and neuropsychiatric disorders. Vol. 11, Open Biology. Royal Society Publishing; 2021.

147. Linker RA, Gold R. Remote changes in gene expression after autoimmune demyelination: Grey matters. Vol. 205, Journal of Neuroimmunology. 2008. p. 8–9.

148. Vavougios GD, Zarogiannis SG, Krogfelt KA, Gourgoulianis K, Mitsikostas DD, Hadjigeorgiou G. Novel candidate genes of the PARK7 interactome as mediators of apoptosis and acetylation in multiple sclerosis: An in silico analysis. Mult Scler Relat Disord. 2018 Jan 1;19:8–14.

149. Yu-Wai-Man P, Spyropoulos A, Duncan HJ, Guadagno J V., Chinnery PF. A multiple sclerosis-like disorder in patients with OPA1 mutations. Ann Clin Transl Neurol. 2016 Sep 1;3(9):723–9.

150. De Rasmo D, Ferretta A, Russo S, Ruggieri M, Lasorella P, Paolicelli D, et al. PBMC of multiple sclerosis patients show deregulation of OPA1 processing associated with increased ROS and PHB2 protein levels. Biomedicines. 2020 Apr 1;8(4).

151. Patel KR, Karaa A, Mateen FJ. Relapsing remitting multiple sclerosis in progressive external ophthalmoplegia: A report of two cases. Multiple Sclerosis Journal. 2019 May 1;25(6):879–82.

152. Ma T, Wang Y, Yu L, Liu J, Wang T, Sun P, et al. Mea6/cTAGE5 cooperates with TRAPPC12 to regulate PTN secretion and white matter development. iScience. 2024 Mar 15;27(3).

153. Alfadhli S, Mohammed EMA, Al Shubaili A. Association analysis of nitric oxide synthases: NOS1, NOS2A and NOS3 genes, with multiple sclerosis. Ann Hum Biol. 2013 Jul;40(4):368–75.

154. Chuang TY, Guo Y, Seki SM, Rosen AM, Johanson DM, Mandell JW, et al. LRP1 expression in microglia is protective during CNS autoimmunity. Acta Neuropathol Commun. 2016 Jul 11;4(1):68.

155. Gaultier A, Wu X, Le Moan N, Takimoto S, Mukandala G, Akassoglou K, et al. Low-density lipoprotein receptor-related protein 1 is an essential receptor for myelin phagocytosis. J Cell Sci. 2009 Apr 15;122(8):1155–62.

156. Fernandez-Castaneda A, Arandjelovic S, Stiles TL, Schlobach RK, Mowen KA, Gonias SL, et al. Identification of the low density lipoprotein (LDL) receptor-related protein-1 interactome in central nervous system myelin suggests a role in the clearance of necrotic cell debris. Journal of Biological Chemistry. 2013 Feb 15;288(7):4538–48.

157. Vanheel A, Daniels R, Plaisance S, Baeten K, Hendriks JJA, Leprince P, et al. Identification of protein networks involved in the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. PLoS One. 2012 Apr 17;7(4).

158. Inada R, Miyamoto K, Tanaka N, Moriguchi K, Kadomatsu K, Takeuchi K, et al. Chondroitin sulfate N-acetylgalactosyltransferase-1 knockout shows milder phenotype in experimental autoimmune encephalomyelitis than in wild type. Glycobiology. 2021 Mar 1;31(3):260–5.

159. Saigoh K, Yoshimura S, Izumikawa T, Miyata S, Tabara Y, Matsushita T, et al. Chondroitin sulfate β-1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase-1 (ChGn-1) polymorphism: Association with progression of multiple sclerosis. Neurosci Res. 2016 Jul 1;108:55–9.

160. Zarzuelo-Romero MJ, Pérez-Ramírez C, Cura Y, Carrasco-Campos MI, Marangoni-Iglecias LM, Ramírez-Tortosa MC, et al. Influence of genetic polymorphisms on clinical outcomes of glatiramer acetate in multiple sclerosis patients. Vol. 11, Journal of Personalized Medicine. MDPI; 2021.

161. Shao Y, Chen C, Zhu T, Sun Z, Li S, Gong L, et al. TRPM2 contributes to neuroinflammation and cognitive deficits in a cuprizone-induced multiple sclerosis model via NLRP3 inflammasome. Neurobiol Dis. 2021 Dec 1;160.

162. Malko P, Syed Mortadza SA, McWilliam J, Jiang LH. TRPM2 Channel in Microglia as a New Player in Neuroinflammation Associated With a Spectrum of Central Nervous System Pathologies. Vol. 10, Frontiers in Pharmacology. Frontiers Media S.A.; 2019.

163. Tsutsui M, Hirase R, Miyamura S, Nagayasu K, Nakagawa T, Mori Y, et al. TRPM2 exacerbates central nervous system inflammation in experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing production of CXCL2 chemokines. Journal of Neuroscience. 2018 Sep 26;38(39):8484–95.

164. Jaudon F, Albini M, Ferroni S, Benfenati F, Cesca F. A developmental stage- And Kidins220-dependent switch in astrocyte responsiveness to brain-derived neurotrophic factor. J Cell Sci. 2021 Aug 1;134(16).

165. Almacellas-Barbanoj A, Albini M, Satapathy A, Jaudon F, Michetti C, Krawczun-Rygmaczewska A, et al. Kidins220/ARMS modulates brain morphology and anxiety-like traits in adult mice. Cell Death Discov. 2022 Dec 1;8(1).

166. del Puerto A, Pose-Utrilla J, Simón-García A, López-Menéndez C, Jiménez AJ, Porlan E, et al. Kidins220 deficiency causes ventriculomegaly via SNX27-retromer-dependent AQP4 degradation. Mol Psychiatry. 2021 Nov 1;26(11):6411–26.

167. Ramsaransing G, Teelken A, Prokopenko VM, Arutjunyan A V, De J. Low leucocyte myeloperoxidase activity in patients with multiple sclerosis [Internet]. Vol. 74, J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2003. Available from: www.jnnp.com

168. Nagra RM, Becher B, Tourtellotte WW, Antel JP, Gold D, Paladino T, et al. Immunohistochemical and genetic evidence of myeloperoxidase involvement in multiple sclerosis. Vol. 78, Journal of Neuroimmunology. 1997.

169. Kantarci OH, Atkinson EJ, Hebrink DD, Mcmurray CT, Weinshenker BG. Association of a myeloperoxidase promoter polymorphism with multiple q sclerosis a b a [Internet]. Vol. 105, Journal of Neuroimmunology. 2000. Available from: www.elsevier.com/locate/jneuroin

170. Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S. Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis. Neurosci Lett. 2008 Oct 24;444(2):195–8.

171. Lundmark F, Salter H, Hillert J. An association study of two functional promotor polymorphisms in the myeloperoxidase (MPO) gene in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis. 2007;13(6):697–700.

172. Pontis S, Palese F, Summa M, Realini N, Lanfranco M, De Mei C, et al. N-Acylethanolamine Acid Amidase contributes to disease progression in a mouse model of multiple sclerosis. Pharmacol Res. 2020 Oct 1;160.

173. Li Y, Zhou P, Chen H, Chen Q, Kuang X, Lu C, et al. Inflammation-restricted anti-inflammatory activities of a N-acylethanolamine acid amidase (NAAA) inhibitor F215. Pharmacol Res. 2018 Jun 1;132:7–14.

174. Yang L, Ji C, Li Y, Hu F, Zhang F, Zhang H, et al. Natural Potent NAAA Inhibitor Atractylodin Counteracts LPS-Induced Microglial Activation. Front Pharmacol. 2020 Oct 2;11.

175. Gao C, Huang L, Long Y, Zheng J, Yang J, Pu S, et al. Y-39983, a selective rho-kinase inhibitor, attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis via inhibition of demyelination. Neuroimmunomodulation. 2013 Sep;20(6):334–40.

176. Brorson IS, Eriksson A, Leikfoss IS, Celius EG, Berg-Hansen P, Barcellos LF, et al. No differential gene expression for CD41 T cells of MS patients and healthy controls. Mult Scler J Exp Transl Clin. 2019;5(2).

177. Rujescu D, Meisenzahl EM, Krejcova S, Giegling I, Zetzsche T, Reiser M, et al. Plexin B3 is genetically associated with verbal performance and white matter volume in human brain. Mol Psychiatry. 2007 Feb;12(2):190–4.

178. Kreutzer M, Seehusen F, Kreutzer R, Pringproa K, Kummerfeld M, Claus P, et al. Axonopathy is associated with complex axonal transport defects in a model of multiple sclerosis. Brain Pathology. 2012 Jul;22(4):454–71.

179. Hares K, Redondo J, Kemp K, Rice C, Scolding N, Wilkins A. Axonal motor protein KIF5A and associated cargo deficits in multiple sclerosis lesional and normal-appearing white matter. Neuropathol Appl Neurobiol. 2017 Apr 1;43(3):227–41.

180. Hares K, Kemp K, Rice C, Gray E, Scolding N, Wilkins A. Reduced axonal motor protein expression in non-Lesional grey matter in multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2014;20(7):812–21.

181. Pomatto LCD, Raynes R, Davies KJA. The peroxisomal lon protease LonP2 in aging and disease: Functions and comparisons with mitochondrial Lon protease LonP1. Biological Reviews. 2017 May 1;92(2):739–53.

182. Roczkowsky A, Doan MAL, Hlavay BA, Mamik MK, Branton WG, McKenzie BA, et al. Peroxisome Injury in Multiple Sclerosis: Protective Effects of 4-Phenylbutyrate in CNS-Associated Macrophages. Journal of Neuroscience. 2022 Sep 14;42(37):7152–65.

183. Omi S, Nakata R, Okamura-Ikeda K, Konishi H, Taniguchi H. Contribution of peroxisome-specific isoform of lon protease in sorting PTS1 proteins to peroxisomes. J Biochem. 2008 May;143(5):649–60.

184. Nakazawa T, Hashimoto R, Sakoori K, Sugaya Y, Tanimura A, Hashimotodani Y, et al. Emerging roles of ARHGAP33 in intracellular trafficking of TrkB and pathophysiology of neuropsychiatric disorders. Nat Commun. 2016 Feb 3;7.

185. Reuter E, Weber J, Paterka M, Ploen R, Breiderhoff T, van Horssen J, et al. Role of Sortilin in Models of Autoimmune Neuroinflammation. The Journal of Immunology. 2015 Dec 15;195(12):5762–9.

186. Niftullayev S, Lamarche-Vane N. Regulators of rho GTPases in the nervous system: Molecular implication in axon guidance and neurological disorders. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019.

187. Schirò G, Iacono S, Ragonese P, Aridon P, Salemi G, Balistreri CR. A Brief Overview on BDNF-Trk Pathway in the Nervous System: A Potential Biomarker or Possible Target in Treatment of Multiple Sclerosis? Vol. 13, Frontiers in Neurology. Frontiers Media S.A.; 2022.

188. Huang C, Yuan P, Wu J, Huang J. Estrogen regulates excitatory amino acid carrier 1 (EAAC1) expression through sphingosine kinase 1 (SphK1) transacting FGFR-mediated ERK signaling in rat C6 astroglial cells. Neuroscience. 2016 Apr 5;319:9–22.

189. Blasko E, Haskell CA, Leung S, Gualtieri G, Halks-Miller M, Mahmoudi M, et al. Beneficial role of the GPR30 agonist G-1 in an animal model of multiple sclerosis. J Neuroimmunol. 2009 Sep 29;214(1–2):67–77.

190. Notas G, Kampa M, Castanas E. G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Immune Cells and Its Role in Immune-Related Diseases. Vol. 11, Frontiers in Endocrinology. Frontiers Media S.A.; 2020.

191. Wang C, Dehghani B, Li Y, Kaler LJ, Proctor T, Vandenbark AA, et al. Membrane Estrogen Receptor Regulates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis through Up-regulation of Programmed Death 1. The Journal of Immunology. 2009 Mar 1;182(5):3294–303.

192. Alavi MS, Karimi G, Roohbakhsh A. The role of orphan G protein-coupled receptors in the pathophysiology of multiple sclerosis: A review. Vol. 224, Life Sciences. Elsevier Inc.; 2019. p. 33–40.

193. Sepulveda M, Munteis E, Rubio MA, Pascual J, Roquer J. Adult onset Pompe disease associated with multiple sclerosis. Vol. 258, Journal of Neurology. 2011. p. 2286–7.

194. El Chehadeh S, Han KA, Kim D, Jang G, Bakhtiari S, Lim D, et al. SLITRK2 variants associated with neurodevelopmental disorders impair excitatory synaptic function and cognition in mice. Nat Commun. 2022 Dec 1;13(1).

195. Ben-David Y, Kagan S, Cohen Ben-Ami H, Rostami J, Mizrahi T, Kulkarni AR, et al. RIC3, the cholinergic anti-inflammatory pathway, and neuroinflammation. Int Immunopharmacol. 2020 Jun 1;83.

196. Briggs FBS. Nicotinic acetylcholine receptors α7 and α9 modifies tobacco smoke risk for multiple sclerosis. Multiple Sclerosis Journal. 2021 Jul 1;27(8):1166–74.

197. Baranzini SE, Srinivasan R, Khankhanian P, Okuda DT, Nelson SJ, Matthews PM, et al. Genetic variation influences glutamate concentrations in brains of patients with multiple sclerosis. Brain. 2010;133(9):2603–11.

198. Clarelli F, Liberatore G, Sorosina M, Osiceanu AM, Esposito F, Mascia E, et al. Pharmacogenetic study of long-term response to interferon-β treatment in multiple sclerosis. Pharmacogenomics Journal. 2017 Jan 1;17(1):84–91.

199. Weil R, Laplantine E, Curic S, Génin P. Role of optineurin in the mitochondrial dysfunction: Potential implications in neurodegenerative diseases and cancer. Vol. 9, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2018.

200. Toth RP, Atkin JD. Dysfunction of optineurin in amyotrophic lateral sclerosis and glaucoma. Vol. 9, Frontiers in Immunology. Frontiers Media S.A.; 2018.

201. Bedford L, Hay D, Devoy A, Paine S, Powe DG, Seth R, et al. Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and lewy-like inclusions resembling human pale bodies. Journal of Neuroscience. 2008 Aug 13;28(33):8189–98.

202. Huber CC, Callegari E, Paez M, Li X, Wang H. Impaired 26S proteasome causes learning and memory deficiency and induces neuroinflammation mediated by NF-κB in mice. Available from: https://doi.org/10.1101/2024.02.09.579699

203. Shepard CJ, Cline SG, Hinds D, Jahanbakhsh S, Prokop JW, Cj S, et al. Breakdown of multiple sclerosis genetics to identify an integrated disease network and potential variant mechanisms. Physiol Genomics [Internet]. 2019;51:562–77. Available from: www.physiolgenomics.org

204. Chapouly C, Argaw AT, Horng S, Castro K, Zhang J, Asp L, et al. Astrocytic TYMP and VEGFA drive blood-brain barrier opening in inflammatory central nervous system lesions. Brain. 2015 Jun 1;138(6):1548–67.

205. Lin J, Zhou J, Xu Y. Potential drug targets for multiple sclerosis identified through Mendelian randomization analysis. Brain. 2023 Aug 1;146(8):3364–72.

206. Snow JW, Abraham N, Ma MC, Herndier BG, Pastuszak AW, Goldsmith MA. Loss of Tolerance and Autoimmunity Affecting Multiple Organs in STAT5A/5B -Deficient Mice . The Journal of Immunology. 2003 Nov 15;171(10):5042–50.

207. Hatami M, Salmani T, Arsang-Jang S, Davood Omrani M, Mazdeh M, Ghafouri-Fard S, et al. STAT5a and STAT6 gene expression levels in multiple sclerosis patients. Cytokine. 2018 Jun 1;106:108–13.

208. Kagami SI, Nakajima H, Suto A, Hirose K, Suzuki K, Morita S, et al. Stat5a regulates T helper cell differentiation by several distinct mechanisms [Internet]. 2001. Available from: http://ashpublications.org/blood/article-pdf/97/8/2358/1673332/h8080102358.pdf

209. Akira S. Functional Roles of STAT Family Proteins: Lessons from Knockout Mice [Internet]. Vol. 17, Stem Cells. 1999. Available from: https://academic.oup.com/stmcls/article/17/3/138/6413704

210. Kim YJ, Ahn K, Gim JA, Oh MH, Han K, Kim HS. Gene structure variation in segmental duplication block C of human chromosome 7q 11.23 during primate evolution. Gene. 2015 Dec 1;573(2):285–95.

211. Zilkha-Falb R, Gurevich M, Hanael E, Achiron A. Prickle1 as positive regulator of oligodendrocyte differentiation. Neuroscience. 2017 Nov 19;364:107–21.

212. Acosta-Galeana I, Hernández-Martínez R, Reyes-Cruz T, Chiquete E, Aceves-Buendia J de J. RNA-binding proteins as a common ground for neurodegeneration and inflammation in amyotrophic lateral sclerosis and multiple sclerosis. Vol. 16, Frontiers in Molecular Neuroscience. Frontiers Media SA; 2023.

213. Masaki K, Sonobe Y, Ghadge G, Pytel P, Lépine P, Pernin F, et al. RNA-binding protein altered expression and mislocalization in MS. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2020 May 26;7(3).

214. Zhang Y, Burberry A, Wang JY, Sandoe J, Ghosh S, Udeshi ND, et al. The C9orf72-interacting protein Smcr8 is a negative regulator of autoimmunity and lysosomal exocytosis. Genes Dev. 2018 Jul 1;32(13–14):929–43.

215. Law SH, Chan ML, Marathe GK, Parveen F, Chen CH, Ke LY. An updated review of lysophosphatidylcholine metabolism in human diseases. Vol. 20, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2019.

216. Roczkowsky A, Doan MAL, Hlavay BA, Mamik MK, Branton WG, McKenzie BA, et al. Peroxisome Injury in Multiple Sclerosis: Protective Effects of 4-Phenylbutyrate in CNS-Associated Macrophages. Journal of Neuroscience. 2022 Sep 14;42(37):7152–65.

217. Yaeghmaie R, Ghafouri-Fard S, Noroozi R, Tavakoli F, Taheri M, Ayatollahi SA. Polymorphisms in the angiotensin I converting enzyme (ACE) gene are associated with multiple sclerosis risk and response to Interferon-β treatment. Int Immunopharmacol. 2018 Nov 1;64:275–9.

218. Živković M, Kolaković A, Stojković L, Dinčić E, Kostić S, Alavantić D, et al. Renin-angiotensin system gene polymorphisms as risk factors for multiple sclerosis. J Neurol Sci. 2016 Apr 15;363:29–32.

219. Lovrečić L, Ristić S, Starčević-Čizmarević N, Jazbec SŠ, Sepčić J, Kapović M, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism and risk of multiple sclerosis. Acta Neurol Scand. 2006 Dec;114(6):374–7.

220. Gavin AL, Huang D, Huber C, Mårtensson A, Tardif V, Skog PD, et al. PLD3 and PLD4 are single-stranded acid exonucleases that regulate endosomal nucleic-acid sensing. Nat Immunol. 2018 Sep 1;19(9):942–53.

221. Zhang W, Zhu F, Zhu J, Liu K. Phospholipase D, a Novel Therapeutic Target Contributes to the Pathogenesis of Neurodegenerative and Neuroimmune Diseases. Vol. 2024, Analytical Cellular Pathology. Hindawi Limited; 2024.

222. Hamid KM, Mirshafiey A. The Role of Death Domains Superfamily in Multiple Sclerosis Pathogenesis. OAlib. 2015;02(01):1–11.

223. Jin L, Zhang J, Hua X, Xu X, Li J, Wang J, et al. Astrocytic SARM1 promotes neuroinflammation and axonal demyelination in experimental autoimmune encephalomyelitis through inhibiting GDNF signaling. Cell Death Dis. 2022 Sep 1;13(9).

224. Camargo Ortega G, Falk S, Johansson PA, Peyre E, Broix L, Sahu SK, et al. The centrosome protein AKNA regulates neurogenesis via microtubule organization. Nature. 2019 Mar 7;567(7746):113–7.

225. Chomyk AM, Volsko C, Tripathi A, Deckard SA, Trapp BD, Fox RJ, et al. DNA methylation in demyelinated multiple sclerosis hippocampus. Sci Rep. 2017 Dec 1;7(1).

226. Zhou Y, Graves JS, Simpson S, Charlesworth JC, Van Der Mei I, Waubant E, et al. Genetic variation in the gene LRP2 increases relapse risk in multiple sclerosis. J Neurol Neurosurg Psychiatry. 2017 Oct 1;88(10):864–8.

227. Chow HH, Talbot J, Marstrand L, Lundell H, Roman Siebner H, Bach Søndergaard H, et al. Smoking, cardiovascular risk factors and LRP2 gene variation: Associations with disease severity, cognitive function and brain structure in primary progressive multiple sclerosis. Mult Scler Relat Disord. 2021 Nov 1;56.

228. Hilven K, Vandebergh M, Smets I, Mallants K, Goris A, Dubois B. Genetic basis for relapse rate in multiple sclerosis: Association with LRP2 genetic variation. Multiple Sclerosis Journal. 2018 Nov 1;24(13):1773–5.

229. Enders M, Heider T, Ludwig A, Kuerten S. Strategies for neuroprotection in multiple sclerosis and the role of calcium. Vol. 21, International Journal of Molecular Sciences. MDPI AG; 2020.

230. Cooper JD, Smyth DJ, Walker NM, Stevens H, Burren OS, Wallace C, et al. Inherited variation in vitamin D genes is associated with predisposition to autoimmune disease type 1 diabetes. Diabetes. 2011 May;60(5):1624–31.

231. Ahn J, Yu K, Stolzenberg-Solomon R, Claire Simon K, McCullough ML, Gallicchio L, et al. Genome-wide association study of circulating vitamin D levels. Hum Mol Genet. 2010 Apr 23;19(13):2739–45.

232. Simon KC, Munger KL, Yang X, Ascherio A. Polymorphisms in vitamin D metabolism related genes and risk of multiple sclerosis. Multiple Sclerosis. 2010 Feb;16(2):133–8.

233. Manousaki D, Dudding T, Haworth S, Hsu YH, Liu CT, Medina-Gómez C, et al. Erratum: Low-Frequency Synonymous Coding Variation in CYP2R1 Has Large Effects on Vitamin D Levels and Risk of Multiple Sclerosis (The American Journal of Human Genetics (2017) 101(2) (227–238), (S000292971730277X), (10.1016/j.ajhg.2017.06.014)). Vol. 103, American Journal of Human Genetics. Cell Press; 2018. p. 1053.

234. Peng S, Cai X, Chen J, Sun J, Lai B, Chang M, et al. The role of CELF family in neurodevelopment and neurodevelopmental disorders. Vol. 197, Neurobiology of Disease. Academic Press Inc.; 2024.

235. Mallory MJ, Allon SJ, Qiu J, Gazzara MR, Tapescu I, Martinez NM, et al. Induced transcription and stability of CELF2 mRNA drives widespread alternative splicing during T-cell signaling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2015 Apr 28;112(17):E2139–48.

236. Gallo JM, Spickett C. The role of CELF proteins in neurological disorders. Vol. 7, RNA Biology. Taylor and Francis Inc.; 2010. p. 474–9.

237. Jokubaitis VG, Gresle MM, Kemper DA, Doherty W, Perreau VM, Cipriani TL, et al. Endogenously regulated Dab2 worsens inflammatory injury in experimental autoimmune encephalomyelitis. Acta Neuropathol Commun. 2014 Jan 27;2(1).

238. Yi S, Chang R, Hu J, Qiu Y, Wang Q, Cao Q, et al. Disabled-2 (DAB2) overexpression inhibits monocyte-derived dendritic cells' function in vogt-koyanagi-harada disease. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2018 Sep 1;59(11):4662–9.

239. Pytel V, Matías-Guiu JA, Torre-Fuentes L, Montero-Escribano P, Maietta P, Botet J, et al. Exonic variants of genes related to the vitamin D signaling pathway in the families of familial multiple sclerosis using whole-exome next generation sequencing. Brain Behav. 2019 Apr 1;9(4).

240. Hansmann F, Zhang N, Herder V, Leitzen E, Baumgärtner W. Delayed astrogliosis associated with reduced M1 microglia activation in matrix metalloproteinase 12 knockout mice during theiler's murine encephalomyelitis. Int J Mol Sci. 2019 Apr 1;20(7).

241. Mohammadhosayni M, Khosrojerdi A, Lorian K, Aslani S, Imani D, Razi B, et al. Matrix metalloproteinases (MMPs) family gene polymorphisms and the risk of multiple sclerosis: Systematic review and meta-analysis. Vol. 20, BMC Neurology. BioMed Central Ltd.; 2020.

242. Castellazzi M, Ligi D, Contaldi E, Quartana D, Fonderico M, Borgatti L, et al. Multiplex matrix metalloproteinases analysis in the cerebrospinal fluid reveals potential specific patterns in multiple sclerosis patients. Front Neurol. 2018;9.

243. Horjus J, van Mourik-Banda T, Heerings MAP, Hakobjan M, De Witte W, Heersema DJ, et al. Whole Exome Sequencing in Multi-Incident Families Identifies Novel Candidate Genes for Multiple Sclerosis. Int J Mol Sci. 2022 Oct 1;23(19).

244. Mohan H, Krumbholz M, Sharma R, Eisele S, Junker A, Sixt M, et al. Extracellular matrix in multiple sclerosis lesions: Fibrillar collagens, biglycan and decorin are upregulated and associated with infiltrating immune cells. Brain Pathology. 2010 Sep;20(5):966–75.

245. Stephenson EL, Jain RW, Ghorbani S, Gorter RP, D'Mello C, Yong VW. Uncovering Novel Extracellular Matrix Transcriptome Alterations in Lesions of Multiple Sclerosis. Int J Mol Sci. 2024 Jan 1;25(2).

246. Zhang YZ, Ni Y, Gao YN, Shen DD, He L, Yin D, et al. Anti-IgLON5 disease: a novel topic beyond neuroimmunology. Vol. 18, Neural Regeneration Research. Wolters Kluwer Medknow Publications; 2023. p. 1017–22.

247. Bustamante MF, Morcillo-Suárez C, Malhotra S, Rio J, Leyva L, Fernández O, et al. Pharmacogenomic study in patients with multiple sclerosis Responders and nonresponders to IFN-β. Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm. 2015 Oct 1;2(5):e154.

248. Martínez-Aguilar L, Pérez-Ramírez C, Maldonado-Montoro M del M, Carrasco-Campos MI, Membrive-Jiménez C, Martínez-Martínez F, et al. Effect of genetic polymorphisms on therapeutic response in multiple sclerosis relapsing-remitting patients treated with interferon-beta. Vol. 785, Mutation Research - Reviews in Mutation Research. Elsevier B.V.; 2020.

249. Timirci-Kahraman O, Karaaslan Z, Tuzun E, Kurtuncu M, Baykal AT, Gunduz T, et al. Identification of candidate biomarkers in converting and non-converting clinically isolated syndrome by proteomics analysis of cerebrospinal fluid. Acta Neurol Belg. 2019 Mar 12;119(1):101–11.

250. Tang S, Su B, Tao T, Yan W, Zhang R, Qin X, et al. RGMa regulates CCL5 expression via the BMP receptor in experimental autoimmune encephalomyelitis mice and endothelial cells. Mol Med Rep. 2022 Mar 1;25(3).

251. Nohra R, Beyeen AD, Guo JP, Khademi M, Sundqvist E, Hedreul MT, et al. RGMA and IL21R show association with experimental inflammation and multiple sclerosis. Genes Immun. 2010;11(4):279–93.

252. Malekzadeh A, Leurs C, van Wieringen W, Steenwijk MD, Schoonheim MM, Amann M, et al. Plasma proteome in multiple sclerosis disease progression. Ann Clin Transl Neurol. 2019 Sep 1;6(9):1582–94.

253. Mari ER, Rasouli J, Ciric B, Moore JN, Conejo-Garcia JR, Rajasagi N, et al. Galectin-1 is essential for the induction of MOG35–55-based intravenous tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis. Eur J Immunol. 2016 Jul 1;46(7):1783–96.

254. Mangano K, Petralia MC, Bella R, Pennisi M, Muñoz-Valle JF, Hernández-Bello J, et al. Transcriptional upregulation of galectin-3 in multiple sclerosis. Immunol Res. 2023 Dec 1;71(6):950–8.

255. Wasseff SK, Scherer SS. Activated immune response in an inherited leukodystrophy disease caused by the loss of oligodendrocyte gap junctions. Neurobiol Dis. 2015 Oct 1;82:86–98.

256. Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa KA. Oligodendrocyte Gap Junction Loss and Disconnection From Reactive Astrocytes in Multiple Sclerosis Gray Matter [Internet]. 2014. Available from: https://academic.oup.com/jnen/article/73/9/865/2917698

257. Masaki K. Early disruption of glial communication via connexin gap junction in multiple sclerosis, Baló's disease and neuromyelitis optica. Neuropathology. 2015 Oct 1;35(5):469–80.

258. Fröhlich D, Mendes MI, Kueh AJ, Bongers A, Herold MJ, Salomons GS, et al. A Hypomorphic Dars1D367Y Model Recapitulates Key Aspects of the Leukodystrophy HBSL. Front Cell Neurosci. 2021 Jan 20;14.

259. Wolf NI, Toro C, Kister I, Latif KA, Leventer R, Pizzino A, et al. DARS-associated leukoencephalopathy can mimic a steroid-responsive neuroinflammatory disorder. 2014.

260. Ara J, See J, Mamontov P, Hahn A, Bannerman P, Pleasure D, et al. Bone morphogenetic proteins 4, 6, and 7 are up-regulated in mouse spinal cord during experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neurosci Res. 2008 Jan;86(1):125–35.

261. Morleo M, Venditti R, Theodorou E, Briere LC, Rosello M, Tirozzi A, et al. De novo missense variants in phosphatidylinositol kinase PIP5KIγ underlie a neurodevelopmental syndrome associated with altered phosphoinositide signaling. Am J Hum Genet. 2023 Aug 3;110(8):1377–93.

262. Gruber RC, Larocca D, Minchenberg SB, Christophi GP, Hudson CA, Ray AK, et al. The control of reactive oxygen species production by SHP-1 in oligodendrocytes. Glia. 2015 Oct 1;63(10):1753–71.

263. Kumagai C, Kalman B, Middleton FA, Vyshkina T, Massa PT. Increased promoter methylation of the immune regulatory gene SHP-1 in leukocytes of multiple sclerosis subjects. J Neuroimmunol. 2012 May 15;246(1–2):51–7.

264. Christophi GP, Panos M, Hudson CA, Christophi RL, Gruber RC, Mersich AT, et al. Macrophages of multiple sclerosis patients display deficient SHP-1 expression and enhanced inflammatory phenotype. Laboratory Investigation. 2009 Jul;89(7):742–59.

265. Gregorio I, Russo L, Torretta E, Barbacini P, Contarini G, Pacinelli G, et al. GBA1 inactivation in oligodendrocytes affects myelination and induces neurodegenerative hallmarks and lipid dyshomeostasis in mice. Mol Neurodegener. 2024 Dec 1;19(1).

266. Wang C, Zhang CJ, Martin BN, Bulek K, Kang Z, Zhao J, et al. IL-17 induced NOTCH1 activation in oligodendrocyte progenitor cells enhances proliferation and inflammatory gene expression. Nat Commun. 2017 May 31;8.

267. Yigit S, Karakus N, Kurt SG, Ates O. Association of missense mutations of mediterranean fever (mefv) gene with multiple sclerosis in turkish population. Journal of Molecular Neuroscience. 2013 Jun;50(2):275–9.

268. Sharma S, Yang J, Watzinger P, Kötter P, Entian KD. Yeast Nop2 and Rcm1 methylate C2870 and C2278 of the 25S rRNA, respectively. Nucleic Acids Res. 2013 Oct;41(19):9062–76.

269. Janin M, Ortiz-Barahona V, de Moura MC, Martínez-Cardús A, Llinàs-Arias P, Soler M, et al. Epigenetic loss of RNA-methyltransferase NSUN5 in glioma targets ribosomes to drive a stress adaptive translational program. Acta Neuropathol. 2019 Dec 1;138(6):1053–74.

270. Yuan Z, Chen P, Zhang T, Shen B, Chen L. Agenesis and hypomyelination of corpus callosum in mice lacking nsun5, an rna methyltransferase. Cells. 2019 Jun 1;8(6).

271. Paramasivam A, Meena AK, Venkatapathi C, Pitceathly RDS, Thangaraj K. Novel Biallelic NSUN3 Variants Cause Early-Onset Mitochondrial Encephalomyopathy and Seizures. 2031; Available from: http://frodo.wi.mit.edu

272. Zhang T, Chen P, Li W, Sha S, Wang Y, Yuan Z, et al. Cognitive deficits in mice lacking Nsun5, a cytosine-5 RNA methyltransferase, with impairment of oligodendrocyte precursor cells. Glia. 2019 Apr 1;67(4):688–702.

273. Leibowitz SM, Yan J. NF-κB pathways in the pathogenesis of multiple sclerosis and the therapeutic implications. Vol. 9, Frontiers in Molecular Neuroscience. Frontiers Media S.A.; 2016.

274. Jean-Charles PY, Zhang L, Wu JH, Han SO, Brian L, Freedman NJ, et al. Ubiquitin-specific protease 20 regulates the reciprocal functions of β-Arrestin2 in toll-like receptor 4-promoted nuclear factor kB (NFkB) activation. Journal of Biological Chemistry. 2016 Apr 1;291(14):7450–64.

275. Suntharalingham JP, Ishida M, Del Valle I, Stalman SE, Solanky N, Wakeling E, et al. Emerging phenotypes linked to variants in SAMD9 and MIRAGE syndrome. Front Endocrinol (Lausanne). 2022 Aug 18;13.

276. Narumi S, Amano N, Ishii T, Katsumata N, Muroya K, Adachi M, et al. SAMD9 mutations cause a novel multisystem disorder, MIRAGE syndrome, and are associated with loss of chromosome 7. Nat Genet. 2016 Jul 1;48(7):792–7.

277. Viaene AN, Harding BN. The neuropathology of Mirage syndrome. J Neuropathol Exp Neurol. 2020 Apr 1;79(4):458–62.

278. Coban-Akdemir Z, White JJ, Song X, Jhangiani SN, Fatih JM, Gambin T, et al. Identifying Genes Whose Mutant Transcripts Cause Dominant Disease Traits by Potential Gain-of-Function Alleles. Am J Hum Genet. 2018 Aug 2;103(2):171–87.

279. Cohn AC, Toomes C, Potter C, Towns K V., Hewitt AW, Inglehearn CF, et al. Autosomal Dominant Optic Atrophy: Penetrance and Expressivity in Patients With OPA1 Mutations. Am J Ophthalmol. 2007;143(4).

280. Yu-Wai-Man P, Griffiths PG, Gorman GS, Lourenco CM, Wright AF, Auer-Grumbach M, et al. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. Brain. 2010 Mar;133(3):771–86.

281. Manners DN, Rizzo G, La Morgia C, Tonon C, Testa C, Barboni P, et al. Diffusion tensor imaging mapping of brain white matter pathology in mitochondrial optic neuropathies. American Journal of Neuroradiology. 2015 Jul 1;36(7):1259–65.

282. Rocca MA, Bianchi-Marzoli S, Messina R, Cascavilla ML, Zeviani M, Lamperti C, et al. Distributed abnormalities of brain white matter architecture in patients with dominant optic atrophy and OPA1 mutations. J Neurol. 2015 May 26;262(5):1216–27.

283. Patel KR, Karaa A, Mateen FJ. Relapsing remitting multiple sclerosis in progressive external ophthalmoplegia: A report of two cases. Multiple Sclerosis Journal. 2019 May 1;25(6):879–82.

284. Yu-Wai-Man P, Spyropoulos A, Duncan HJ, Guadagno J V., Chinnery PF. A multiple sclerosis-like disorder in patients with OPA1 mutations. Ann Clin Transl Neurol. 2016 Sep 1;3(9):723–9.

285. Grishkovskaya XI, Paumann-Page M, Tscheliessnig R, Stampler J, Hofbauer XS, Soudi M, et al. Structure of human promyeloperoxidase (proMPO) and the role of the propeptide in processing and maturation. Journal of Biological Chemistry. 2017 May 19;292(20):8244–61.

286. Kanayama' HO, Tamura' T, Uga13 S, Kagawa I S, Tanahashi' N, Yoshimura' T, et al. Demonstration that a human 26s proteolytic complex consists of a proteasome and multiple associated protein components and hydrolyzes ATP and ubiquitin-ligated proteins by closely linked mechanisms. Vol. 206, Eur. J. Biochem. 1992.

287. Aharoni S, Proskorovski-Ohayon R, Krishnan RK, Yogev Y, Wormser O, Hadar N, et al. PSMC1 variant causes a novel neurological syndrome. Clin Genet. 2022 Oct 1;102(4):324–32.

288. Stolz JR, Foote KM, Veenstra-Knol HE, Pfundt R, ten Broeke SW, de Leeuw N, et al. Clustered mutations in the GRIK2 kainate receptor subunit gene underlie diverse neurodevelopmental disorders. Am J Hum Genet. 2021 Sep 2;108(9):1692–709.

289. Friedman J, Hyland K, Blau N, Maccollin M. Dopa-responsive hypersomnia and mixed movement disorder due to sepiapterin reductase deficiency [Internet]. 2006. Available from: www.neurology.org

290. Wu R, Chen WT, Dou WK, Zhou HM, Shi M. Whole-exome sequencing in a cohort of Chinese patients with isolated cervical dystonia. Heliyon. 2024 Jun 15;10(11).

291. Yao Z, Kanno Y, Kerenyi M, Stephens G, Durant L, Watford WT, et al. Nonredundant roles for Stat5a/b in directly regulating Foxp3. 2007;

292. Figley MD, DiAntonio A. The SARM1 axon degeneration pathway: control of the NAD+ metabolome regulates axon survival in health and disease. Vol. 63, Current Opinion in Neurobiology. Elsevier Ltd; 2020. p. 59–66.

293. Krauss R, Bosanac T, Devraj R, Engber T, Hughes RO. Axons Matter: The Promise of Treating Neurodegenerative Disorders by Targeting SARM1-Mediated Axonal Degeneration. Vol. 41, Trends in Pharmacological Sciences. Elsevier Ltd; 2020. p. 281–93.

294. Scazzone C, Agnello L, Bivona G, Lo Sasso B, Ciaccio M. Vitamin D and Genetic Susceptibility to Multiple Sclerosis. Vol. 59, Biochemical Genetics. Springer; 2021.

295. Uhlenberg B, Schuelke M, Rüschendorf F, Ruf N, Kaindl AM, Henneke M, et al. Mutations in the Gene Encoding Gap Junction Protein a12 (Connexin 46.6) Cause Pelizaeus-Merzbacher-Like Disease. Vol. 75, Am. J. Hum. Genet. 2004.

296. Abrams CK, Scherer SS, Flores-Obando R, Freidin MM, Wong S, Lamantea E, et al. A new mutation in GJC2 associated with subclinical leukodystrophy. J Neurol. 2014 Jan 1;261(10):1929–38.