

Univerzita Karlova

1. lékařská fakulta

Studijní program: Neurovědy



UNIVERZITA KARLOVA
1. lékařská fakulta

MUDr. Pavlína Kleinová

Roztroušená skleróza mozkomíšní: korelace genové exprese a odpovědi na
imunomodulační léčbu

Multiple sclerosis: correlation of gene expression and response to immunomodulatory
therapy

Disertační práce

Školitelka: prof. MUDr. Eva Kubala Havrdová, CSc.

Praha, 2023

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem řádně uvedla a citovala všechny použité prameny a literaturu. Současně prohlašuji, že práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu

Souhlasím s trvalým uložením elektronické verze mé práce v databázi systému meziuniverzitního projektu Theses.cz za účelem soustavné kontroly podobnosti kvalifikačních prací.

V Praze, 24. 3. 2023

Pavλίna Kleinová

Podpis

Identifikační záznam:

KLEINOVÁ, Pavlína. *Roztroušená skleróza mozkomíšní: korelace genové exprese a odpovědi na imunomodulační léčbu [Multiple sclerosis: correlation of gene expression and response to immunomodulatory therapy]*. Praha, 2023. 107 s., 3 přílohy.

Disertační práce. 1. lékařská fakulta Univerzity Karlovy v Praze. Vedoucí práce Eva Kubala Havrdová.

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala svojí školitelce prof. MUDr. Evě Kubala Havrdové, CSc. za odborné vedení a neutuchající a inspirativní snahu docílit pokroku v poznání i péči o pacienty.

Poděkovat bych chtěla i všem spoluautorům a spolupracovníkům ve studiích, zejména prof. MUDr. Pavlu Martáskovi, DrSc. a Aleně Puchmajerové z Kliniky pediatrie a dědičných poruch metabolismu 1. LF UK, za spolehlivou a přátelskou spolupráci. Dále moje poděkování patří celému kolektivu Centra pro demyelinizační onemocnění Všeobecné fakultní nemocnice v Praze za spolupráci a zápal pro věc, se kterým přistupují k léčbě pacientů i rozvoji výzkumných projektů. Pacientům centra patří můj dík za ochotu nezištně se účastnit výzkumných projektů a důvěru, kterou tím projevují. A v neposlední řadě děkuji svojí rodině za lásku, trpělivost a podporu.

Abstrakt

Roztroušená skleróza je chronické autoimunitní onemocnění centrální nervové soustavy s genetickou komponentou, které je ovlivnitelné imunomodulační léčbou. Předpokládá se vliv genetických faktorů na průběh onemocnění a léčebnou odpověď. Disertační práce prezentuje výsledky dvou studií zkoumajících genetické pozadí roztroušené sklerózy.

V první studii byl u osob s roztroušenou sklerózou zkoumán vliv $(GT)_n$ polymorfismu promotoru genu HMOX1 pro hem-oxygenázu 1 ovlivňujícího její expresi. Nebyl pozorován vliv zkoumaného polymorfismu na průběh onemocnění. Potvrdili jsme vliv imunomodulační léčby na oddálení progresu onemocnění.

Druhá studie nazvaná Genotype/Phenotype Project je multicentrická mezinárodní celogenomová asociační studie, jejímž cílem bylo odhalit bodové polymorfismy asociované s tíží průběhu roztroušené sklerózy. Bylo prokázáno, že běžné genetické varianty se střední až velkou velikostí účinku nepřispívají k závažnosti roztroušené sklerózy. Bylo demonstrováno, že strojové učení využívající společné klastry bodových polymorfismů spolu s klinickými proměnnými, které jsou snadno dostupné v době diagnózy, může zlepšit prognostické schopnosti v době diagnózy a po další validaci má potenciál najít využití v klinické praxi.

Klíčová slova: roztroušená skleróza, genetika, hem-oxygenáza 1, celogenomová asociační studie, strojové učení

Abstract

Multiple sclerosis is a chronic autoimmune disease of the central nervous system with a genetic component, modifiable with immunomodulatory therapy. It is assumed that genetic factors influence the course of the disease and the therapeutic response. The thesis presents the results of two studies investigating the genetic background of multiple sclerosis.

In the first study, the influence of the (GT)_n polymorphism of the promoter of the HMOX1 gene for heme oxygenase 1 affecting its expression was investigated in people with multiple sclerosis. No effect of this polymorphism on the course of the disease was observed. We confirmed the effect of immunomodulatory therapy on delaying disease progression.

The second study, called the Genotype/Phenotype Project, is a multicentre international genome-wide association study aimed at detecting single nucleotide polymorphisms associated with severity of multiple sclerosis. It has been shown that common genetic variants with medium to large effect sizes do not contribute to the severity of multiple sclerosis. It has been demonstrated that machine learning using common clusters of single nucleotide polymorphisms together with clinical variables that are readily available at the time of diagnosis can improve prognostic ability at the time of diagnosis and, with further validation, has the potential to find use in clinical practice.

Keywords: multiple sclerosis, genetics, heme oxygenase 1, genome-wide association study, machine learning

Seznam zkratk

AAO	věk počátku RS (age at onset)
aHR	adjustovaný poměr rizik
ARMSS	Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score
ARR	roční výskyt relapsů (annual relapse rate)
AUC	plocha pod křivkou (Area Under Curve)
CD	diferenciační skupina (cluster of differentiation)
CIS	klinicky izolovaný syndrom (clinically isolated syndrome)
CNS	centrální nervová soustava
CNV	copy number variants
DMDs	léky modifikující průběh onemocnění (disease-modifying drugs)
EAE	experimentální alergická encefalitida
EBV	virus Epstein-Barrové
EDSS	Expanded Disability Status Scale
GM-CSF	faktor stimulující kolonie granulocytů a makrofágů (granulocytes and monocytes colony stimulating factor)
GWAS	celogenomová asociační studie (genome-wide association study)
h ² p	dědivost v úzkém smyslu (heritabilita)
HET	vysoce účinná terapie (high efficacy treatment)
HLA	Hlavní histokompatibilní systém (Human Leucocyte Antigens)
HO-1	hem-oxygenáza 1
HR	poměr rizik (hazard ratio)
CHOPN	chronická obstrukční plicní nemoc
IBD	idiopatická zánětlivá střevní onemocnění
IL	interleukin
IM	infekční mononukleóza
IQR	mezikvartilové rozpětí (interquartile range)
irEDSS3	ireverzibilní EDSS 3
irEDSS6	ireverzibilní EDSS 6
I-MSSS	longitudinální MSSS
MAF	frekvence menší alely (minor allele frequency)
MBP	myelinový bazický protein

ML	strojové učení (machine learning)
MOG	myelinový oligodendrocytární glykoprotein
MR	magnetická rezonance
MSSS	Multiple Sclerosis Severity Score
NEDA	no evidence of disease activity
NPV	negativní prediktivní hodnota
OCB	oligoklonální pásy (oligoclonal bands)
OR	poměr šancí (odds ratio)
PC	hlavní komponenta (principal component)
PLP	proteolipidový protein
PP RS	primárně progresivní roztroušená skleróza
PPV	pozitivní prediktivní hodnota
RIS	radiologicky izolovaný syndrom
ROC	Receiver Operator Characteristics
RR RS	relaps remitentní roztroušená skleróza
RS	roztroušená skleróza
SD	standardní odchylka (standard deviation)
SNPs	jednonukleotidové polymorfismy
sNfL	lehké řetězce neurofilament
SNV, SNVs	jednonukleotidová varianta, jednonukleotidové varianty
SP RS	sekundárně progresivní roztroušená skleróza
wGRS	vážené genetické skóre rizika (weighted genetic risk score)

Obsah

1. Úvod.....	12
1.1 Roztroušená skleróza – definice a epidemiologie	12
1.2 Rizikové faktory roztroušené sklerózy	13
1.3 Patofyziologie RS	14
1.4 Formy a diagnóza RS	17
1.5 Léčba roztroušené sklerózy, monitorace a prognóza léčebné odpovědi	18
1.6 Genetika roztroušené sklerózy	21
1.7 Farmakogenomika roztroušené sklerózy.....	23
2. Cíle a hypotézy	29
2.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1	29
2.2 Studie II: Genotype/Phenotype project.....	29
3. Metodika	30
3.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1	30
3.1.1 Výzkumný soubor	30
3.1.2 Design studie	31
3.1.3 Genetická analýza	31
3.1.4 Statistická analýza.....	32
3.2 Studie II: Phenotype/Genotype Project.....	32
3.2.1 Výzkumný soubor	32
3.2.2 Kritéria vstupu do studie.....	32
3.2.3 Fenotypizace, přisouzení tíže RS a nábor.....	33
3.2.4 Statistické analýzy.....	34
3.2.5 Genotypizace, imputace a kontrola kvality.....	35
3.2.6 Asociační testování	40
3.2.7 Analýzy přežití.....	40

3.2.8 Analýza dědivosti	41
3.2.9 Analýzy obohacení genových sad	41
3.2.10 Strojové učení	41
4. Výsledky	43
4.1 Studie I – Hem-oxygenáza 1	43
4.2 Studie 2 – Phenotype/Genotype Project	45
4.2.1 Výzkumný soubor	45
4.2.2 Primární analýzy	50
4.2.2.1 Celogenomové vyhledávání asociací SNVs spojených s longitudinálními mírami tíže RS	50
4.2.2.2 Analýzy dědivosti	53
4.2.2.3 Strojové učení	53
4.2.2.4 Predikce klinického průběhu pomocí strojového učení	54
4.2.3 Sekundární analýzy	55
4.2.3.1 Celogenomové vyhledávání asociací a SNV longitudinálních měř závažnosti stratifikované podle pohlaví	55
4.2.3.2 Analýzy obohacení genových sad	56
4.2.3.3 Analýzy přežití	56
4.2.3.4 Validace dříve publikovaných předpokládaných SNV závažnosti RS	61
4.2.3.5 Asociace alel náchylnosti k RS s fenotypy závažnosti RS	61
5. Diskuze	63
5.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1	63
5.2 Studie II: Phenotype/Genotype Project	65
6. Zhodnocení cílů a hypotéz	70
6.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1	70
6.2 Studie II: Phenotype/Genotype Project	70

7. Souhrn.....	71
8. Summary	72
9. Literatura:	73
10. Seznam publikací.....	106
10.1 Seznam publikací <i>in extenso</i> , které jsou podkladem disertační práce.....	106
10.2 Seznam publikací <i>in extenso</i> , které nejsou podkladem disertační práce.....	106
10.3 Seznam publikací v recenzovaných neimpaktovaných periodikách <i>in extenso</i> , které nejsou podkladem disertační práce	107
10.4 Další publikace - části knih.....	107

1. Úvod

1.1 Roztroušená skleróza – definice a epidemiologie

Roztroušená skleróza (RS) je chronické autoimunitní demyelinizační onemocnění centrální nervové soustavy (CNS) (Attfield, K.E. et al., 2022), které celosvětově postihuje přibližně 2,8 miliónu lidí. Prevalence RS se pohybuje od 4,79/100 000 v Oceánii po 142,81/100 000 v Evropě a 350/100 000 v Kanadě a od roku 2013 do roku 2020 se zvýšila o 30%. Dvě třetiny osob s RS tvoří ženy a průměrný věk stanovení diagnózy je 32 let (Walton, C. et al., 2020).

Očekávaná doba dožití v době diagnózy se pohybuje mezi 30 a 35 lety (Walz, L. et al., 2022) a RS tedy zkracuje život o 6-14 let (Kingwell, E. et al., 2019). RS vede k významnému neurologickému postižení: neléčení pacienti jsou po necelých 9 letech významně omezeni v chůzi a po 18,5 letech vyžadují při chůzi oporu; léčba tyto milníky oddaluje v průměru o 3,51, resp. 3,09 let (Lublin, F.D. et al., 2022). Kromě postižení chůze danému nejčastěji spastickou paraparézou nebo ataxií cerebellární či sensorickou se RS projevuje zrakovým postižením (optickou neuritidou, okohybnými poruchami, poruchami zorného pole), sensitivními příznaky (paresteziemi, hypesteziemi, dysesteziemi, neuralgiemi), poruchou koordinace pohybů a rovnováhy, poruchami výslovnosti a polykání, kognitivní dysfunkcí (zpomalení zpracování informací a verbální fluence, poruchou koncentrace, exekutivních funkcí, paměti), únavou, poruchami spánku, depresí a poruchami sfinkterových funkcí (inkontinence a retence močová, zácpa, inkontinence stolice, sexuální dysfunkce) (McGinley, M.P. et al., 2021, Motyl, J. et al., 2021). Kromě přímých zdravotních dopadů, které významně snižují kvalitu života pacientů (Kidd, T. et al., 2017), s sebou onemocnění RS nese mnoho dopadů socioekonomických. Mezi ně patří přímé zdravotnické náklady, ztráta práceschopnosti a náklady na péči o osoby s postižením včetně ztráty výdělku pečujících osob (Havrdova, E. et al., 2017, Paz-Zulueta, M. et al., 2020).

Neurologické manifestaci RS pravděpodobně předchází 5-10 let dlouhá prodromální fáze, kdy pacienti zvýšeně vyhledávají zdravotní péči pro poruchy nálady, kožní a urologické obtíže, únavu, a jejich reprodukce je snížena (Amato, M.P. et al., 2022, Wijnands, J.M.A. et al., 2017). Část zdravých osob má při vyšetření mozku magnetickou rezonancí patré změny typické pro RS (Okuda, D.T. et al., 2009). Tento stav označujeme pojmem radiologicky izolovaný syndrom (RIS). Osoby s RIS mají 51% riziko rozvoje RS v následujících 10 letech (Lebrun-Frenay, C. et al., 2020).

1.2 Rizikové faktory roztroušené sklerózy

Díky epidemiologickým studiím se podařilo identifikovat řadu rizikových faktorů, které ovlivňují vznik a průběh RS. Role genetických faktorů v rozvoji RS je pojednána v samostatné kapitole. Významnou roli hrají i faktory prostředí. Z hlediska léčby a prevence jsou zajímavé zejména ovlivnitelné faktory. Nejpodrobněji jsou prozkoumány infekce virem Epstein-Barrové (EBV), kouření a obezita. Nejsilnějším z nich se ukazuje být infekce EBV – RNA virem, který perzistuje v B lymfocytech, způsobuje infekční mononukleózu (IM) a je spojený s výskytem lymfoproliferativních onemocnění, např. s Burkittovým lymfomem. Je známo, že IM zvyšuje riziko RS přibližně dvakrát (Nielsen, T.R. et al., 2007) a seropozitivita antiEBNA1 3,6krát (Alfredsson, L. a Olsson, T., 2019). Vyšší riziko RS je spojené s infekcí v dospívání a později, nikoliv s infekcí v dětství (Ascherio, A. a Munger, K.L., 2015). Longitudinální studie provedená na amerických vojácích, kterým jsou pravidelně odebrány a skladovány vzorky séra, prokázala, že po serokonverzi EBV stoupá riziko RS 32krát. U vojáků, kteří vyvinuli RS, došlo k vzestupu lehkých řetězců neurofilament (sNfL; markeru axonálního poškození) v séru až po serokonverzi (Bjornevik, K. et al., 2022). To svědčí pro kauzální vztah mezi EBV infekcí a RS.

Mechanismus, jakým infekce virem EBV vede k rozvoji RS, naznačil další projekt, který demonstroval v séru a mozkomíšním moku pacientů s RS přítomnost protilátek, které zkříženě reagují proti EBV antigenu EBNA1 i proteinu GlialCAM, adhezivní molekule vyskytující se na povrchu gliových buněk. Molekulární mimikry jsou potencovány posttranslačními úpravami GlialCAM (Lanz, T.V. et al., 2022).

Na základě těchto zjištění je diskutována možnost prevence RS očkováním proti EBV. Vakcína proti EBV prochází fází II klinického hodnocení s cílem zhodnotit její schopnost předcházet infekci EBV a IM a její účinnost v prevenci RS t.č. není známa (Maple, P.A. et al., 2022).

Dalším rizikovým faktorem rozvoje RS je kouření. Aktivní kuřáci mají přibližně 1,6násobně vyšší šanci RS ve srovnání s nekuřáky, přičemž efekt je závislý na dávce (Hedstrom, A.K. et al., 2013). Pasivní kouření je jen o málo méně rizikové (OR 1,3) (Oturai, D.B. et al., 2021). Kouření v závislosti na dávce také zhoršuje průběh RS (Manouchehrinia, A. et al., 2013) a zvyšuje riziko tvorby neutralizačních protilátek, které brání efektu některých léků, např. natalizumabu (Hedstrom, A.K. et al., 2014a) nebo interferonu beta (Hedstrom, A.K. et al., 2014b). Odhaduje se, že 13% případů RS by bylo možné předejít vyvarováním se kouření (Manouchehrinia, A. et al., 2022).

Rizikovým faktorem rozvoje RS je i obezita, a to v dětském a adolescentním věku (HR 1,5) (Chitnis, T. et al., 2016). U pacientů s RS je obezita spojena s tíží postižení (Lutfullin, I. et al., 2022).

Rozvoj autoimunitní reakce zřejmě souvisí i se složením mikrobiomu – nejvíce poznatků máme o mikrobiomu střevním. Jeho složení se liší u osob s RS a zdravých kontrol. Přítomnost mikrobioty je nutná k rozvinutí experimentální alergické encefalitidy (EAE, animálního modelu RS) (Berer, K. et al., 2011) a její průběh je závažnější, je-li pokusným zvířatům transplantován mikrobiom od pacienta s RS ve srovnání s jeho zdravým dvojčetem (Berer, K. et al., 2017). Možnosti ovlivnění složení střevní mikrobioty a uplatnění těchto postupů v léčbě jsou předmětem výzkumu (Parks, N.E. et al., 2020, Preiningerova, J.L. et al., 2022).

Již dlouho je známá závislost výskytu RS na zeměpisné šířce, v jaké pacient s RS strávil dětství (Simpson, S., Jr. et al., 2011). Usuzuje na souvislost s délkou a intenzitou expozice slunečnímu svítu a s nimi související koncentrací vitamínu D v séru (Simpson, S., Jr. et al., 2018). Nízké sérové koncentrace vitamínu D již v dětství a prenatálně jsou asociovány s vyšším rizikem rozvoje RS (Nielsen, N.M. et al., 2017) a s vyšším rizikem relapsu a progresu postižení (Ascherio, A. et al., 2014, Vandebergh, M. et al., 2022). Role vitamínu D a jeho dávkování v léčbě a prevenci RS je předmětem výzkumu, ale vzhledem k jeho bezpečnosti je suplementace doporučována (Lincoln, M.R. et al., 2021).

1.3 Patofyziologie RS

Pro autoimunitní povahu RS svědčí jak výsledky genetických studií, které ukazují např. na významnou roli HLA systému (Human Leukocyte Antigens) (viz kapitola Genetika RS), tak výsledky patologických a imunologických studií (viz níže) a v neposlední řadě i efekt protizánětlivé léčby (viz kapitola Léčba RS, monitorace a prognóza léčebné odpovědi).

Není zcela objasněno, jakým způsoby dochází k prolomení imunitní tolerance vůči komponentám myelinu. Svoji roli pravděpodobně hrají některé infekce (zejména infekce EBV) a další faktory prostředí (viz kapitola Rizikové faktory RS), zejména u geneticky predisponovaných jedinců (Attfield, K.E. et al., 2022). V samotné tvorbě demyelinizačních lézí jsou pak zapojeny mnohé populace přirozené i adaptivní imunity.

Jednu z ústředních rolí v rozvoji RS hrají CD4+ T-lymfocyty, zejména interferon gama produkující T_{H1}-lymfocyty a interleukin 17 (IL-17) produkující T_{H17}-lymfocyty. T_H-lymfocyty jsou schopny aktivovat mikroglia (CNS rezidentní makrofágy) (Huang, Y. et al., 2018), CNS invadující

monocyty a ovlivňují astrocyty. T_{H17} -lymfocyty také narušují integritu hematoencefalické bariéry (Tahmasebinia, F. a Pourgholaminejad, A., 2017). Množství T_{H17} -lymfocytů stoupá v kontextu sníženého počtu regulačních T_{reg} -lymfocytů. Jejich fyziologickou funkcí je i regulace autoreaktivních lymfocytů a urdžení imunitní tolerance a u RS bývá, zejména v časných fázích, jejich počet snížen a funkce změněná (Verma, N.D. et al., 2021).

Hlavní lymfocytární populací v demyelinizačních plakách v CNS jsou $CD8+$ T-lymfocyty (Babbe, H. et al., 2000, Tzartos, J.S. et al., 2008). Vykazují známky aktivace a tvoří prozánětlivé cytokiny, včetně IL-17 (Tzartos, J.S. et al., 2008), a jsou schopny přerušit axony (Medana, I. et al., 2001). Jsou také schopny cytotoxické aktivity vůči $CD4+$ T-lymfocytům pomocí perforinu, což mají společné s NK buňkami (Saligrama, N. et al., 2019), ovšem jejich fyziologické regulační funkce jsou během vzplanutí aktivity RS defektní (Baughman, E.J. et al., 2011).

Role B-lymfocytů byla v patogenezi RS dlouho podceňována, ale efekt léčby cílené proti povrchovému znaku B-lymfocytů CD20 (Florou, D. et al., 2020) ukazuje, že hrají podstatnou roli. Nacházejí se v mozковém parenchymu, demyelinizačních lézích i meningeálních lymfocytárních infiltrátech. Jsou producenty protilátek proti antigenu viru Epstein-Barrové EBNA1, které zkříženě reagují s gliálním adhezivním proteinem GlialCAM (Lanz, T.V. et al., 2022). Jimi produkovány cytokiny jsou *in vitro* cytotoxické pro oligodendrocyty a neurony (Lisak, R.P. et al., 2017).

U pacientů s RS byly nalezeny subpopulace B i T-lymfocytů antigenně specifické pro komponenty myelinové pochvy, např. myelinový bazický protein MBP, myelinový oligodendrocytární glykoprotein MOG nebo proteolipidový protein PLP. U různých pacientů byly nalezeny různé kombinace antigenně specifických imunitních odpovědí a jejich role v patogenezi není jasná (Cruciani, C. et al., 2021).

Role buněk přirozené imunity je prozkoumána méně. Diskutuje se o možném protektivním působení NK buněk, které mohou způsobovat apoptózu T-lymfocytů (Gross, C.C. et al., 2016b) a jejich počty stoupají u pacientů léčených přinejmenším některými DMDs (Gross, C.C. et al., 2016a). Monocyty jsou pravděpodobně účastny již raných fází rozvoje RS (Akaishi, T. et al., 2018). Po diferenciaci na fagocytující makrofágy nebo dendritické buňky odvozené z monocytů mohou prezentovat antigeny T-lymfocytům a uvolňovat zánětlivé cytokiny a kyslíkové radikály (Locatelli, G. et al., 2018). Podílí se na rekrutování NK buněk a $CD4+$ T-lymfocytů (Giladi, A. et al., 2020). Autoreaktivní T-lymfocyty obdobně působí na monocyty prostřednictvím růstového faktoru GM-CSF (granulocytes and monocytes colony stimulating factor) (King, I.L. et al., 2009).

Mikroglie hraje klíčovou úlohu v udržení tkáňové homeostázy a rozvoji zánětu. Je schopna produkce zánětlivých cytokinů, kyslíkových radikálů a oxidu dusného, ale i růstových faktorů podporujících remyelinizaci a její role se pravděpodobně v čase mění (Prinz, M. et al., 2019). Předmětem výzkumu jsou i další populace přirozené imunity, např. NKT buňky, $\gamma\delta$ T buňky a další. Interakce mezi jednotlivými složkami imunitního systému jsou komplexní, a o to složitější, že mnoho funkcí je sdíleno různými buněčnými populacemi a v různých fázích onemocnění se mohou měnit (Attfield, K.E. et al., 2022).

Na rozvoji zánětu se podílí i intrakraniální mízní systém, který spojuje CNS s hlubokými krčními uzlinami. Jeho existence byla prokázána u lidí na post-mortem mozkové tkáni (Louveau, A. et al., 2015) a MR (Absinta, M. et al., 2017). Tento systém za fyziologických podmínek transportuje solubilní antigeny CNS, což umožňuje navození imunitní tolerance (Sage, P.T. et al., 2018). Během zánětu jsou tyto antigeny přenášeny antigen-prezentujícími buňkami, které ve zvýšené míře prostupují do mozkového parenchymu přes porušenou hematoencefalickou bariéru. V časně fázi RS dochází k prezentaci antigenů CNS převážně dendritickými buňkami (Karni, A. et al., 2006), následuje aktivace mikroglie a apoptóza oligodendrocytů (Prineas, J.W. a Parratt, J.D., 2012). Na odstranění myelin-produkujících oligodendrocytů se účastní aktivované monocyty, CD4+ T-lymfocyty, CD8+ T-lymfocyty a B-lymfocyty, které do parenchymu CNS vstupují přes hematoencefalickou bariéru (Karni, A. et al., 2006). V bílé hmotě i v kortexu tak vznikají akutní demyelinizační léze s typickými perivaskulárními infiltráty viditelné na vyšetření magnetickou rezonancí (MR) (Sinnecker, T. et al., 2016). Již v této fázi mohou být přerušeny axony a zanikat neurony (Trapp, B.D. a Stys, P.K., 2009). Po demyelinizaci může dojít k remyelinizaci nebo se aktivní léze přemění v chronickou demyelinizační lézi, charakterizovanou aktivovanou mikroglíí a makrofágy (Kuhlmann, T. et al., 2017). V pozdním stadiu nemoci rozvlně vznikají meningeální lymfocytární agregáty sousedící s mozkovou kůrou. Svým složením připomínají germinální centra lymfatických uzlin a jejich udržení podporují T_{H17} -lymfocyty a T folikulární helper lymfocyty. Meningeální lymfocytární agregáty poškozují kortikální neurony a podporují neurodegeneraci (Veroni, C. et al., 2018). Chronický zánět a narušení neuronálních sítí vede k poruše neuronálního energetického metabolismu (Friese, M.A. et al., 2014), což má za následek zrychlené stárnutí mozku postiženého RS (Kaufmann, T. et al., 2019) a postupný, na léčbu rezistentní, nárůst postižení (Ontaneda, D. et al., 2017). Na rozvoji RS se tedy podílí složky přirozené i adaptivní imunity a procesy neurodegenerativní jsou přítomné od začátku onemocnění.

V procesu neurodegenerace hraje roli i železo, které se za fyziologických okolností v mozku nachází zejména v myelinu a oligodendrocytech (Hametner, S. et al., 2018). Při jejich poškození je uvolněno a zvyšuje oxidativní stres, způsobuje mitochondriální poškození (Mahad, D.H. et al., 2015) a zvýšeně se hromadí v mikroglia (Dal-Bianco, A. et al., 2017). V metabolismu hemového železa se účatní hem-oxygenázy, které metabolizují hem na dvojmocné železo, oxid uhelnatý a biliverdin. Hem-oxygenáza 1 (HO-1), kódovaná genem HMOX1, je exprimována neurony a glií v rámci odpovědi na oxidativní stres (Gozzelino, R. et al., 2010) a byla prokázána její přítomnost v RS demyelinizačních lézích (Schipper, H.M. et al., 2009). Expres HO-1 je ovlivněna (GT)_n polymorfismem v promotorové oblasti HMOX1. Nejčastěji se vyskytující počet GT repetice v populaci je 23 a 30 (Exner, M. et al., 2004b). Počet GT repetice nižší než 25 je spojen s vyšší expresí HO-1 (Chen, Y.H. et al., 2002). Role HO-1 byla zkoumána u EAE. Liu a spolupracovníci popsali zmírnění EAE po aktivaci HO-1 a zhoršení po inhibici HO-1. (Liu, Y. et al., 2001). Inhibice HO-1 vedla u agresivnějším průběhu EAE i u jiného animálního modelu. Vyšší exprese HO-1 byla spojena s potlačením tvorby volných radikálů a zvýšením koncentrace glutathionu (Chakrabarty, A. et al., 2003). U HO-1 knock-outovaných myší byl pozorován agresivnější průběh EAE s vyšší mírou demyelinizace, paralýzy a úmrtnosti (Chora, A.A. et al., 2007). Další práce popsala zmírnění EAE po aktivaci HO-1 a snížením počtu Th1 a Th17 buněk v CNS (Chen, S.J. et al., 2010). Role HO-1 u lidského onemocnění RS v době provedení naší studie zkoumána nebyla.

1.4 Formy a diagnóza RS

RS probíhá relaps remitentně (RR RS), kdy jsou relapsy neboli ataky střídány obdobími klinické remise, nebo progresivně. Progresivní průběh většinou následuje po relaps remitentní fázi (mluvíme o sekundárně progresivní RS, SP RS). Ovšem 15% pacientů má primárně progresivní formu RS (PP RS), kdy progresse převažuje od počátku. Relaps remitentní i progresivní formy dále dělíme na aktivní a bez klinické aktivity (Lublin, F.D. et al., 2014). Neurologické postižení vzniká jak následkem relapsů (Koch-Henriksen, N. et al., 2021), tak progresse, která je přítomná již od začátku onemocnění (Kappos, L. et al., 2020).

Pro stanovení diagnózy RS je vyžadován průkaz diseminace onemocnění v čase a prostoru, tak jak jej definují revidovaná McDonaldova kritéria diagnózy RS z roku 2017. Je možné využít klinickou aktivitu (ataky s objektivním neurologickým nálezem, případně průkaz léze neurofyziologickými metodami), průkaz lézí v mozku a míše vyšetřením MR a nálezem oligoklonálních páسů (OCB) v mozkomíšním moku. V rozumném rozsahu musí být vyloučeny

alternativní diagnózy (Thompson, A.J. et al., 2018). V případech klinických projevů, kdy chybí průkaz distribuce v čase, hovoříme o klinicky izolovaném syndromu (CIS, clinically isolated syndrome). V případě typického nálezu na MR bez klinických projevů mluvíme o RIS (Lublin, F.D. et al., 2014).

K hodnocení neurologického postižení vzniklého na podkladě RS je nejčastěji používána škála Expanded Disability Status Scale (EDSS). Jde o nelineární škálu, která může nabývat 20 různých hodnot od 0 do 10. Pacient se zcela normálním neurologickým nálezem je hodnocen stupněm 0. Úmrtí v přímém důsledku RS je hodnoceno stupněm 10. Důležitým milníkem je stupeň EDSS 4, který odpovídá schopnosti samostatné chůze bez opory a odpočinku na vzdálenost 500 m. Od tohoto stupně výše je pacient hodnocen převážně podle schopnosti chůze a samoobsluhy (Kurtzke, J.F., 1983).

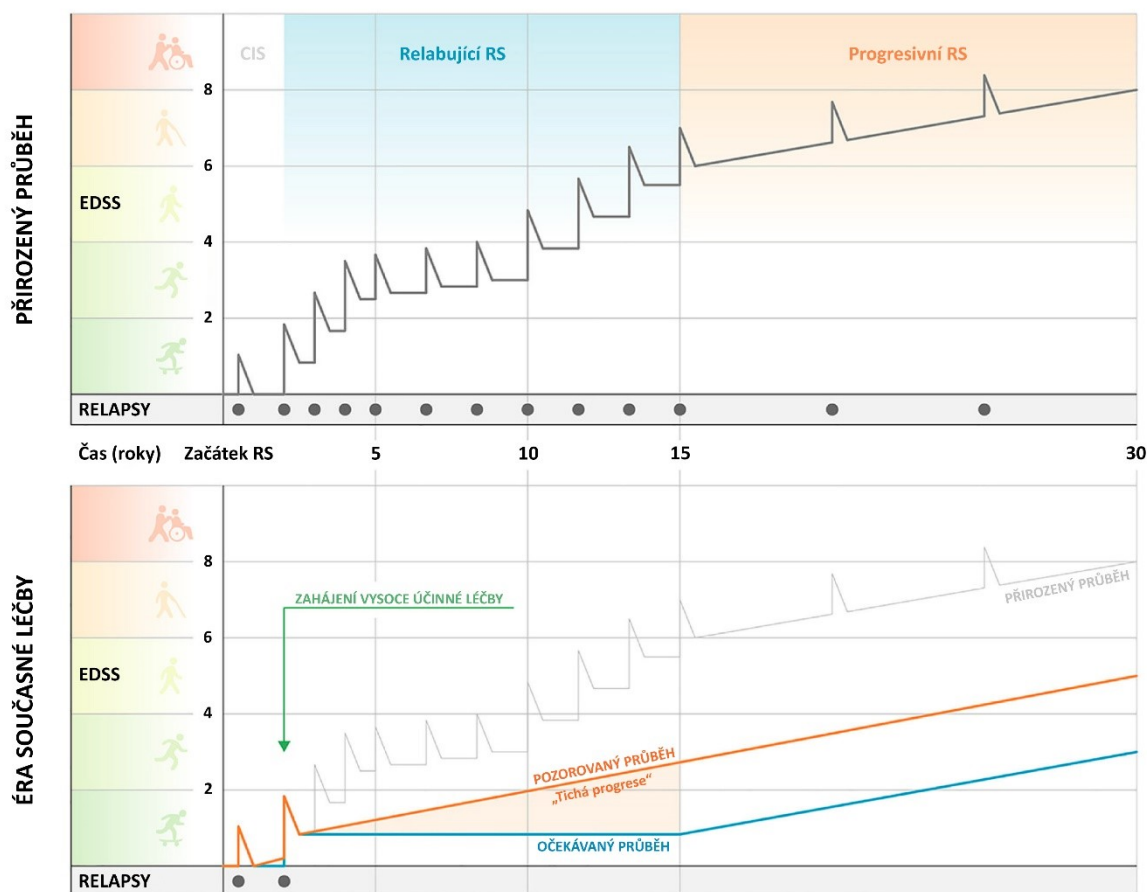
Hodnocení EDSS využívají další škály používané pro výzkumné účely k hodnocení tíže onemocnění. Nejčastěji využívanou škálou je Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (Roxburgh, R.H. et al., 2005), které osoby s RS stratifikuje podle EDSS a délky trvání onemocnění. Škála Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score (ARMSS) zahrnuje EDSS a věk pacienta (Manouchehrinia, A. et al., 2017). Longitudinalní MSSS (l-MSSS) může být pro individuální prognostiku vhodnější než průřezová hodnocení (Hughes, S. et al., 2012).

1.5 Léčba roztroušené sklerózy, monitorace a prognóza léčebné odpovědi

V posledních 30 letech je pozorováno zmírnění průběhu nemoci (*Obrázek 1*). Za hlavní příčiny jsou považovány zavedení imunomodulační léčby, tzv. disease-modifying drugs (DMDs, léky modifikující průběh onemocnění), a zavedení léčby již ve stadiu CIS (Sorensen, P.S. et al., 2020).

Do klinické praxe byly v posledních 30 letech zavedeny DMDs, které prokazatelně oproti placebo snižují roční výskyt relapsů (ARR, annual relapse rate), oddalují progresi postižení a snižují aktivitu na MR (výskyt nových, zvětšených nebo gadoliniem se sytících lézí).

Interferony beta (Calabresi, P.A. et al., 2014a, TIMSS, 1993) a glatiramer acetát (Johnson, K.P. et al., 1998) modulují zánětlivou odpověď a mají dobrý bezpečnostní profil. Teriflunomid zasahuje do syntézy DNA, je spojen s rizikem alopecie, arteriální hypertenze a teratogenicity (O'Connor, P. et al., 2011). Účinnost těchto léků na snížení ARR proti placebo se pohybuje kolem 33%.



Obrázek 1: „Nový“ průběh onemocnění roztroušené sklerózy

V horní části je zobrazen přirozený průběh relaps remitentní RS v době před zavedením imunomodulační léčby. Předpokládalo se, že během relaps remitentní fáze dochází ke vzniku postižení následkem neúplné úzdravy z relapsů, sekundárně progresivní fáze nastala později. „Nový“ průběh RS v současné době imunomodulační léčby je zobrazen v dolní části. S použitím vysoce účinné terapie jsou relapsy u většiny pacientů potlačeny, ale je patrná progresse nezávislá na relapsech („tichá progresse“).

Převzato z Hauser, S.L. a Cree B.A.C.: Treatment of Multiple Sclerosis: A review, Am J Med 2020, 133, 12 (1380-1390) e2 (Hauser, S.L. a Cree, B.A.C., 2020)

Legenda: EDSS, Expanded Disability Status Scale; CIS, klinicky izolovaný syndrom, RS, roztroušená skleróza.

Středně účinné léky snižují ARR proti placebo přibližně o 50%. Patří mezi ně modulátory sfingosin-1-fosfátových receptorů fingolimod (Calabresi, P.A. et al., 2014b, Kappos, L. et al., 2010), ponosimod (Kappos, L. et al., 2021), ozanimod (Cohen, J.A. et al., 2016) a siponimod (Kappos, L. et al., 2018). Ty mohou ovlivnit činnost srdce a mají imunosupresivní efekt s vyšším

výskytem zejména herpetických infekcí a tumorů kůže. Dimetyl fumarát (Fox, R.J. et al., 2012) a diroximel fumarát (Gold, R. et al., 2012) modulují zánětlivou odpověď prostřednictvím nukleárního faktoru kappa B, mají gastrointestinální nežádoucí účinky a způsobují lymfopenii. Kladrinin – prekurzor analogu deoxyadenosinu - způsobuje lymfopenii a částečnou imunitní rekonstituci, také zvyšuje výskyt infekcí (Giovannoni, G. et al., 2010).

Další léky jsou již vysoce účinné s potenciálem snížení ARR přes 60 % oproti placebu, resp. o cca 50% proti aktivnímu komparátoru v případě ocrelizumabu a ofatumumabu. Natalizumab blokuje adhezi leukocytů a tím brání přestupu přes hematoencefalickou bariéru (Polman, C.H. et al., 2006). Vážnou komplikací léčby je potenciálně letální neuroinfekce progresivní multifokální leukoencefalopatie (PML) (Mohn, N. et al., 2022). Ocrelizumab (Montalban, X. et al., 2017) a ofatumumab (Hauser, S.L. et al., 2020) a off-label užívaný rituximab (Svenningsson, A. et al., 2022) se vážou na B-lymfocytární antigen CD20 a způsobují apoptózu B lymfocytů. Léčba je provázena zvýšeným výskytem infekcí. Alemtuzumab působí po vazbě na povrchový antigen CD52 apoptózu několika lymfocytárních populací s následnou repulací a imunitní rekonstitucí. Léčba je spojena s imunosupresí a rizikem vzniku závažných cévních komplikací a sekundárních autoimunitních onemocnění (Coles, A.J. et al., 2012).

Ocrelizumab je dosud jediným lékem s prokázaným efektem na průběh PP RS (Hauser, S.L. et al., 2017), siponimod je dosud jediným lékem schváleným pro léčbu SP RS (Cohen, J.A. et al., 2016, Kappos, L. et al., 2018).

Vysoká účinnost některých DMD umožnila nastolit koncept NEDA (no evidence of disease activity - stabilizace nemoci s potlačením atak, progresivní postižení a MR aktivity) (Havrdova, E. et al., 2010) jako cíl terapie, kterého je možné dosáhnout dlouhodobě alespoň u části pacientů – například ve studii AFFIRM 34 % pacientů léčených natalizumabem dosahovalo NEDA po dobu 7 let a ve studii FREEDOMS až 70% pacientů léčených fingolimodem po dobu 7 let (Giovannoni, G. et al., 2017).

Vzhledem k rozšiřujícímu se spektru léčby RS stoupá potřeba identifikace faktorů, které predikují dlouhodobou prognózu RS a odpověď na léčbu. Díky tomu bude možné volit terapii na míru jednotlivým pacientům na základě důkazů (Rotstein, D. a Montalban, X., 2019). Na základě demografických parametrů a aktivity RS v prvním roce léčby interferonem beta a glatiramer acetátem je možné predikovat dlouhodobou disabilitu s přesností 68 – 85 % a odhalit tak pacienty, kteří vyžadují účinnější terapii (Rio, J. et al., 2022). Je známo, že časná zahájení vysoce účinné terapie (HET, high efficacy treatment) je asociováno s pomalejším nárůstem

disability (He, A. et al., 2020, Spelman, T. et al., 2021) a snížením koncentrace sNfL na úroveň zdravých kontrol (Benkert, P. et al., 2022). Odpověď na léčbu jednotlivými DMDs je ovšem individuální. Předpokládá se, že za tuto variabilitu jsou alespoň částečně zodpovědné genetické faktory. Znalost genetických markerů léčebné odpovědi by nám tedy mohla umožnit volbu léčby na míru pro individuálního pacienta (Comabella, M. a Vandebroek, K., 2011).

1.6 Genetika roztroušené sklerózy

Epidemiologická data naznačují, že RS má genetickou komponentu. Svědčí pro ni různá prevalence RS u etnik žijící ve stejné zeměpisné šířce (např. vyšší výskyt RS v Evropě proti Asii (Kurtzke, J.F., 2013, Walton, C. et al., 2020), na Sardinii ve srovnání se zbytkem Itálie nebo nižší výskyt u Sámů ve srovnání s ostatními obyvateli Skandinávie (Rosati, G., 2001). Výskyt RS je také dvakrát častější u žen než u mužů. Shoda výskytu RS u jednovaječných dvojčat je přes 25 % oproti 2–3 % u dvouvaječných dvojčat. Příbuzní v první linii pak mají riziko rozvoje RS přibližně 10x vyšší, než je obecné riziko v populaci (Hansen, T. et al., 2005) a pouze 15 % osob s RS má v rodině dalšího nemocného. Heritabilita RS, která udává, jak velká část variability výskytu RS je zapříčiněna genetickými faktory, se na základě dvojčecích studií odhaduje na 0,64 (Westerlind, H. et al., 2014). Gen zodpovědný za mendelovský přenos RS nebyl pomocí rodinných vazebných studií nalezen. Současná představa o vzniku RS předpokládá, že RS spouští faktory vnějšího prostředí a stochastické události u geneticky predisponovaných jedinců. Jedná se tedy o multifaktoriální onemocnění, které vzniká vzájemnými interakcemi většího množství běžných variant genů malého účinku a faktorů prostředí (Sawcer, S. et al., 2014).

Nejsilnějším lokusem náchylnosti k RS je region HLA. Jeho asociace s rizikem RS je natolik silná, že k jejímu objevení stačila studie s 200 subjekty. Díky tomu byl objeven jako první již v roce 1972 (Jersild, C. et al., 1972). HLA region se nachází v chromozomální oblasti 6p21 a je složen z mnoha genů. Nejsilnější vazbu s rozvojem RS z nich jeví jednoznačně haplotyp HLA DRB1*15:01. Na každou kopii této alely připadá OR 3,08 ($p < 10^{-320}$) (Barcellos, L.F. et al., 2006). Některé HLA alely II. třídy riziko RS zvyšují (HLA-DRB1*15:01, HLA-DRB1*13:03, HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*08:01 and HLA-DQB1*03:02), některé HLA alely I. třídy jsou protektivní (HLA-A*02:01, HLA-B*44:02, HLA-B*38:01 and HLA-B*55:01). Je popsán epistatický efekt mezi dvěma páry HLA alel II. třídy: HLA-DQA1*01:01-HLA-DRB1*15:01 a HLA-DQB1*03:01-HLA-DQB1*03:02. Naopak epistatická interakce mezi HLA a non-HLA lokusy nebyla nalezena (Moutsianas, L. et al., 2015b).

Mimo HLA lokus se dlouho nedařilo odhalit další rizikové alely kromě izolovaných popisů týkajících se např. varianty receptoru vitamínu D (Ebers, G.C. et al., 1996, Haines, J.L. et al., 1996, Kuokkanen, S. et al., 1996, Lohmueller, K.E. et al., 2003, Sawcer, S. et al., 2005, Sawcer, S. et al., 1996, Tajouri, L. et al., 2005).

Rodinným vazebným studiím se ovšem nepodařilo vysvětlit heritabilitu RS (Sawcer, S. et al., 2005), vzhledem k polygenní povaze rizika RS nízkému počtu rodin s více nemocnými členy nebo obtížnosti získání vzorků od členů více generací u onemocnění s nástupem v dospělosti (Sawcer, S. et al., 2014). Průlom přinesly celogenomové asociační studie (GWAS/genome-wide association studies), které zahrnují tisíce subjektů a porovnávají výskyt bodových polymorfismů (SNPs/single nucleotide polymorphisms) s frekvencí menší alely (MAF) > 5% mezi osobami s RS a zdravými kontrolami. Tyto SNPs nebývají přímo kauzálními variantami ovlivňujícími riziko RS, spíše je lze považovat za markery v blízké vzdálenosti od kauzální varianty v rámci genomu, díky které se přenášejí z rodiče na potomka společně s kauzální variantou (Goris, A. et al., 2022).

Jejich provedení bylo technicky a finančně možné po dokončení projektu HapMap Project, který zmapoval vazebnou nerovnováhu (linkage disequilibrium) napříč genomem (IHC, 2003), a také díky rozvoji čipové technologie umožňující zkoumání několika set tisíc genetických bodových non-synonymních polymorfismů (SNP) v genomu současně. GWAS mají oproti vazebným studiím vyšší rozlišení, nižší citlivost je vyvážena velikostí studijní skupiny. Jsou určeny k detekci běžných variant ve studované populaci (5–10 %) s malým efektem (OR: 1,1 – 1,25). Kvůli hrozbě falešně pozitivních výsledků, která je dána mnohočetným testováním, vyžadují tyto studie náročné statistické zpracování. Za signifikantní jsou považovány hladiny $p < 10^{-7}$ (Sawcer, S., 2010).

První GWAS zkoumající riziko RS byla publikována v roce 2007 (IMSGC et al., 2007). Poslední a dosud nejrozsáhlejší publikovaná GWAS zahrnuje 47 351 osob s RS a 68 248 zdravých kontrol a podařilo se jí popsat 233 SNPs asociovaných s rizikem rozvoje RS, z nichž 32 se nahází v MHC oblasti (IMSGC, 2019). Dosud známé běžné SNPs (MAF > 5%), které byly identifikovány GWAS, v současné době vysvětlují přibližně 40% rozdílu rizika RS mezi osobami s RS a zdravými kontrolami. Výsledky ukazují na geny zapojené do imunitní odpovědi, funkce T lymfocytů nebo oligodendroglie.

Znamé vzácné kódující varianty (MAF < 1 %) vysvětlují dalších přibližně 5 % rozdílu rizika. (IMSGC, 2018).

Dalším přístupem je studium variability počtu kopií segmentů DNA (CNV/copy number variants). Dosud je ovšem k dispozici pouze popis asociace rizika RS a získané deleční CNV v lokusech kódujících podjednotku T buněčného receptoru (Sato, S. et al., 2015).

Další porozumění genetickým faktorům RS se očekává od GWAS a CNV studií s vyšším počtem subjektů a také studia epigenetických modifikací a interakcí mezi geny a prostředím.

Kromě rizika RS se různé výzkumné skupiny snažily pomocí GWAS vysvětlit i variabilitu RS. GWAS zkoumající věk počátku onemocnění a Multiple Sclerosis Severity Score nepřinesla pozitivní výsledky (Giacalone, G. et al., 2015). Ovšem v jiných GWAS byly odhaleny asociace HLA-DRB1*15:01 s přítomností oligoklonálních pásů v mozkomíšním moku a mezi variantou v MHC regionu a ICHC genu a IgG indexem (Goris, A. et al., 2015), mezi frekvencí relapsů a variantou genu LRP2 (Zhou, Y. et al., 2017), mezi frekvencí relapsů a variantou genu WNT9B (Vandebergh, M. et al., 2021) nebo zrakovým postižením (Zhou, Y. et al., 2017). Celkově tedy zatím tyto studie pracují pouze se základními cross – sectional daty o průběhu RS, která nejsou dostatečná pro hodnocení léčebné odpovědi. Tyto výsledky mohou být užitečné v porozumění patogeneze RS a vývoji nových léčiv, ovšem prozatím nemohou sloužit k individualizaci léčby.

1.7 Farmakogenomika roztroušené sklerózy

Farmakogenetika je obor na pomezí genetiky a farmakologie, který se zabývá rolí dědičnosti v odpovědi na léčivé prostředky (Carlstrom, K.E. et al., 2019). Protože dlouhodobý efekt léčby RS nelze spolehlivě předvídat, dokud nedojde ke zhoršení stavu pacienta (Kalincik, T. et al., 2017), očekává se, že farmakogenetický výzkum přinese možnosti, jak léčebnou odpověď predikovat dříve (Zarzuelo-Romero, M.J. et al., 2021). Dosud jediný genetický marker, který je rutinně využíván v léčbě RS, je stanovení genotypu cytochromu P450 CYP2C9, který kóduje enzym zodpovědný za metabolismus siponimodu. Pomalí metabolizéři jsou ohroženi nežádoucími kardiovaskulárními účinky a vyžadují redukci dávky siponimodu (Diaz-Villamarin, X. et al., 2022). Nejedná se tedy o marker léčebného efektu.

Nejčastěji používané přístupy ve farmakogenomice RS jsou studie kandidátních genů a vzácněji GWAS.

Interferon beta

Nejpodrobněji je probádána odpověď na interferon beta, první lék ze skupiny DMDs), zavedený do praxe roku 1993, u něhož dochází k dobré klinické odpovědi přibližně u třetiny pacientů (TIMSS, 1993). Příslušné studie kandidátních genů vycházejí z předpokládaného

mechanismu účinku interferonu beta a zaměřují se na geny pro jeho receptor IFNAR1, IFNAR2, geny pro ISRE (interferon-stimulated response elements), interferon gama IFNG, chemokinový receptor CCR5, HLA geny, MXA a další. Části z publikovaných studií se nepodařilo zjistit asociaci se studovaným polymorfizmem a léčebnou odpovědí (Hocevar, K. et al., 2019). Naopak asociaci některých genových variant se podařilo zreplikovat. Nejblíže rutinnímu využití v klinické praxi se dostalo hodnocení exprese proteinu MxA kódovaného jedním z genů 1. typu odpovědi na interferon beta MXA. Tři polymorfizmy v oblasti promotoru jeho genu MXA byly v nezávislých studiích spojeny s léčebnou odpovědí (Cunningham, S. et al., 2005, Sayad, A. et al., 2017). Několik nezávislých studií se zaměřilo na gen IFNAR1A pro receptor interferonu beta a bylo zjištěno několik různých polymorfizmů asociovaných s léčebnou odpovědí (Cunningham, S. et al., 2005, Kulakova, O.G. et al., 2012, Sriram, U. et al., 2003). Opakovaně byla studována deleční mutace genu CCR5 pro C-C chemokinový receptor typu 5, který se vyskytuje na povrchu T-lymfocytů a makrofágů. Wild-type genotyp je spojen s horší odpovědí na interferon beta a lepší odpovědí na glatiramer acetát proti deleční variantě v ruské a egyptské populaci (Karam, R.A. et al., 2016, Kulakova, O.G. et al., 2014). Některé polymorfizmy genu pro transkripční faktor interferonu beta IRF5 (interferon regulatory factor 5) jsou spojeny s horší odpovědí na léčbu dle MR (Vosslander, S. et al., 2011), jeden z nich – rs2004640 – byl replikován nezávislou studií (Vandenbroeck, K. et al., 2011). Studie dánských autorů však zmiňované asociace nezjistila (Sellebjerg, F. et al., 2014).

Dosud byly publikovány výsledky pěti GWAS, které se zaměřily na léčebnou odpověď na interferon beta (Byun, E. et al., 2008, Clarelli, F. et al., 2017, Comabella, M. et al., 2009, Esposito, F. et al., 2015, Mahurkar, S. et al., 2017). Každá z nich identifikovala jiné bodové polymorfizmy ukazující na různé geny. Chybějící překryv mezi studii lze pravděpodobně vysvětlit různou definicí léčebné odpovědi, růzností studovaných populací, a různými použitými platformami. Nicméně nezávislou studií kandidátního genu (Cenit, M.D. et al., 2009) se podařilo reprodukovat lokusy genu GPC5 pro glypican. Tento protein má adhezivní a koreceptorovou funkci, hraje roli v neuronálním vývoji a růstu axonů (Williamson, D. et al., 2007). Jiná studie ovšem asociaci neprokázala (Sellebjerg, F. et al., 2014).

Studie zaměřená na reprodukci signálů ukazujících na signální dráhu toll-like receptorů, geny indukované interferonem beta a geny pro glutamátové a GABA receptory reprodukovala pouze dva geny – PELI3 a GABRR3 (Bustamante, M.F. et al., 2015). Reprodukována byla i asociace

odpovědi na interferon beta a gen NINJ2, který kóduje adhezivní molekulu účastnící se zánětlivé reakce a aktivace endotelu (Peroni, S. et al., 2020).

Jedné z GWAS se podařilo replikovat výsledek ukazující na variantu genu SLC9A9, pravděpodobně vedoucí k poruše recyklace receptoru pro interferon beta (Esposito, F. et al., 2015).

Glatiramer acetát

Dvě nezávislé studie prokázaly asociaci varianty HLA-DRB1*15:01 (konkrétně varianty označené bodovým polymorfismem rs3135388 proxy) s příznivou léčebnou odpovědí na glatiramer acetát, ale nikoliv na interferon beta (Fusco, C. et al., 2001, Gross, R. et al., 2011).

Existuje řada dalších studií kandidátních genů, vesměs na malých počtech pacientů, které ukazují slibné výsledky, ale dosud nebyly replikovány (Zarzuelo-Romero, M.J. et al., 2021).

Nejrozsáhlejší farmakogenetickou studií zabývající se efektem glatiramer acetátu je v současné době studie Rosse et al., která zkoumala pacienty, jež se zúčastnili klinických studií s glatiramer acetátem. Tato studie pomocí GWAS odhalila a na nezávislé kohortě validovala kombinaci 4 bodových polymorfismů, která je asociována s poklesem výskytu relapsů a progresu postižení při léčbě glatiramer acetátem, ale nikoliv interferonem beta (Ross, C.J. et al., 2017). Jedná se o kombinaci SNP rs80191572 (v genu UVRAG), rs28724893 (v genu HLA-DQB2), rs1789084 (v genu MBP), and rs139890339 (v genu ZAK(CDCA7), kterou ve studii neslo přibližně 10 % subjektů.

Dimetylfumarát

Podle studie s 39 pacienty s RR RS a 40 zdravými kontrolami je léčba dimetylfumarátem spojena se zvýšenou expresí genu ZMIZ1 (Zinc Finger MIZ-Type Containing 1), nezávisle na bodovém polymorfismu rs1782645 (C>T). Efekt léčby na aktivitu RS nebyl v souvislosti se ZMIZ 1 hodnocen (Fewings, N.L. et al., 2017).

Studie s 564 subjekty s RR RS odhalila asociaci alely G polymorfismu rs6919626 v genu NOX3 nejen se sníženou tvorbou kyslíkových radikálů, ale také s nižší léčebnou odpovědí na dimetylfumarát (OR 1,57, p 0,036). To je pravděpodobně způsobeno vyšší metylací CpG ostrůvků v promotorové oblasti NOX3. Zajímavé je, že pacienti s dobrou odpovědí na léčbu měli 3 měsíce po zahájení léčby signifikantně vyšší počet monocytů v periferní krvi proti non-respondérům (Carlstrom, K.E. et al., 2019).

Teriflunomid

Teriflunomid přechází přes buněčné membrány díky ATP-binding cassette transporéru, kódovaným genem ABCG2. Bodový polymorfismus rs2231142 genu ABCG2 je spojen s vyšší koncentrací teriflunomidu (Makarem, Y.S. et al., 2021). Byl zkoumán význam ABCG2 polymorfismu v animálním modelu, nicméně není známo, zda je u lidí spojen i s lepší odpovědí na léčbu (Thiele Nee Schrewe, L. et al., 2020).

Teriflunomid blokuje aktivitu enzymu dihydroorotát dehydrogenázy (DHODH). Bodový polymorfismus DHODH rs3213422 je spojen s klinickou stabilizací revmatoidní artritidy při léčbě leflunomidem (Makarem, Y.S. et al., 2021, Pawlik, A. et al., 2009), jehož je teriflunomid aktivním metabolitem (Magne, D. et al., 2006).

Nicméně v monitoraci léčebné odpovědi na teriflunomid by mohla hrát roli sérová koncentrace cytokinu CLCX3, která byla po 12 měsících léčby asociována s dosažením stavu NEDA (Fissolo, N. et al., 2023).

Fingolimod

Podobně jako léčba dimetylfumarátem, i léčba fingolimodem vede ke zvýšené expresi genu ZMIZ1. Produkt tohoto genu patří mezi proteiny inhibující aktivitu STAT (signal transducers and activators of transcription) a je koaktivátorem Notch1, který hraje roli v remyelinizaci u RS (Hu, Q.D. et al., 2003). Korelace s efektem léčby nebyla studována.

Kladribin

Ribonukleotid reductáza (RR) se účastní tvorby deoxyribonukleotidů, které kompetují s účinnými metabolity kladribinu. Zvýšená exprese RR by tedy mohla vést k rezistenci na kladribin, jak bylo popsáno u myeloidní leukemie (Lotfi, K. et al., 2003). Význam genetických variant RR v léčbě RS nebyla studována, ale u pacientů s akutní myeloidní leukemií byla popsána zvýšená exprese podjednotek RR a vyšší riziko relapsu u nositelů bodových polymorfismů rs1042919 a rs1561876 (Cao, X. et al., 2013).

Dalším enzymem, který se účastní metabolismu kladribinu, je adenosin deamináza kódovaná genem ADA. U osob s vrozenou deficiencí ADA a osob léčených kladribinem dochází k akumulaci trifosforylovaného deoxyadenosinu a lymfopenii (Laugel, B. et al., 2011). Studie s 561 pacienty s RR RS léčenými kladribinem prokázala vyšší stupeň postižení u osob s bodovým polymorfismem rs244072 (T>C) (Stampanoni Bassi, M. et al., 2020), což by mohlo vypovídat o nižším efektu léčby.

Natalizumab

Natalizumab, ocrelizumab a alemtuzumab jsou léky používané u klinicky agresivních forem RS a predikce selhání léčby je zde tedy zvláště důležitá. Je k dispozici několik studií, které zkoumaly vliv genetických variant na efekt natalizumabu.

Glutation-S-transferáza, kódovaná genem GSTP1, enzym s antioxidační aktivitou, byla studována u 129 osob s RS léčených natalizumabem. U pacientů s polymorfizmem rs1695 (A>G, Ile105Val) méně často došlo ke zlepšení neurologického postižení oproti pacientům s A alelou ($\chi^2 = 0,031$; df = 1; P = 0,861) (Alexoudi, A. et al., 2016). Stejná studie zkoumala i vliv varianty rs18000566 (C>T, Pro187Ser) genu NQO1, která je spojena se sníženou aktivitou dalšího enzymu s antioxidační aktivitou – NAD(P)H chinon oxidoreduktázy. Autoři u osob s wild-type variantou NQO1 pozorovali častější zlepšení neurologického nálezu ($\chi^2 = 3,320$; df = 1; P = 0,068).

Gen ITGA4 kóduje podjednotku alfa 4 integrinu, proti které je natalizumab namířen. V souvislosti s efektem natalizumabu nebyl gen ITGA4 studován, ovšem práce slovenských autorů ukázala souvislost polymorfizmu rs1143678 a rizika RS (OR 1,73; 95% CI = 1,07–2,81; P = 0,024) (Durmanova, V. et al., 2015).

Polymorfizmus rs2498804 (G>T) genu AKT1, který se účastní regulace apoptózy, byl studován na 67 pacientech s RR RS léčených natalizumabem. Nositelé T alely měli nižší počet lymfocytů v periferní krvi a zejména významně vyšší riziko relapsu po ukončení léčby natalizumabem (OR = 11,79; 95% CI: 3,72–37,38; P < 0,01) (Rossi, S. et al., 2013).

Gen GP6 kóduje kolagenový receptor, který hraje roli v agregaci trombocytů. Předpokládá se jeho podíl na neurodegeneraci u RS (Marshall, O. et al., 2014). Studie se 119 pacienty s RS asijského původu zjistila horší odpověď na natalizumab u nositelů C alely rs2304166 polymorfizmu (C>G) (OR = 22,18; 95% CI: 5,76-95,88, P < 0,01) (Al-Mojel, M. et al., 2019).

Ocrelizumab

Vzhledem k vysoké efektivitě ocrelizumabu v léčbě RS by bylo žádoucí znát faktory spojené se změnou jeho efektu. V současné době nicméně potřebné studie nejsou k dispozici.

Alemtuzumab

Alemtuzumab po vazbě na povrchový znak B a T lymfocytů navozuje protilátkově zprostředkovanou cytotoxicitu (Coles, A.J. et al., 2012). Tento proces je zahájen vazbou alemtuzumabu na Fc receptor pro IgG (FcγR). (Hibbs, M.L. et al., 1988). Polymorfismy v genech FCGR2A a FCGR3A kódujících FcγR snižují léčebný efekt u některých hematoonkologických

onemocnění (Cartron, G. et al., 2002). Studie s 85 pacienty s RR RS léčeným alemtuzumabem studovala léčebnou odpověď u nositelů vysoce afinní varianty FCGR3A kódující valin na aminokyselinové pozici 158 proti nížce afinní variantě s fenylalaninem. Dále byli porovnání pacienti s vysoce afinní variantou FCGR2A s histidinem na aminokyselinové pozici 131 proti pacientům s nížce afinní variantou s argininem. Během dvouletého sledování nebyl pozorován rozdíl v léčebné odpovědi (Keller, C.W. et al., 2019).

Obdobná je situace se studiem genu pro CD52. Varianty tohoto genu byly studovány u pacientů po transplantaci ledvin a byla pozorována nižší účinnost alemtuzumabu u osob s polymorfismy rs1071849 (A>G; Asn40Ser) a rs17645 (A>G; Ile41Met) (Okó, A. et al., 2009). Studie u RS chybí.

V oblasti genetických markerů léčebné odpovědi je bohužel málo replikovaných dat. Dostupné studie zahrnují nízký počet subjektů a hodnotí jednotlivé geny bez zohlednění možných genových interakcí. Také jsou mezi sebou obtížně porovnatelné z důvodu různého způsobu stanovení léčebné odpovědi. U některých léků data stran použití u RS chybí a jsou k dispozici pouze studie u jiných onemocnění. U ocrelizumabu, siponimodu a ponosimodu nejsou dostupné žádné studie. Některé genetické znaky by nicméně po validaci na větších skupinách pacientů mohly dojít klinického využití. Omezené využití ve studiu léčebné odpovědi prozatím našly GWAS, což platí zejména pro vysoce účinné léky, které v současné době docházejí širokého uplatnění. Limitací těchto studií je náročnost získání validních a dostatečně podrobných informací o průběhu onemocnění, podle nichž by bylo možné léčebnou odpověď hodnotit.

2. Cíle a hypotézy

Cíle práce a hypotézy jsou rozděleny do dvou oblastí zkoumajících genetické pozadí průběhu roztroušené sklerózy.

2.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1

Cíl studie I:

Primární cíl: Určit vztah počtu (GT) repetic v promotoru genu HMOX1 HO-1 a rychlosti akumulace neurologického deficitu u pacientů s RS.

Sekundární cíl: Validovat známé faktory asociované s rychlejším nárůstem neurologického deficitu u pacientů s RS.

Hypotézy studie I:

- Pacienti s roztroušenou sklerózou, kteří mají více než 25 (GT)_n dikukleotidových repetic v promotoru HMOX1, vykazují rychlejší progresi neurologického postižení.
- Pacienti s pozdějším nástupem RS, mužského pohlaví, s primárně progresivní formou RS a pacienti neléčení DMDs vykazují rychlejší nárůst neurologického postižení následkem RS.

2.2 Studie II: Genotype/Phenotype project

Cíl studie II:

Odhalit jednonukleotidové varianty spojené s tíží RS pomocí přesného stanovení fenotypu RS. Vytvořit model schopný predikovat průběh onemocnění s využitím SNVs již v době diagnózy RS.

Sekundární cíle: Sekundárním cílem studie bylo prozkoumat SNV zjištěné v primární analýze a cíleně replikovat dosud reportované možné markery tíže RS.

Zjistit, zda geny se známou asociací s náchylností k RS jsou asociované i se závažností průběhu RS.

Hypotézy studie II:

- Genetické varianty ovlivňují průběh a závažnost RR RS a je možné je odhalit pomocí prospektivního, longitudinálního sběru dat.
- Model vytvořený metodou strojového učení využívající jednonukleotidové varianty (SNVs) má dostatečnou pozitivní prediktivní hodnotu, aby mohl být využit ke klinickému rozhodování o léčbě v době diagnózy RS.
- Geny asociované s rizikem RS ovlivňují závažnost RS.

3. Metodika

Všechny uvedené studie byly schváleny Etickou komisí Všeobecné fakultní nemocnice v Praze. Od každého účastníka byl získán písemný informovaný souhlas.

3.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1

3.1.1 Výzkumný soubor

Studie se zúčastnilo 338 pacientů (239 žen a 99 mužů) s diagnózou roztroušené sklerózy. Subjekty byly vybrány náhodně mezi pacienty navštěvující Centrum pro demyelinizační onemocnění Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty Univerzity Karlovy v Praze mezi lety 1999 a 2003. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas se studií. Do studie byli zahrnuti pacienti s délkou klinického sledování min. 9 let nebo s EDSS vyšším než 4. Demografické charakteristiky souboru shrnuje *Tabulka 1*.

Tabulka 1: Demografie studovaného souboru

	Progrese postižení†		
	Celkem	Rychlá	Oddálená
Subjekty, počet (ženy:muži)	338 (239:99)	253 (184:69)	85 (55:30)
Věk, roky ± SD *	44 ± 10	43 ± 11	46 ± 10
Věk začátku RS, roky ± SD *	28 ± 9	26 ± 8	32 ± 9
Typ počátku RS, počet (%) *			
Relaps remitentní	324 (96%)	249 (98%)	75 (88%)
Primárně progresivní	14 (4%)	4 (2%)	10 (12%)
Léky modifikující onemocnění, počet (%) *	173 (51%)	142 (56%)	31 (36%)
Cytostatika, počet (%) *	15 (4%)	8 (3%)	7 (8%)

† podle dosažení stupně EDSS 4 do 9 let od začátku onemocnění

* $P \leq 0,05$, χ^2 test, t-test

V průběhu devítiletého sledování bylo před dosažením EDSS 4 léčeno pomocí DMDs 173 pacientů, zatímco 165 pacientů DMDs léčeno nebylo. *Tabulka 2* představuje údaje o léčbě DMDs a imunosupresivy.

Tabulka 2: Přehled léčby léky modifikujícími průběh onemocnění a léčby cytostatiky

Léčba	počet léčených pacientů	průměrná doba léčby na pacienta, roky (rozptyl)
Interferon β1a		
<i>Avonex</i>	126	4.1 (1-8)
<i>Rebif</i>	26	2.5 (1-5)
Interferon β1b	39	3.7 (1-9)
Glatiramer acetát	6	1.8 (1-5)
i.v. imunoglobuliny	9	2.0 (1-4)
Natalizumab	1	1.0
Cyklofosfamid	11	2.4 (1-6)
Mitoxantron	3	2.3 (1-4)
Firategrast	1	1.0

3.1.2 Design studie

Klinické sledování subjektů probíhalo nejméně jednou za šest měsíců a zahrnovalo zhodnocení neurologického postižení pomocí EDSS. Pro každého pacienta se stupněm EDSS 4 a vyšším byla zaznamenána doba trvání onemocnění do dosažení EDSS 4. Pacienti byli rozdělení na ty s „rychlou“ progresí RS (tj. dosáhli stupně EDSS 4 během 9 let trvání RS) a „oddálenou“ progresí EDSS (tj. nedosáhli EDSS 4 během 9 let), přičemž 9 let byl medián trvání RS u pacientů, kteří dosáhli stupně EDSS 4. (GT)_n polymorfismus promotoru genu HMOX1 pro HO-1 byl stanoven u každého pacienta. Jeho potenciální vliv na progresi RS byl vyhodnocen statistickou analýzou. Pro kompenzaci variability pohlaví, věku počátku RS, klinického průběhu RS (RR RS a PP RS) a léčby, byly tyto údaje zahrnuty do statistické analýzy jako proměnné.

3.1.3 Genetická analýza

Genomová DNA byla izolována z leukocytů periferní krve standardními postupy a genetická analýza proběhla podle metodiky dříve popsané Králem a spolupracovníky (Kral, A. et al., 2011).

3.1.4 Statistická analýza

Statistická analýza byla provedena pomocí programů SPSS 17 (SPSS Inc., Chicago, IL) a Statistica 9.1 (StatSoft Inc., Tulsa, OK). Za signifikantní byla považována hladina významnosti $P \leq 0,05$. Vzhledem k nízkému počtu testovacích procedur nebyla uplatněna korekce mnohočetného testování. Pokud není uvedeno jinak, výsledky byly vyjádřeny jako průměr \pm standardní odchylka. U všech kvantitativních proměnných byla testována normalita rozdělení.

K testování efektu polymorfismu HMOX1 s přihlédnutím k relevantním proměnným (pohlaví, věk počátku RS, klinický průběh RS, trvání léčby DMDs a imunosupresivní léčby) jsme použili logistickou regresní analýzu. Čas do dosažení stupně EDSS 4 korigovaný na věk, klinický průběh RS a léčbu DMDs byl porovnán mezi pacienty s odlišným genotypem HMOX1 pomocí Coxova modelu proporcionálních rizik. Porovnání demografických údajů mezi pacienty s rychlou a oddálenou progresí postižení, stejně jako post-hoc porovnání proměnných mezi pacienty s rozdílným HMOX1 genotypem, bylo provedeno pomocí t-testu pro numerické proměnné a χ^2 testu pro kategorické hodnoty.

3.2 Studie II: Phenotype/Genotype Project

3.2.1 Výzkumný soubor

Nábor subjektů probíhal v osmi centrech specializovaných na léčbu roztroušené sklerózy ve třech zemích (v ČR se jednalo Centrum pro demyelinizační onemocnění Všeobecné fakultní nemocnice a 1. lékařské fakulty v Praze, dále se zúčastnila pracoviště z Austrálie a Španělska). Všechny subjekty studie byly účastníky registru MSBase. MSBase je mezinárodní, prospektivní, observační registr pacientů s RS, registrovaný v International Clinical Trials Registry Platform Světové zdravotnické organizace, ID ACTRN12605000455662 (Butzkueven, H. et al., 2006). Data jsou zadávána ošetřujícími neurology v reálném nebo téměř reálném čase a zahrnují demografické údaje účastníků, fenotyp onemocnění, hodnocení EDSS, informace o relapsech RS a informace o léčbě, zejména o léčbě DMDs. Hodnocení klinického stavu probíhá v průměru každých 6 měsíců. Data z MSBase byla získána 4. září 2019.

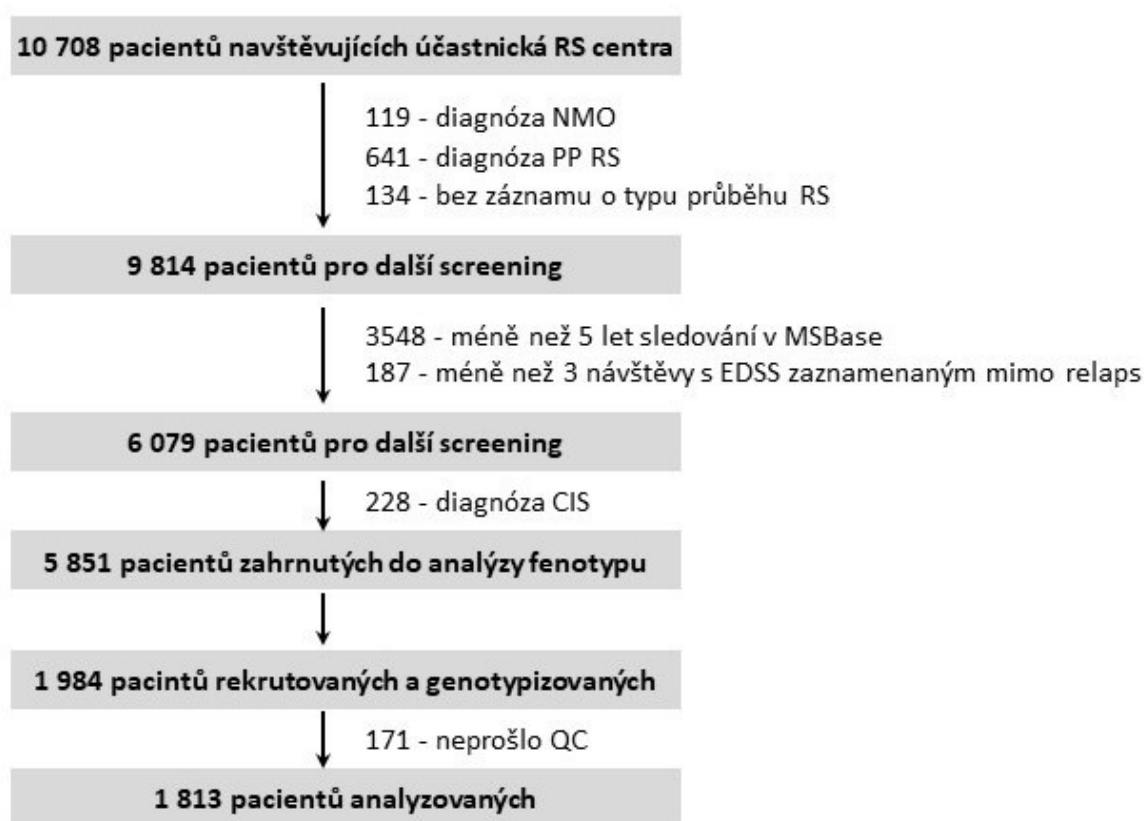
3.2.2 Kritéria vstupu do studie

Do studie byly zahrnuty osoby s roztroušenou sklerózou evropského původu s klinicky definitivní RS a s relaps remitentním počátkem onemocnění (tj. osoby s relaps remitentní a sekundárně progresivní RS). Diagnóza byla stanovena na základě McDonaldových kritérií

(Thompson, A.J. et al., 2018). Další minimální kritérium představovala dostupnost následujících údajů: pohlaví, datum narození, věk počátku RS, min. 5 let trvání onemocnění, min. 5 let prospektivního sledování v MSBase, min. 3 hodnoty EDSS zaznamenané mimo období relapsu (tzn. hodnoty EDSS zaznamenané v rozmezí 30 dnů od počátku relapsu nebyly zahrnuty do analýzy), dostupnost údajů o léčbě a dostupnost údajů o relapsech. Všem pacientům, kteří splnili vstupní kritéria a navštěvovali kliniky mezi lednem 2015 a červencem 2019, byla nabídnuta účast ve studii.

3.2.3 Fenotypizace, přisouzení tíže RS a nábor

Hodnocení EDSS bylo použito ke stanovení ARMSS a MSSS. Pro každého účastníka byl vypočítán medián na relapsech nezávislého longitudinálního ARMSS (I-ARMSS) a medián I-MSSS za použití každého jednotlivého dostupného ARMSS nebo MSSS. Mediány I-ARMSS a I-MSSS byly rozděleny do kvintilů ke stratifikaci kohorty podle tíže RS. Krajní horní a dolní kvintily byly definovány jako extrémy tíže RS, a to na základě údajů všech jedinců, kteří naplnili vstupní kritéria studie ($n = 5851$; *Obrázek 2*). Nábor účastníků byl obohacen o tyto pacienty. U účastníků v krajních decilech rozdělení podle tíže RS byla revidována správnost diagnózy RS a v případě nejisté diagnózy nebo změny diagnózy byli příslušní účastníci ze studie vyloučeni. Věk začátku onemocnění (age at onset, AAO) byl definován jako věk, ve kterém se objevily první příznaky onemocnění. Trvání příznaků bylo definováno jako počet let mezi prvními příznaky a poslední klinickou návštěvou zaznamenanou v MSBase. Poměr času expozice DMDs byl definován jako celkový čas expozice jakémukoliv registrovanému DMD v poměru k celkovému trvání příznaků, tak jak bylo zaznamenáno v MSBase.



Obrázek 2: Přehled pacientů zařazených do screeningu a analýzy.

Legenda: RS – roztroušená skleróza; NMO - Neuromyelitis optica; PP RS = Primárně progresivní roztroušená skleróza; EDSS – Expanded Disability Status Scale; CIS - Klinicky izolovaný syndrom; QC – kontrola kvality.

3.2.4 Statistické analýzy

Zpracování dat a statistické analýzy byly provedeny v programech Stata v17 (Stata Corp, College Station, TX) nebo R (<http://R-project.org>). Pro výpočetně náročné analýzy byla využita vysoce výkonná výpočetní infrastruktura Monash University MASSIVE (Goscinski, W.J. et al., 2014). Dle distribuce proměnných byl pro proměnné vypočten průměr a směrodatná odchylka (SD) nebo medián s mezikvartilovým rozpětím (IQR). Kategorické proměnné byly popsány pomocí čísel a četností. Standardizované rozdíly (tj. velikost účinku) byly hodnoceny Cohenovým testem d. Korelace mezi I-ARMSS a AAO a váženým genetickým skóre rizika (weighted genetic risk score, wGRS) byly zhodnoceny parametrickým Pearsonovým korelačním koeficientem. Všechny analýzy byly oboustranné.

3.2.5 Genotypizace, imputace a kontrola kvality

Genomová DNA získaná z periferní plné krve byla genotypizována pomocí čipu Illumina MegaEx BeadChip (Illumina, CA). Tato array obsahuje přes 2 miliony markerů různých populací (Illumina, 2015). Dále byla doplněna o dalších 3,000 SNVs, které byly předmětem zájmu, včetně známých SNVs spojených s rizikem RS, souborem SNVs identifikujícím klasické HLA alely (tag SNVs) (Moutsianas, L. et al., 2015a) a dříve publikovaných předpokládaných SNVs související s tíží RS (Baranzini, S.E. et al., 2009, Brynedal, B. et al., 2010, DeLuca, G.C. et al., 2007, IMSGC, WTCCC2 et al., 2011). Vzorky byly genotypizovány ve dvou skupinách na pracovišti John. P. Hussman Institute for Human Genomics (University of Miami, FL, USA). Každá skupina obsahovala vzorky z České republiky, Austrálie a Španělska. Genetická data byla následně rozdělena do šesti souborů. Vzorky prošly kontrolou kvality po jednotlivých souborech (IMSGC, 2019). Její výsledky pro českou kohortu jsou shrnuty v *Tabulce 3 a, 3 b*, výsledky pro ostatní kohorty byly publikovány (Jokubaitis, V.G. et al., 2022).

Analýza hlavních komponent (principal component, PC) byla provedena v programu Eigenstrat (v R) a jedinci, kteří byli dále než ± 6 standardních odchylek v každé z PC, byli vyřazeni. PC byly projikovány do dat z HapMapIII projektu k posouzení vlivu populační stratifikace – projekce pro českou kohortu uvádí *Obrázek 3 a, 3 b*. Projekce pro ostatní skupiny účastníků byly publikovány (Jokubaitis, V.G. et al., 2022). Manuálně byli vyloučeni jedinci mimo cluster evropského původu. Po kontrole kvality byla data doplněna s využitím Haplotype Reference Consortium panel (r1.1) (Das, S. et al., 2016) na Michigan imputation serveru. Po kontrole kvality to vedlo k získání 5,985,626 SNV s $MAF \geq 5\%$.

Tabulka 3a: Shrnutí výsledků kontroly kvality vzorků a SNP, skupina 1

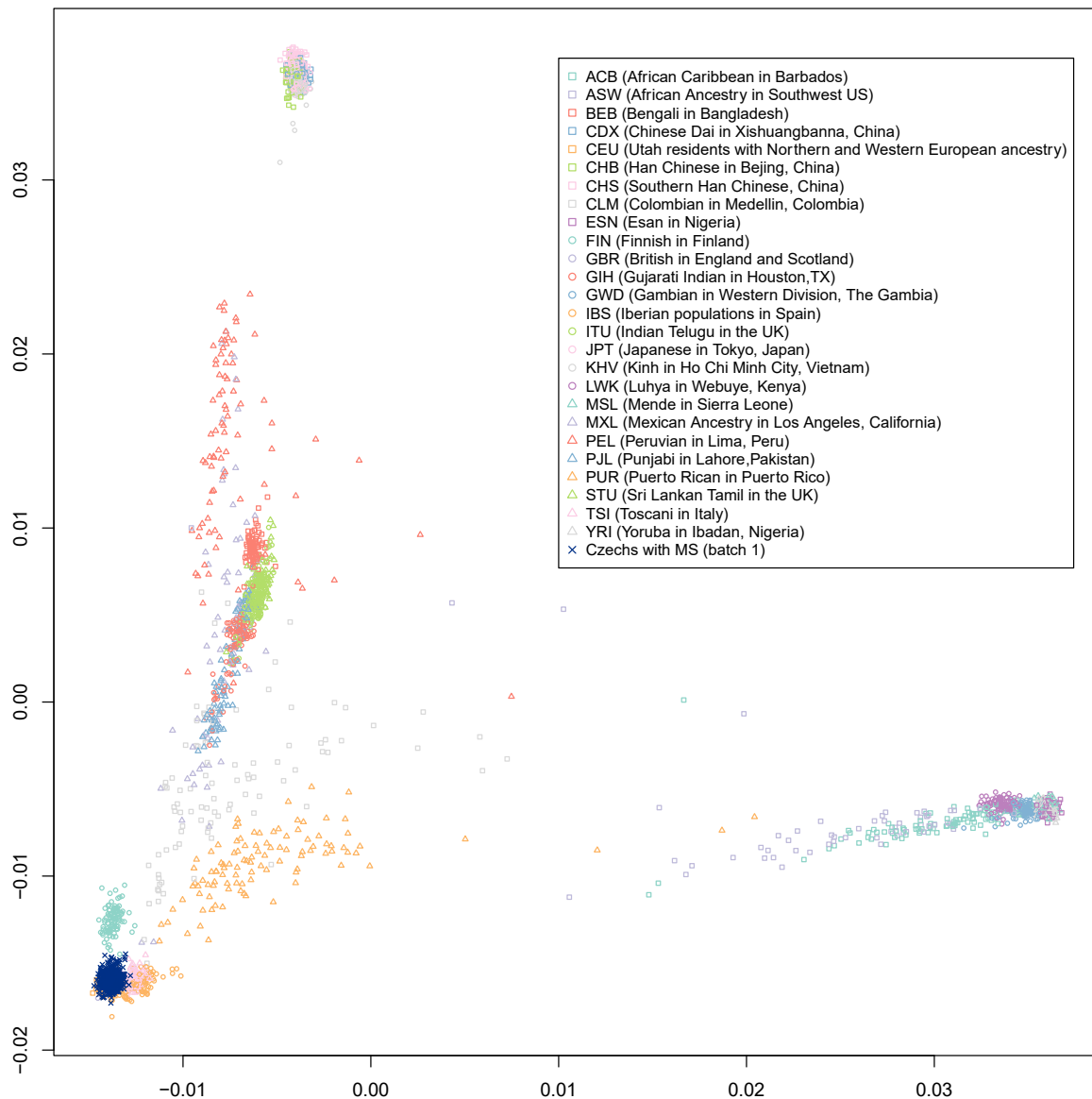
Genotypizace Skupina 1							
Počet genotypizovaných vzorků		1195					
Pořadí kroku	Krok (popis)	Počet vyřazených vzorků					
		AU jedinci	AU SNPs	CZ jedinci	CZ SNPs	ES jedinci	ES SNPs
1	Kontrola pohlaví (diskrepance pohlaví zaznamenaného v databázi vs genotypizace)	3		3		1	
2	Chybění (I – SNP; zvolena 5% hranice, tj. <95 % genotypů)		97 288		102 844		95 884
3	Chybění (I – jedinci; zvolena 5% hranice, tj. <95 % genotypů)	0		0		0	
4	Rozdílná chybovost (zvolena hranice $P < 0,01$)		320		880		293
5	Porušení HWE (zvolena hranice $1e^{-5}$)		4958		6977		4156
6	Monomorfní SNP		801344		80978 6		754507
7	LD pruning (MAF 0,05; indep-pairwise 100 2 0,1)						
8	IBS (chyby genotypizace)	2		0		1	
9	Příbuzenství	4		6		3	
10	PCA (námi identifikováno a eigenstat odlehle hodnoty vyřazené eigensoftem)	13		14		10	
	Celkem vyřazeno	22	903910	23	92048 7	15	854840
	Vzorky, které prošly kontrolou kvality: n = 1135						

Zkratky: AU – australská kohorta; CZ – česká kohorta; ES – španělská kohorta; HWE – Hardy – Weinbergův zákon; IBS – identical by state; LD – Linkage disequilibrium/vazebná nerovnováha; SNP – Single Nucleotide Polymorphism/bodový polymorfismus;

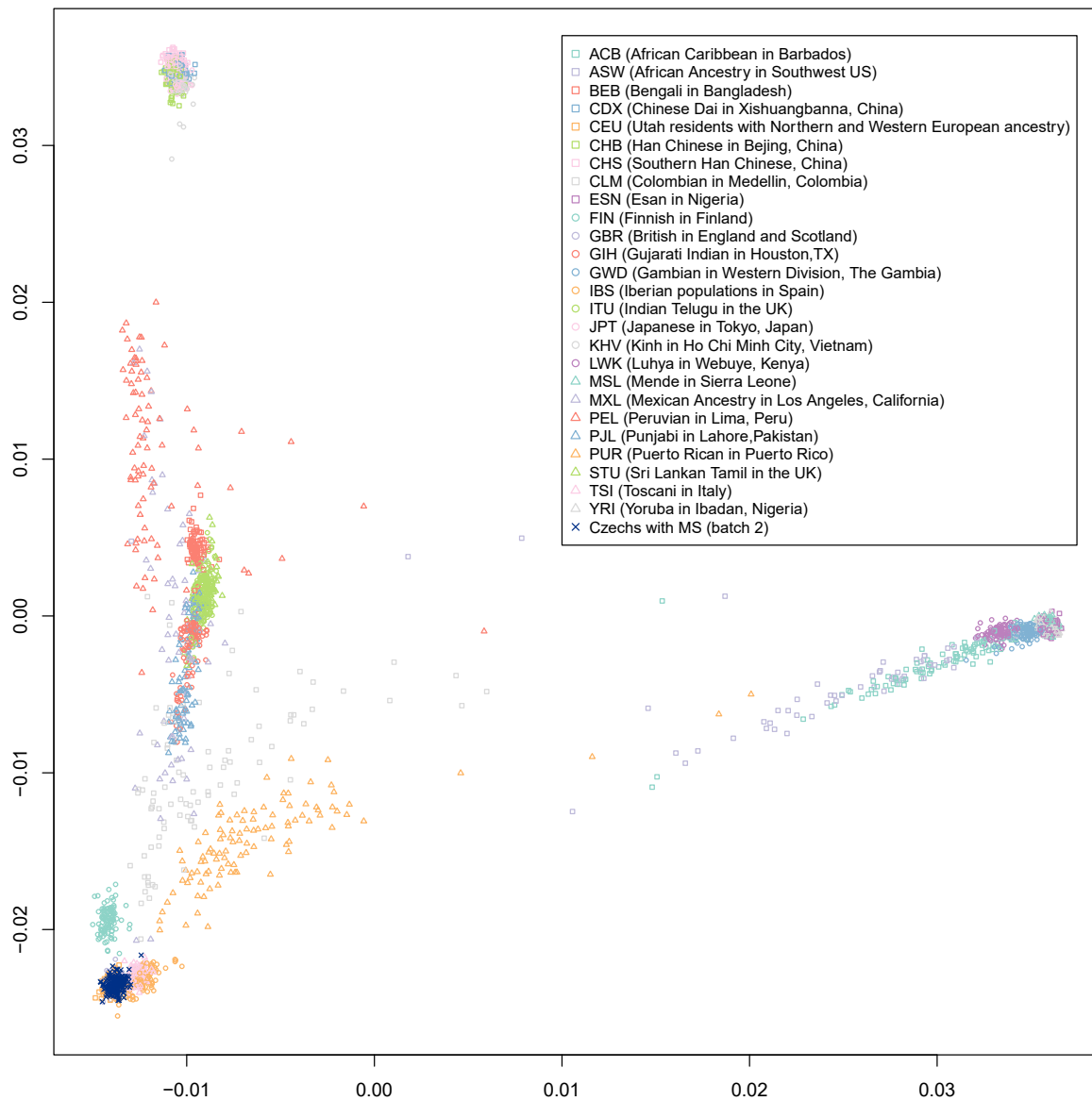
Tabulka 3b: Shrnutí výsledků kontroly kvality vzorků a SNP, skupina 2

Genotypizace Skupina 2							
Počet genotypizovaných vzorků	789	Počet vyřazených vzorků					
Pořadí kroku	Krok (popis)	AU jedinci	AU SNPs	CZ jedinci	CZ SNPs	ES jedinci	ES SNPs
1	Kontrola pohlaví (diskrepance pohlaví zaznamenané v databázi vs genotypizace)	0		3		23	
2	Chybění (I – SNP; zvolena 5% hranice, tj. <95 % genotypů)		98 749		115 416		97 226
3	Chybění (I – jedinci; zvolena 5% hranice, tj. <95 % genotypů)	3		0		3	
4	Rozdílná chybovost (zvolena hranice P <0,01)		9 596		218		1 298
5	Porušení HWE (zvolena hranice $1e^{-5}$)		11 250		7 254		8 048
6	Monomorfní SNP		745 715		873 815		790 170
7	LD pruning (MAF 0.05; indep-pairwise 100 2 0,1)						
8	Duplikáty	11		0		0	
9	IBS (chyby genotypizace)	0		0		0	
10	Příbuzenství	9		17		27	
11	PCA (námi identifikováno a eigenstat odlehlé hodnoty vyřazené eigensoftem)	8		2		5	
	Celkem vyřazeno	31	865 310	22	996 703	58	896 742
	Vzorky, které prošly kontrolou kvality: n = 678						

Zkratky: AU – australská kohorta; CZ – česká kohorta; ES – španělská kohorta; HWE – Hardy – Weinbergův zákon; IBS – identical by state; LD – Linkage disequilibrium/vazebná nerovnováha; SNP – Single Nucleotide Polymorphism/bodový polymorfismus;



Obrázek 3a: Hlavní komponenty pro účastníky z České republiky ("skupina 1") promítnuté do dat HapMapIII ukazují shlukování s evropskými populacemi.



Obrázek 3b: Hlavní komponenty pro účastníky z České republiky ("skupina 2") promítnuté do dat HapMapIII ukazují shlukování s evropskými populacemi.

3.2.6 Asociační testování

Asociační testování a meta-analýzy proběhly v programu PLINK (v 1.9 and v 2.0) (Purcell, S. et al., 2007). Pro spojité proměnné byla pro šest datových souborů použita lineární regrese adjustovaná na prvních 5 PC, wGRS (De Jager, P.L. et al., 2009), léčbu DMDs a na proměnné se standardizovaným rozdílem vyšším než 15 % (mezi extrémy tíže RS). Kombinovaná data šesti souborů byla analyzována s použitím fixed-effects meta-analýz s cílem identifikovat statisticky nezávislé SNVs.

Pro binární proměnné bylo všech šest skupin analyzováno společně vzhledem k nižšímu počtu vzorků. Byla použita logistická regrese adjustovaná na ID souboru, prvních pět PC a na proměnné se standardizovaným rozdílem vyšším než 15 %.

Hladina významnosti pro *de novo* GWAS byla stanovena na $P < 5 \times 10^{-8}$. Při p-hodnotách mezi $1 \times 10^{-8} < P < 5 \times 10^{-5}$ byl důkaz asociace mezi SNV a studovaným rysem považován za minimální. Pro replikační analýzy byla p-hodnota po Bonferroniho korekci nutná k překročení replikačního prahu stanovena na $P \leq 4.31 \times 10^{-4}$ (0,05/116 replikovaných SNV). Bylo vypočítáno wGRS na základě přímo genotypizovaných SNVs popsanych International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC, 2019). Bylo odhadnuto, že zahrnutí 915 jedinců do každého podsouboru poskytne 80 % sílu odhalit SNV s MAF 0,2 a poměrem šancí 1,3 na podkladě binárních parametrů hodnocení tíže RS.

3.2.7 Analýzy přežití

Pro každého účastníka, který při první návštěvě zaznamenané v MSBase nedosahoval ireverzibilního EDSS 3 nebo 6 (milníky neurologického postižení), byla určena doba potřebná k jejich dosažení. Tam, kde těchto milníků dosaženo nebylo, byla data uzavřena nejpozdější zaznamenanou návštěvou. Analýzy přežití byly založeny na nosičství menší alely pro SNV v 10 nejbližších genech identifikovaných v našich I-ARMSS a I-MSSS *de novo* asociačních analýzách; a pro 5 nejbližších genů identifikovaných v našich I-ARMSS a I-MSSS analýzách stratifikovaných podle pohlaví. Vícerozměrné modely byly upraveny podle AAO, wGRS náchylnosti k roztroušené skleróze, doby sledování na DMD léčbě, a pohlaví. Ke zjištění porušení Coxova předpokladu proporcionálních rizik byl použit Schoenfeldův globální test reziduí. V případě porušení předpokladu proporcionality byl použit Weibullův regresní přístup. Údaje o přežití byly vizualizovány pomocí Kaplanových-Meierových křivek.

3.2.8 Analýza dědivosti

Dědivost v úzkém smyslu (h^2p) byla odhadnuta z individuálních GWAS dat pomocí přístupu založeného na omezené maximální věrohodnosti (GREML) realizovaného pomocí softwaru GCTA (Yang, J. et al., 2011), BOLT-LMM (Loh, P.R. et al., 2015) a přístupu souhrnné statistiky pomocí regrese skóre vazebných nerovnováh (LDSC) provedeného v softwaru LDSC (Bulik-Sullivan, B.K. et al., 2015).

3.2.9 Analýzy obohacení genových sad

K přiřazení SNV ($P < 1 \times 10^{-5}$) ke genům, tkáním a funkcím byla použita FUMA, integrační webová platforma využívající informace z různých biologických zdrojů k usnadnění funkční anotace výsledků GWAS, prioritizaci genů a interaktivní vizualizaci. (Watanabe, K. et al., 2017) podle online návodu. Databáze Panther (Protein ANalysis THrough Evolutionary Relationships), volně dostupný, ucelený softwarový systém k propojování evoluce proteinových sekvencí s evolucí specifických proteinových funkcí a biologických rolí (Mi, H. a Thomas, P., 2009), byla použita k dalšímu potvrzení genových drah/ontologií, které byly nadměrně zastoupeny a obohaceny o varianty s nejlepšími asociačními hity ($P < 1 \times 10^{-5}$).

3.2.10 Strojové učení

Pro klasifikaci tíže onemocnění byly použity nelineární modely strojového učení (machine learning, ML), protože ty v kontextu běžných poruch založených na variantách překonávají lineární ML modely (Romagnoni, A. et al., 2019). Všechny SNV s $P \leq 0,01$ v *de novo* metaanalýzách spolu s demografickými a klinickými proměnnými byly použity k vytvoření datových souborů kompatibilních s algoritmy gradient boosting (xgboost), metody strojového učení využívající kombinace slabých prediktorů založené na metodě rozhodovacích stromů (Chen a Guestrin 2016). Tréninkový soubor 70 % osob s RS byl vybrán náhodně, což zajistilo vyvážené zastoupení případů s těžkým a mírným průběhem RS. Po tréninku s interním bootstrappingem 0,7 pro 10 tisíc iterací byl model testován na zbývajících 30 % kohorty, což je konzervativní přístup, aby se předešlo přeučení (overfittingu) modelu (Park, J.H. et al., 2019). Dále byla implementována pomalá míra učení ($\eta = 0,01$), aby se předešlo overfittingu (Jerome, F. et al., 2000, JH, F., 2001).

Na základě prediktivních hodnot vygenerovaných na testovací sadě pro každý model a skutečných hodnot příslušnosti každého vzorku byla vygenerována matice záměn spolu se

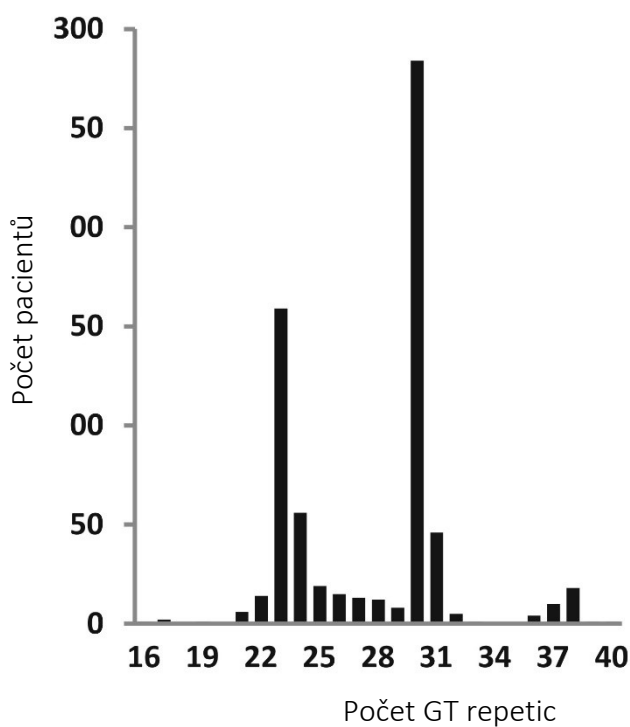
statistikami přesnosti, senzitivity, specificity a Kappa statistiky, pomocí funkce matice záměn balíčku Caret. Pro vyhodnocení přesnosti predikce a výkonnosti modelů byla vynesena Receiver Operator Characteristics, ROC a pro každý model byla vypočtena plocha pod křivkou (Area Under Curve, AUC).

4. Výsledky

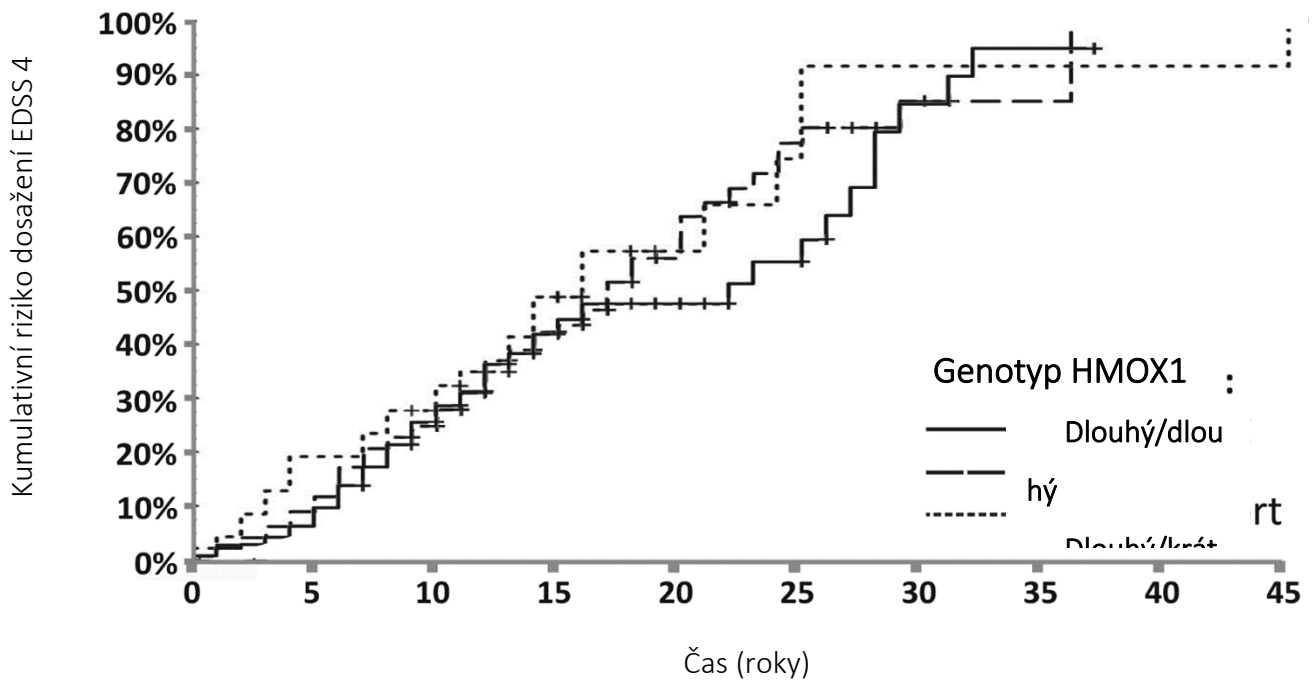
4.1 Studie I – Hem-oxygenáza 1

Analýza genotypu HMOX1 ukázala, že nejčastějšími alelami ve studované populaci jsou alely s 23 a 30 (GT) repeticemi (Obrázek 4).

85 pacientů (25 %) dosáhlo stupně EDSS 4 během 9 let od začátku onemocnění. Model logistické regrese (shoda modelu s pozorováním: $P = 0,8$, $\chi^2_8 = 4,8$, Hosmer-Lemeshowův test; prediktivní hodnota: 77 %) neprokázal statisticky významný efekt HMOX1 polymorfizmu na rychlost progresu postižení u RS ($P = 0,9$, Wald1 = 0,01). To bylo potvrzeno analýzou kumulativního rizika dosažení stupně EDSS 4, které se nelišilo u pacientů s rozdílnými HMOX1 genotypy (Obrázek 5, $P = 0,7$, Wald = 0,14, Cox model).



Obrázek 4: Distribuce alel HMOX1



Obrázek č. 5: Kumulativní riziko dosažení stupně EDSS 4

Legenda: EDSS – Expanded Disability Status Scale

Proměnné signifikantně asociované s rychlostí progresu postižení byly následující: klinický průběh RS ($b = 1,3$; $P = 0,4$; Wald1 = 4,1), délka léčby DMDs ($b = -0,2$; $P < 0,001$; Wald1 = 13,6) a věk začátku RS ($b = 0,06$; $P < 0,001$; Wald1 = 12,9; logistická regrese). Z *Tabulky 1* je patrné, že mezi pacienty s rychlou progresí postižení bylo vyšší zastoupení těch s primárně progresivní formou RS ($P < 0,0001$, $\chi^2_1 = 16,6$, χ^2 test), nižší zastoupení těch, kteří byli léčeni DMDs ($P < 0,001$, $\chi^2_1 = 9,8$, χ^2 test) a vyšší zastoupení pacientů s pozdějším nástupem prvních příznaků RS ($P < 0,0001$, $t_{336} = 5,2$, t-test), to vše ve srovnání s osobami s oddálenou progresí postižení. Oproti tomu věk a trvání léčby imunosupresivy neměly signifikantní efekt na rychlost rozvoje postižení ($P > 0,4$; Wald₁ ≤ 0,6). *Tabulka 4* porovnává skupiny pacientů s různým HMOX1 genotypem. V souladu s výsledky ostatních analýz nebyly nalezeny statisticky významné rozdíly mezi oběma skupinami. Pozorovali jsme trend k vyšší prevalenci primárně progresivní RS u homozygotů pro krátkou alelu (tj. méně než 25 GT repetice) ve srovnání s osobami s jinými genotypy; statistické významnosti nicméně dosaženo nebylo ($P = 0,6$, $\chi^2 = 9,8$, χ^2 test).

Tabulka 4: Porovnání subjektů podle polymorfismu promotoru HMOX1

	Alela HMOX1		
	dlouhá / dlouhá [†]	dlouhá / krátká [†]	krátká / krátká [†]
Subjekty, počet (ženy:muži)	145 (104:41)	146 (102:44)	47 (33:14)
Věk, roky ± SD	45 ± 11	43 ± 9	45 ± 12
Typ RS, počet (%)			
relaps remitentní / sekundárně progresivní	138 (95 %)	143 (99 %)	43 (91 %)
primárně progresivní	8 (5 %)	2 (1 %)	4 (9 %)
EDSS ≥ 4 během 9 let trvání RS, počet (%)	74 (51 %)	69 (47 %)	27 (57 %)

[†] alely byly označeny jako dlouhé (≥25 GT repetice) a krátké (<25 GT repetice)

Legenda: RS – Roztroušená skleróza, EDSS – Expanded Disability Status Scale

4.2 Studie 2 – Phenotype/Genotype Project

4.2.1 Výzkumný soubor

Soubor tvořilo 5851 osob evropského původu s roztroušenou sklerózou s relaps remitentním počátkem (Obrázek 3a, 3b). Osoby, které splnily minimální kritéria pro zařazení do studie (Obrázek 2), představovaly 63 072 paciento-roků sledování. Z nich bylo 1 813 (31 %), představujících 22 884 patientských let sledování, genotypizováno a zahrnuto do následných analýz (Tabulka 3 a, b). Jsou uvedeny klinické a demografické charakteristiky souboru na základě skóre I-ARMSS (Tabulka 5) a I-MSSS (Tabulka 6). Charakteristiky kohort podle jednotlivých zemí jsou uvedeny v Tabulce 7. Korelace mezi skóre I-ARMSS a I-MSSS byla silná ($r = 0,90$, $P < 0,0001$). Trajektorie onemocnění jednotlivých pacientů na základě přiřazení I-ARMSS nebo I-MSSS jsou uvedeny na Obrázku 6 a, b.

Tabulka 5: Charakteristika kohorty rozdělené podle longitudinálního ARMSS skóre (I-ARMSS)

Characteristika		Hodnoceno pro vstup do studie			Genotypizování – Prošli QC			Cohenovo d Mírná vs závažná
		Celkem n = 5851	Mírná RS n = 1180	Závažná RS n = 1167	Celkem n = 1813	Mírná RS n = 447	Závažná RS n = 464	
Populace	Australská	1993 (34,1)	625 (53,0)	375 (32,1)	676 (37,3)	209 (46,8)	161 (34,7)	
n(%)	Česká	2664 (45,5)	346 (29,3)	497 (42,6)	716 (39,5)	156 (34,9)	164 (35,3)	
	Španělská	1194 (20,4)	209 (17,7)	295 (25,3)	421 (23,2)	82 (18,3)	139 (30,0)	
I-ARMSS skóre	Medián (IQR)	4,53 (2,79; 6,55)	1,49 (0,93; 1,97)	8,24 (7,63; 8,91)	4,13 (2,43; 7,21)	1,49 (0,96; 2,03)	8,55 (7,92; 9,12)	10,40
	Rozptyl	0,08 – 9,99	0,08 – 2,39	7,13 – 9,99	0,14 – 9,98	0,14 – 2,38	7,13 – 9,98	
Typ průběhu onemocnění	RRMS	5075 (86,7)	1150 (97,5)	743 (63,7)	1471 (81,1)	438 (98,0)	226 (48,7)	
n (%)	SPMS	776 (13,2)	30 (2,5)	424 (36,3)	342 (18,9)	9 (2,0)	238 (51,3)	
Pohlaví n (%)	Ženy	4261 (72,8)	889 (75,3)	809 (69,3)	1313 (72,4)	337 (75,4)	316 (68,1)	
	Muži	1590 (27,2)	291 (24,7)	358 (30,7)	500 (27,6)	110 (24,6)	148 (31,9)	
Datum počátku onemocnění (měsíc, rok)	Medián (IQR)	List 2001 Led 1995-Kvě 2007	Bře 2004 Čvc 1997-Čvn 2008	Čvc 1997 Led 1991-Led 2004	Led 2000 Čvc 1993-Led 2005	Pro 2001 Říj 1995-Kvě 2006	Srp 1995 Čvc 1989-Led 2000	
Věk počátku onemocnění	Medián (IQR)	29,2 (23,4; 36,5)	34,3 (27,7; 41,9)	26,0 (20,9; 32,1)	28,3 (22,7; 35,7)	32,3 (26,4; 39,6)	27,2 (22,1; 33,1)	0,58
Věk při poslední návštěvě	Medián (IQR)	47,2 (39,7; 56,4)	50,5 (42,8; 58,5)	47,4 (40,0; 56,1)	48,1 (40,9; 57,2)	51,2 (43,5; 58,6)	51,1 (43,6; 58,5)	0,003
	Rozptyl	17,4 – 87,6	20,2 – 87,6	17,4 – 80,1	17,4 – 84,5	25,2 – 83,1	17,4 – 80,1	
Délka sledování v MSBase (roky)	Medián (IQR)	10,1 (7,5; 13,3)	9,2 (7,0; 12,1)	10,9 (8,3; 15,0)	11,7 (9,7; 15,2)	11,2 (9,4; 14,1)	12,5 (10,2; 16,2)	0,32
	Rozptyl	5,0 – 54,8	5,0 – 32,2	5,0 – 47,0	5,1 – 32,2	5,1 – 32,2	5,2 – 29,1	
Počet hodnocení EDSS	Medián (IQR)	18 (11; 31)	13 (9; 20)	18 (11; 31)	21 (14; 34)	17 (12; 26)	19 (12; 30)	0,10
	Rozptyl	3 – 91	3 – 91	3 – 85	3 – 91	3 – 91	3 – 85	
Délka trvání onemocnění (roky)	Medián (IQR)	16,0 (10,7; 23,1)	13,8 (9,7; 20,2)	20,6 (14,3; 26,9)	18,1 (13,2; 24,4)	16,2 (11,9; 22,0)	22,2 (17,5; 28,0)	0,61
	Rozptyl	5,1 – 66,6	5,1 – 58,5	5,3 – 57,1	5,6 – 55,4	5,9 – 55,4	6,7 – 50,4	
% času expozice DMDs	Medián (IQR)	82,9 (36,1; 97,6)	82,04 (14,6; 97,3)	67,4 (18,3; 93,3)	79,7 (37,6; 96,6)	79,9 (29,8; 97,8)	60,6 (17,3; 91,2)	0,22
	Rozptyl	0-100	0-100	0-100	0-100	0-100	0-100	
ARR	Medián (IQR)	0,16 (0; 0,38)	0,10 (0; 0,19)	0,17 (0; 0,44)	0,17 (0,06; 0,36)	0,10 (0; 0,22)	0,17 (0,06; 0,39)	0,43
	Rozptyl	0 – 2,45	0 – 1,28	0 – 2,45	0 – 1,62	0 – 1,01	0 – 1,54	
wGRS	Průměr (SD)	-	-	-	2,85 (0,79)	2,71 (0,80)	2,90 (0,78)	0,23

Zkratky: ARMSS – Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score; EDSS – Expanded Disability Status Scale; ARR – Annualised Relapse Rate; wGRS – weighted Genetic Risk Score; IQR – mezikvartilové rozpětí; SD – standardní odchylka

Tabulka 6: Charakteristika kohorty rozdělené podle longitudinálního MSSS skóre (I-MSSS)

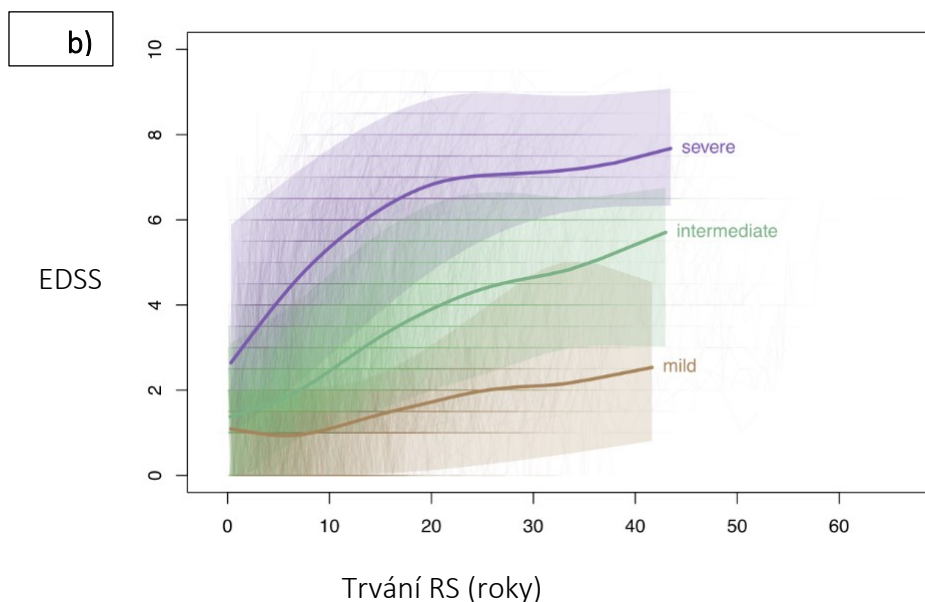
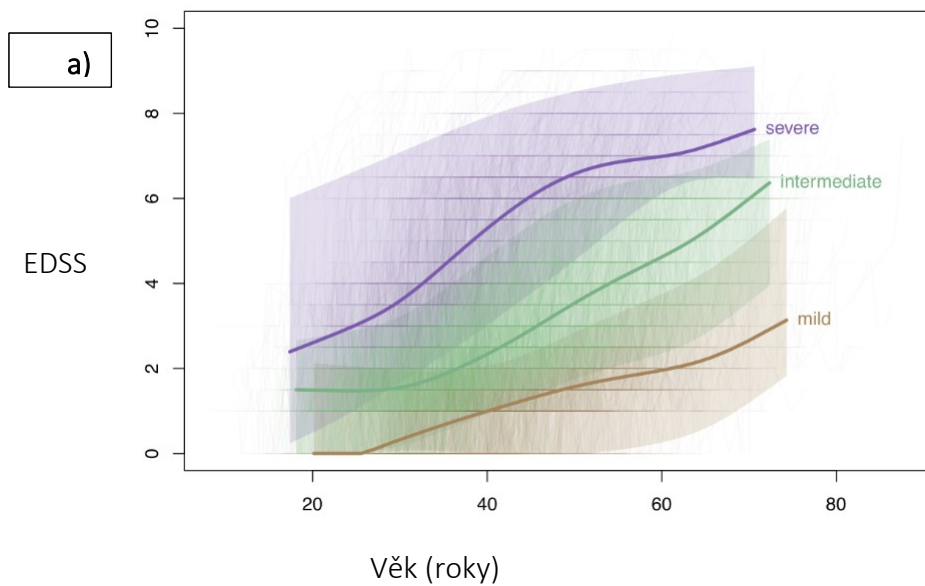
		Hodnoceno pro vstup do studie			Genotypizovaní – prošli QC			
Charakteristika		Celkem n = 5851	Mírná RS n = 1232	Závažná RS n = 1162	Celkem n = 1813	Mírná RS n = 585	Závažná RS n = 466	Cohenovo d (genotypizovaní, mírná vs závažná RS)
Populace n (%)	Australská	1993 (34.1)	574 (46.6)	419 (36.1)	676 (37.3)	218 (37.2)	174 (37.3)	
	Česká	2664 (45.5)	427 (34.7)	442 (38.0)	716 (39.5)	263 (45.0)	166 (35.6)	
	Španělská	1194 (20.4)	231 (18.7)	301 (25.9)	421 (23.2)	104 (17.8)	126 (27.1)	
MSSS Skóre	Medián (IQR)	3;17 (1.74; 5.28)	0;84 (0.53; 1.15)	7;37 (6.52; 8.31)	2;44 (1.21; 5.99)	0;88 (0.57; 1.17)	7;41 (6.61; 8.47)	5,03
	Rozptyl	0.05 – 9.95	0.05 – 1.45	2.34 – 9.95	0.05 – 9.95	0.05 – 1.45	2.34 – 9.95	
Typ průběhu RS	RRMS	5075 (86.7)	1218 (98.9)	741 (63.8)	1471 (81.1)	576 (98.5)	227 (48.7)	
	SPMS	776 (13.3)	14 (1.1)	421 (36.2)	342 (18.9)	9 (1.5)	239 (51.3)	
	Ženy	4;261 (72.8)	924 (75.0)	811 (69.8)	1;313 (72.4)	440 (75.2)	326 (70.0)	
Pohlaví n (%)	Muži	1;590 (27.2)	308 (25.0)	351 (30.2)	500 (27.6)	145 (24.8)	140 (30.0)	
	Věk počátku onemocnění (AAO)	Medián (IQR)	29;2 (23.4; 36.5)	26;6 (21.3; 32.2)	32;4 (25.2; 41.4)	28;3 (22.7; 35.7)	25;6 (21.3; 31.3)	30;5 (24.7; 39.5)
Věk při poslední návštěvě	Medián (IQR)	47;2 (39.7; 56.4)	44;9 (38.2; 52.7)	52;9 (44.2; 61.1)	48;1 (40.9; 57.2)	45;5 (39.2; 53.4)	53;8 (46.5; 61.8)	0,72
	Rozptyl	17.4 – 87.6	17.4 – 83.1	20.6 – 87.6	17.4 – 84.5	19.5 – 83.1	26.3 – 81.4	
Délka sledování v MSBase (roky)	Medián (IQR)	10;1 (7.5; 13.3)	10;2 (7.8; 13.6)	10 (7.2; 13.2)	11;7 (9.7; 15.2)	11;7 (9.7; 15.5)	11;9 (9.7; 15.3)	0,02
	Rozptyl	5.0 – 54.8	5.0 – 32.2	5.0 – 47.0	5.1 – 32.2	5.3 – 32.2	5.1 – 29.1	
Počet hodnocení EDSS	Medián (IQR)	18 (11; 31)	15 (9; 25)	16 (10; 25)	21 (14; 34)	19 (13; 36)	18 (12; 28)	0,27
	Rozptyl	3 – 91	3 – 91	3 – 78	3 – 91	3 – 91	3 – 78	
Délka trvání onemocnění (roky)	Medián (IQR)	16 (10.7; 23.1)	17;1 (11.7; 23.5)	17;4 (11.1; 24.6)	18;1 (13.2; 24.4)	18;7 (13.8; 24.7)	21 (15.1; 26.8)	0,23
	Rozptyl	5.1 – 66.6	5.1 – 56.2	5.1 – 57.1	5.6 – 55.4	5.9 – 55.4	6.1 – 50.4	
% času expozice DMD (%)	Medián (IQR)	82;9 (36.1; 97.6)	80;5 (22.7; 97.0)	63;42 (11.5; 93.6)	79;7 (37.6; 96.6)	83 (37.7; 97.9)	58;5 (13.4; 91.6)	0,36
	Rozptyl	0-100	0-100	0-100	0-100	0-100	0-100	
ARR	Medián (IQR)	0.16 (0; 0.38)	0.12 (0; 0.25)	0.15 (0; 0.36)	0.17 (0.06; 0.36)	0.13 (0; 0.29)	0.14 (0; 0.33)	0,16
	Rozptyl	0 – 2.45	0 – 1.17	0 – 1.54	0 – 1.62	0 – 1.17	0 – 1.54	
wGRS	Průměr (SD)	-	-	-	2.85 (0.79)	2.80 (0.80)	2.86 (0.78)	0,08

Legenda: MSSS – Multiple Sclerosis Severity Scale; EDSS – Expanded Disability Status Scale; ARR – Annualised Relapse Rate; wGRS – weighted Genetic Risk Score; IQR – mezikvartilové rozpětí; SD – standardní odchylka

Tabulka 7: Charakteristiky kohorty, která prošla kontrolou kvality – rozdělena podle země původu

Země původu		Celkem	Austrálie (AU)	Česká republika (CZ)	Španělsko (ES)
Počet případů		1813	676	716	421
Pohlaví	Ženy (%)	1313 (72,4)	524 (77,5)	503 (70,3)	286 (67,9)
Závažnost RS					
Longitudinální ARMSS	Medián	4,13	4,11	3,75	4,9
	Rozptyl	0,14-9,98	0,14-9,94	0,52-9,98	0,19-9,92
Longitudinální MSSS	Medián	2,44	2,82	1,98	3,29
	Rozptyl	0,05 – 9,95	0,05 – 9,78	0,13 – 9,95	0,05 – 9,74
Věk počátku RS	Medián	28,3	30,2	26,2	28,6
	Rozptyl	6,5 – 63,6	6,5 – 63,6	7,6 – 62,7	10,7 – 56,2
Věk při poslední návštěvě	Medián	48,1	51,6	45,1	49,8
	Rozptyl	17,4 – 84,5	19,5 – 84,5	17,4 – 77,4	24,7 – 80,1
Trvání onemocnění, roky	Medián	18,1	18,1	17,8	18,9
	Rozptyl	5,0-55,4	5,0-55,4	6,1 – 52,3	5,9 – 55,4
wGRS	Průměr (SD)	2,85 (0,79)	2,79 (0,81)	2,86 (0,77)	2,90 (0,79)

Legenda: ARMSS – Age-Related Multiple Sclerosis Severity; MSSS – Multiple Sclerosis Severity Scale; wGRS – weighted Genetic Risk Score



Obrázek 6 a) Trajektorie nárůstu EDSS v závislosti na věku pro účastníky studie rozdělené na mírný (hnědá), střední (zelená) a závažný (fialová) průběh RS podle mediánu longitudinálního ARMSS skóre, b) Trajektorie nárůstu EDSS v závislosti na délce trvání RS pro účastníky studie rozdělené na mírný (hnědá), střední (zelená) a závažný (fialová) průběh RS podle mediánu longitudinálního MSSS skóre.

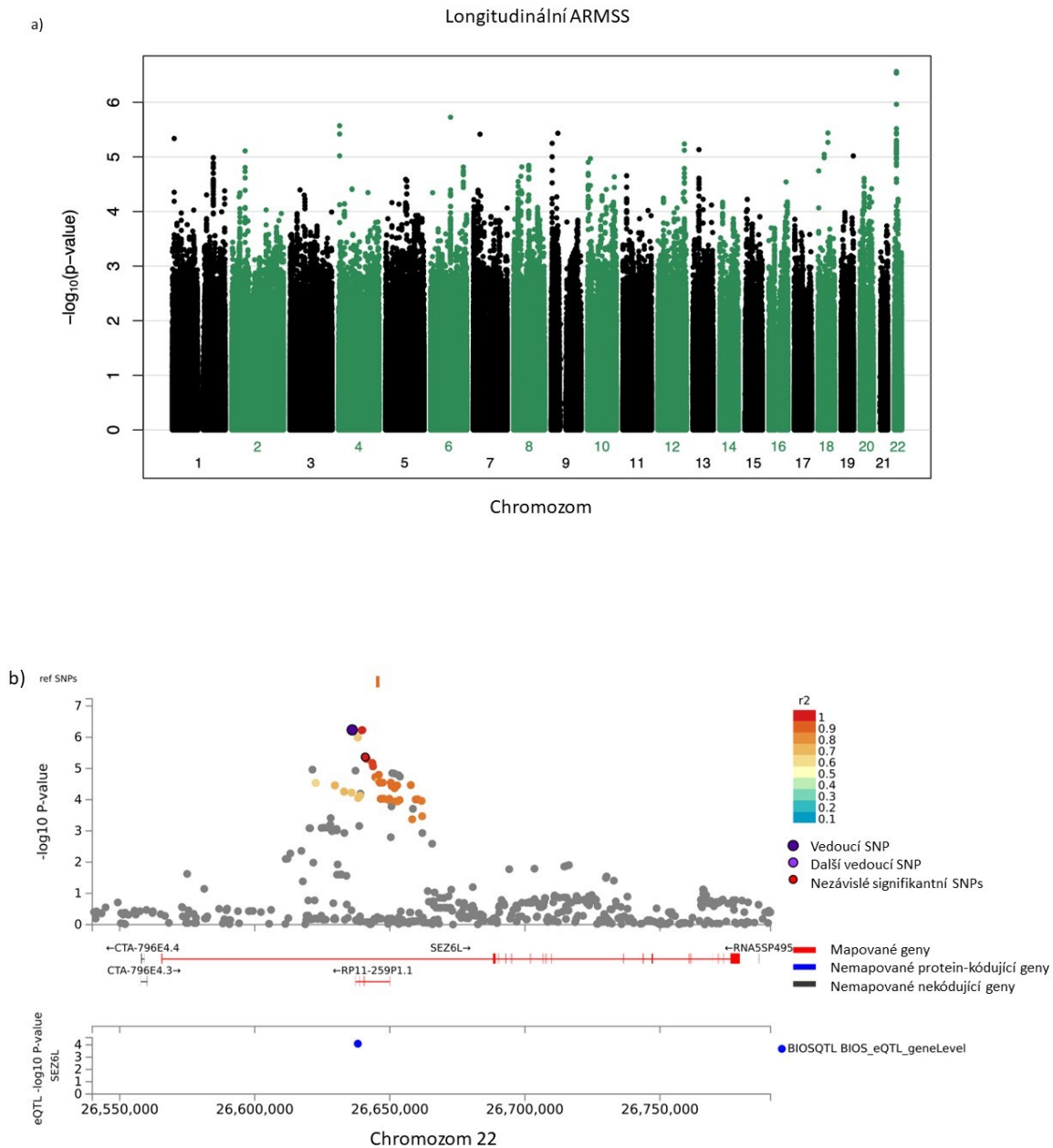
Legenda: RS – roztroušená skleróza; EDSS – Expanded Disability Status Scale; ARMSS – Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score; MSSS – Multiple Score Severity Score

4.2.2 Primární analýzy

4.2.2.1 Celogenomové vyhledávání asociací SNVs spojených s longitudinálními mírami tíže RS

Nejprve byla provedena celogenomová asociační analýza s cílem identifikovat nové varianty spojené s kontinuálními fenotypy I-ARMSS. Regresní analýzy fenotypů I-ARMSS byly *a priori* adjustovány na prvních 5 PC, počet nesených alel HLA-DRB1*15:01, procento doby vystavení DMDs a dále na nevyvážené proměnné (Cohenovo $d > 0,15$, *Tabulka 4*). Metaanalýza s fixními efekty neidentifikovala žádné SNV, které by přesáhly celogenomovou významnost ($P < 5 \times 10^{-8}$; *Tabulka 8, Obrázek 7 a, b; Tabulka 9; Obrázek 2*). Stejně tak adjustované analýzy I-MSSS neidentifikovaly žádné významné asociace týkající se kontinuálních fenotypů (*Tabulka 8; Tabulka 10, Obrázek 7*). Posouzení lokalizací SNV v genomu s $P < 1 \times 10^{-5}$ pro fenotyp podle I-ARMSS ukázalo, že 55,1 % ($P = 6,63 \times 10^{-3}$ pro obohacení) signálů se nacházelo v mimogenových oblastech a 34,7 % bylo v intronických oblastech. To se číselně lišilo od analýzy podle I-MSSS, kde se 47,9 % SNVs nacházelo v intronických ($P = 5,41 \times 10^{-3}$ pro obohacení) a 36,8 % v mezigenových oblastech ($P = 0,0193$). Podrobnější údaje jsou součástí publikace (Jokubaitis, V.G. et al., 2022).

Přehled nejvýznamnějších variant spojených s kontinuálními analýzami I-ARMSS a I-MSSS je uveden v *Tabulce 8*. Nejsilnějším signálem v kontinuální analýze I-ARMSS byla varianta rs7289446 ($\beta = -0,4882$, $P = 2,73 \times 10^{-7}$), intronická k SEZ6L, genu spojenému s hustotou a arborizací dendritických trnů (Nash et al. 2020). Nejsilnějším signálem v kontinuální analýze I-MSSS byla rovněž varianta intronická k SEZ6L, rs1207401 ($\beta = -0,4841$, $P = 2,88 \times 10^{-7}$). Tyto dva SNV spojené se SEZ6L jsou v dokonalé vazebné nerovnováze ($R^2 = 1$, $D' = 1$; *Obrázek 7*, (Jokubaitis, V.G. et al., 2022)).



Obrázek 7: Metaanalýza s fixními efekty neidentifikovala žádné SNV, které by přesáhly celogenomovou významnost a) Kontinuální l-ARMSS GWAS upravená metaanalýza s fixními efekty: Manhattanův graf, b) oblast genu SEZ6L na chromozomu 22 vykazuje řadu SNV ve vysoké vyzebné nerovnováze s vedoucí SNV (*rs7289466*), ačkoli jsou přítomny i nezávislé SNV (šedá barva).

Legenda: SNV – jednonukleotidové varianty, l-ARMSS – longitudinal Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score, GWAS – celogenomová asociační studie

Tabulka 8: Výsledky metaanalýz s fixními efekty: top SNV pro 10 nejbližších genů pro fenotypy definované pomocí I-ARMSS a I-MSSS a top SNV pro 5 nejbližších genů v analýzách stratifikovaných podle pohlaví.

rsID	Chr	Pořadí v žebříčku SNV	Pořadí podle nejbližšího genu	Nejbližší gen	Menší alela	MAF	adj p(fe) ^{ab}	β
I-ARMSS^a, n = 1813								
rs7289446	22	1	1	SEZ6L	G	0,27	2,73E-07	-0,488
rs1207401	22	2	1	SEZ6L	A	0,27	2,90E-07	-0,490
rs7758683	6	6	2	EPHA7	T	0,23	1,88E-06	-0,477
rs56089601	4	7	3	STK32B	C	0,10	2,69E-06	0,655
rs12953974	18	10	4	CTIF	A	0,12	3,64E-06	-0,607
rs56194930	9	11	5	ACO1	G	0,11	3,69E-06	0,648
rs73091975	7	14	6	CCDC129	G	0,09	3,84E-06	-0,680
rs2274333	1	16	7	CA6	G	0,29	4,60E-06	-0,429
rs295254	9	20	8	RCLI	G	0,38	5,64E-06	0,388
rs11057374	12	21	9	DNAH10	G	0,35	5,79E-06	-0,390
rs111399831	13	29	10	SUCLA2	A	0,21	7,34E-06	-0,468
I-MSSS^b, n = 1813								
rs1207401	22	1	1	SEZ6L	A	0,27	2,88E-07	-0,484
rs7289446	22	4	1	SEZ6L	G	0,27	3,35E-07	-0,479
rs9643199	8	6	2	MTSSI	A	0,26	1,90E-06	0,465
rs2725556	15	22	3	UNC13C	A	0,08	2,39E-06	0,709
rs61578937	8	23	4	NCOA2	G	0,13	2,86E-06	-0,562
rs7758683	6	27	5	EPHA7	T	0,23	3,61E-06	-0,456
rs56089601	4	32	6	STK32B	C	0,10	4,65E-06	0,631
rs4495680	1	33	7	RGS13	G	0,41	5,65E-06	-0,390
rs56363129	10	42	8	SEPHSI	G	0,15	6,56E-06	0,516
rs111399831	13	47	9	SUCLA2	A	0,15	7,07E-06	-0,534
I-ARMSS Pouze ženy, n = 1313								
rs1219732	10	1	1	CPXM2	T	0,35	6,48E-08	0,569
rs10967273	9	3	2	LOC100506422	T	0,13	1,16E-07	0,799
rs4572384	16	15	3	CRISPLD2	A	0,40	2,77E-06	0,487
rs2776741	1	16	4	RCAN3AS	A	0,31	2,98E-06	-0,516
rs61873874	10	18	5	MKI67	A	0,05	3,39E-06	1,007
I-ARMSS Pouze muži, n = 500								
rs7315384	12	1	1	STAB2	C	0,24	1,29E-07	1,041
rs7070182	10	2	2	TCF7L2	C	0,18	3,65E-07	-1,112
rs11845242	14	4	3	LINC00520	G	0,41	5,63E-07	-0,800
rs3885012	12	5	4	PHLDA1	G	0,06	1,19E-06	-1,499
rs11665069	18	7	5	FHOD3	C	0,41	1,34E-06	0,755
I-MSSS Pouze ženy, n = 1313								
rs10967273	9	1	1	LOC100506422	T	0,13	3,52E-08	0,830
rs9643199	8	2	2	MTSSI	A	0,26	6,54E-08	0,631
rs17169210	5	4	3	SLC25A48	C	0,23	1,25E-07	-0,621
rs1219732	10	7	4	CPXM2	T	0,35	1,70E-07	0,550
rs61873874	10	50	5	MKI67	A	0,05	1,45E-06	1,051
I-MSSS Pouze muži, n = 500								
rs698805	2	1	1	CAMKMT	G	0,07	4,35E-08	-1,540
rs7315384	12	2	2	STAB2	C	0,24	8,00E-08	1,020

rs3885012	12	14	4%	PHLDA1	G	0,06	3,69E-07	-1,312
rs7070182	10	35	5	TCF7L2	C	0,18	3,86E-07	-1,054
rs28442172	18	51	6	FHOD3	G	0,13	2,13E-06	-1,105

fe: Fixed-effects meta-analýzy (n=6) adjustované na prvních 5 hlavních komponent (PCs)

a: I-ARMSS analýzy adjustované na: % času na terapii od začátku onemocnění, weighted Genetic Risk Score (wGRS), počet DRB1*1501 alel, a nevyvážené proměnné: délku sledování v MSBase (roky), délku trvání onemocnění (roky), Annualised Relapse Rate (ARR)

b: I-MSSS analýzy adjustované na: % času na terapii od začátku onemocnění, weighted Genetic Risk Score (wGRS), počet DRB1*1501 alel, a nevyvážené proměnné včetně: věku při poslední návštěvě, počet hodnocení EDSS, délka trvání onemocnění (roky)

% třetí nejbližší genový hit měl >80% heterogenitu

Legenda: rsID – označení jednonukletidového polymorfismu, Chr – chromozom, MAF – frekvence menší alely, PCs – hlavní komponenty, I-ARMSS – longitudinal Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score, I-MSSS longitudinal Multiple Sclerosis Severity Score, wGRS – vážené genetické skóre rizika roztroušené sklerózy, ARR – roční výskyt relapsů, EDSS – Expanded Disability Status Scale

4.2.2.2 Analýzy dědivosti

K odhadu podílu genetické architektury na variabilitě tíže RS definované pomocí I-ARMSS nebo I-MSSS, byly pro naši kohortu (n = 1 813) vypočteny odhady dědivosti v úzkém slova smyslu (h^2g). Při použití metody GREML od GCTA byl celkový odhad dědivosti pro fenotyp I-ARMSS h^2g 0,19 (SE 0,15, P = 0,02). Podobných odhadů bylo dosaženo i při použití alternativních nástrojů pro odhad heritability (Jokubaitis, V.G. et al., 2022). Celkový odhad heritability I-MSSS h^2g byl o něco vyšší než u I-ARMSS (h^2g 0,29; SE 0,14, P = 0,001). Alternativní odhady dědivosti pro I-MSSS se však ukázaly jako velmi nekonzistentní (Jokubaitis, V.G. et al., 2022).

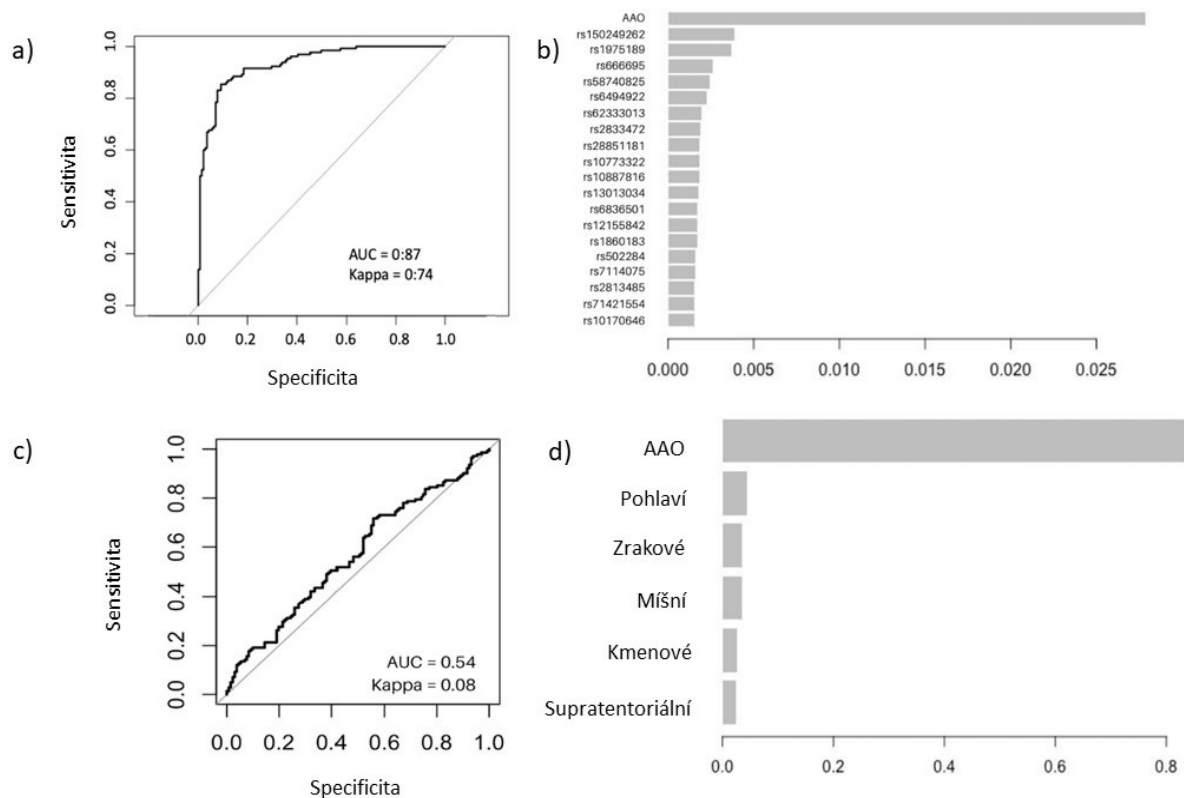
4.2.2.3 Strojové učení

Vzhledem k tomu, že náš přístup GWAS podle očekávání neidentifikoval žádné SNVs, které by překročily prahy významnosti, byl implementován algoritmus ML xgboost (Chen a Guestrin 2016) s cílem zjistit, zda by nelineární model ML mohl najít genetické asociace se závažností, které by tradiční GWAS nemohl odhalit. Byly zadány všechny SNV s I-ARMSS GWAS P < 0,01, což představuje 62 351 variant. Žádné variantě však nebyla přiřazena hladina významnosti větší než

0,005, což potvrzuje, že žádná genetická varianta nepřispívá významně k závažnosti roztroušené sklerózy.

4.2.2.4 Predikce klinického průběhu pomocí strojového učení

Protože model ML blíže neosvětlil základní genetickou architekturu závažnosti roztroušené sklerózy, snažili jsme se zjistit, zda lze ML použít k předpovědi závažnosti na základě extrémních výsledků I-ARMSS (n = 447 mírná, n = 464 těžká). Algoritmus ML byl vycvičen na 70 % (n = 638 I-ARMSS) souboru a poté testován na zbývajících 30 % (n = 273 I-ARMSS). Zahrnuli jsme SNVs s I-ARMSS GWAS $P \leq 0,01$, jak je uvedeno výše, spolu s AAO a wGRS. Klasifikační algoritmus měl vysokou prediktivní přesnost s AUROC 0,835 (95% CI 0,79 - 0,88). Přidání pohlaví a lokalizace prvních příznaků k výše uvedenému nemělo podstatný vliv na výsledky ML (AUROC 0,836, 95% CI 0,79 - 0,88; *Obrázek 8 a, b*), s 89% senzitivitou a 79% specificitou; pozitivní prediktivní hodnotou (PPV) 80 % a negativní prediktivní hodnotou (NPV) 88 %. Klasifikace závažnosti I-ARMSS založená pouze na klinických a demografických proměnných dostupných na počátku sledování (AAO, pohlaví, typ prvních příznaků) nedosáhla lepších výsledků než náhoda s AUROC 0,54 (95% CI 0,48-0,60), senzitivitou 50 % a specificitou 58 %; s PPV 53 % a NPV 55 % (*Obrázek 8 c, d*). Omezení algoritmu pouze na SNV s $P < 1 \times 10^{-5}$ v I-ARMSS GWAS (n=336) nepatrně snížilo prediktivní přesnost na AUROC=0,82 (95% CI 0,77 - 0,87), což potvrdilo polygenní povahu genetické architektury tíže RS.



Obrázek 8: Klasifikace mírných a závažných případů pomocí algoritmu strojového učení.

a) l-ARMSS + wGRS + AAO model strojového učení, AUROC 0,84, b) Důležitost použitých rysů pro l-MSSS + wGRS + AAO model strojového učení, c) AAO + pohlaví + typ prvních příznaků model strojového učení, AUROC 0,54, d) důležitost použitých rysů pro AAO + pohlaví + typ prvních příznaků - model strojového učení.

Legenda: l-ARMSS – longitudinal Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score, wGRS – vážené genetické skóre rizika roztroušené sklerózy, AAO – věk počátku roztroušené sklerózy, l-MSSS longitudinal Multiple Sclerosis Severity Score, AUROC – plocha pod křivkou operační charakteristiky přijímače

4.2.3 Sekundární analýzy

4.2.3.1 Celogenomové vyhledávání asociací a SNV longitudinálních měř závažnosti stratifikované podle pohlaví

Vzhledem k tomu, že primární analýzy neidentifikovaly signály významné na úrovni celého genomu, byly provedeny analýzy stratifikované podle pohlaví ke zjištění, zda jsou účinky variant vázané na pohlaví. *Tabulka 8* shrnuje SNV nejbližší pěti nejvýznamnějším genovým oblastem pro každé pohlaví. Bylo zjištěno, že intergenová varianta rs10967273, je spojena s

tíží RS definovanou I-MSSS u žen ($\beta_{female} = 0,8289$, $P = 3,52 \times 10^{-08}$, (Jokubaitis, V.G. et al., 2022)). V analýze I-ARMSS tato varianta nepřekročila hranici významnosti ($\beta_{female} = 0,7994$, $P = 1,17 \times 10^{-07}$).

U mužů byla indentifikována SNV rs698805 intronicky ke CAMKMT ($\beta_{male} = -1,5395$, $P = 4,35 \times 10^{-08}$) jako asociovaná se závažností definovanou I-MSSS (Tabulka 8). Tato varianta nepřekročila prahové hodnoty GWAS v analýze I-ARMSS ($\beta_{male} = -1,4199$, $P = 5,64 \times 10^{-06}$). Varianty identifikované v našich analýzách stratifikovaných podle pohlaví nebyly spojeny se závažností u opačného pohlaví (Jokubaitis, V.G. et al., 2022). Nebyly indentifikovány žádné nové genetické asociace s věkem při nástupu onemocnění (Jokubaitis, V.G. et al., 2022).

4.2.3.2 Analýzy obohacení genových sad

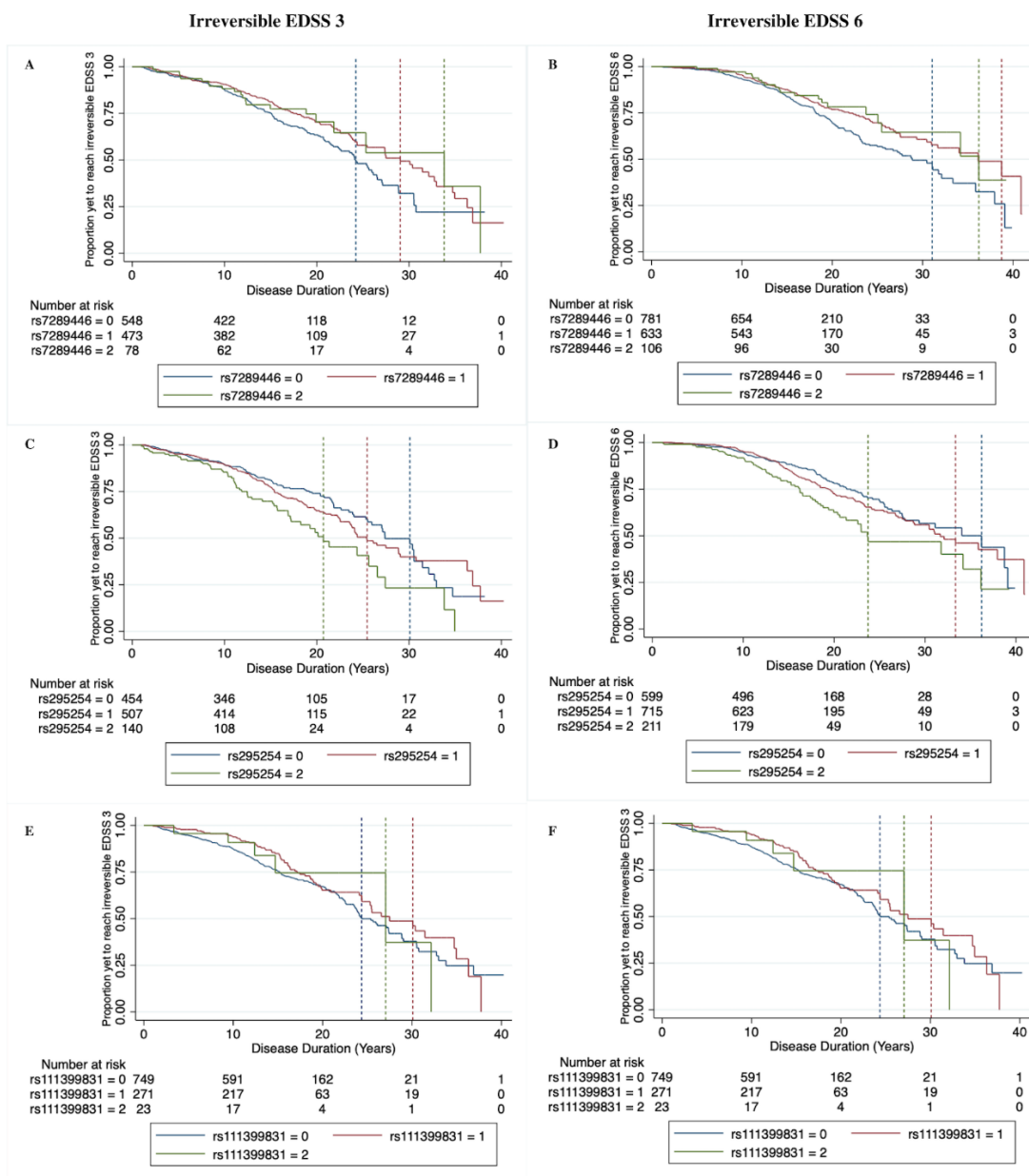
Analýza obohacení genových sad zaměřená na identifikaci genů různě exprimovaných v různých tkáních implementovaná ve FUMA odhalila nadměrné zastoupení genů exprimovaných mozečkovou kůrou jak pro I-ARMSS (mozečková hemisféra $P = 0,071$; mozeček $P = 0,077$);), tak pro I-MSSS (mozečková hemisféra $P = 0,017$; mozeček $P = 0,023$;) (Jokubaitis, V.G. et al., 2022). Naproti tomu geny spojené s celou krví nebyly v našich analýzách obohaceny ani u výsledků I-ARMSS ($P = 0,75$), ani u I-MSSS ($P = 0,82$). Analýzy obohacení genových sad u fenotypu I-ARMSS zahrnovaly vývoj endoteliálních buněk ($\beta = 0,43$; $P = 8,25 \times 10^{-05}$), sestavení pseudopodia ($\beta = 0,84$; $P = 2,37 \times 10^{-04}$), odpověď na progesteron ($\beta = 0,35$; $P = 2,74 \times 10^{-04}$) a aktivitu NMDA receptorů ($\beta = 1,10$; $P = 2,79 \times 10^{-04}$). Fenotyp I-MSSS byl navíc obohacen o signální dráhy Wnt ($\beta = 0,24$; $P = 2,02 \times 10^{-04}$) (Jokubaitis, V.G. et al., 2022) Obohacení genových sad bylo zkoumáno také pomocí programu Panther. Zde jsme potvrdili nadměrné zastoupení heteromerních signálních drah G-proteinů spojených s fenotypy I-ARMSS ($P = 4,98 \times 10^{-05}$, $FDR = 8,23 \times 10^{-03}$) a I-MSSS ($P = 1,00 \times 10^{-04}$, $FDR = 1,67 \times 10^{-02}$). Fenotyp AAO byl spojen s endotelinem ($P = 2,51 \times 10^{-04}$, $FDR = 4,18 \times 10^{-02}$) a kadherinovou signální dráhou ($P = 2,90 \times 10^{-04}$, $FDR = 2,42 \times 10^{-02}$).

4.2.3.3 Analýzy přežití

Bylo posouzeno, zda 30 z hlavních signálů (Tabulka 8) může hrát roli v modulaci tíže RS pomocí alternativní definice tíže, přičemž jsme využili náš soubor longitudinálních dat. V jednorozměrné i adjustované analýze byla hodnocena doba do dosažení závažných mezníků

invalidity, kterými jsou ireverzibilní EDSS 3 (irEDSS3) a ireverzibilní EDSS 6 (irEDSS6). Byly identifikovány čtyři SNV asociované s dobou do dosažení irEDSS3 a irEDSS6 jak v jednostranných, tak v adjustovaných analýzách. Tyto SNVs byly poté zkombinovány v multivariabilních analýzách s cílem zjistit, zda mohou nezávisle předpovídat dobu do dosažení těchto milníků invalidity (Jokubaitis, V.G. et al., 2022). Tři SNVs zůstaly nezávisle prediktivní pro dobu do irEDSS3 a irEDSS6 (*Obrázek 9*), včetně rs7289446 (intronická ke genu SEZ6L: irEDSS3 adjustované HR (aHR) 0,77, $P = 0,008$, *Obrázek 9 a*; irEDSS6 aHR 0,72, $P = 4,85 \times 10^{-4}$, *Obrázek 9 b*), rs295254 (intronický k RCL1: irEDSS3 aHR 1,33, $P = 9,10 \times 10^{-4}$, *Obrázek 9 c*; irEDSS6 aHR 1,32, $P = 7,37 \times 10^{-4}$, *Obrázek 9 d*) a rs111399831 (nejblíže k SUCLA2; irEDSS3 aHR 0,77, $P = 0,036$, *Obrázek 9 e*; irEDSS6 aHR 0,62, $P = 2,82 \times 10^{-4}$, *Obrázek 9 f*).

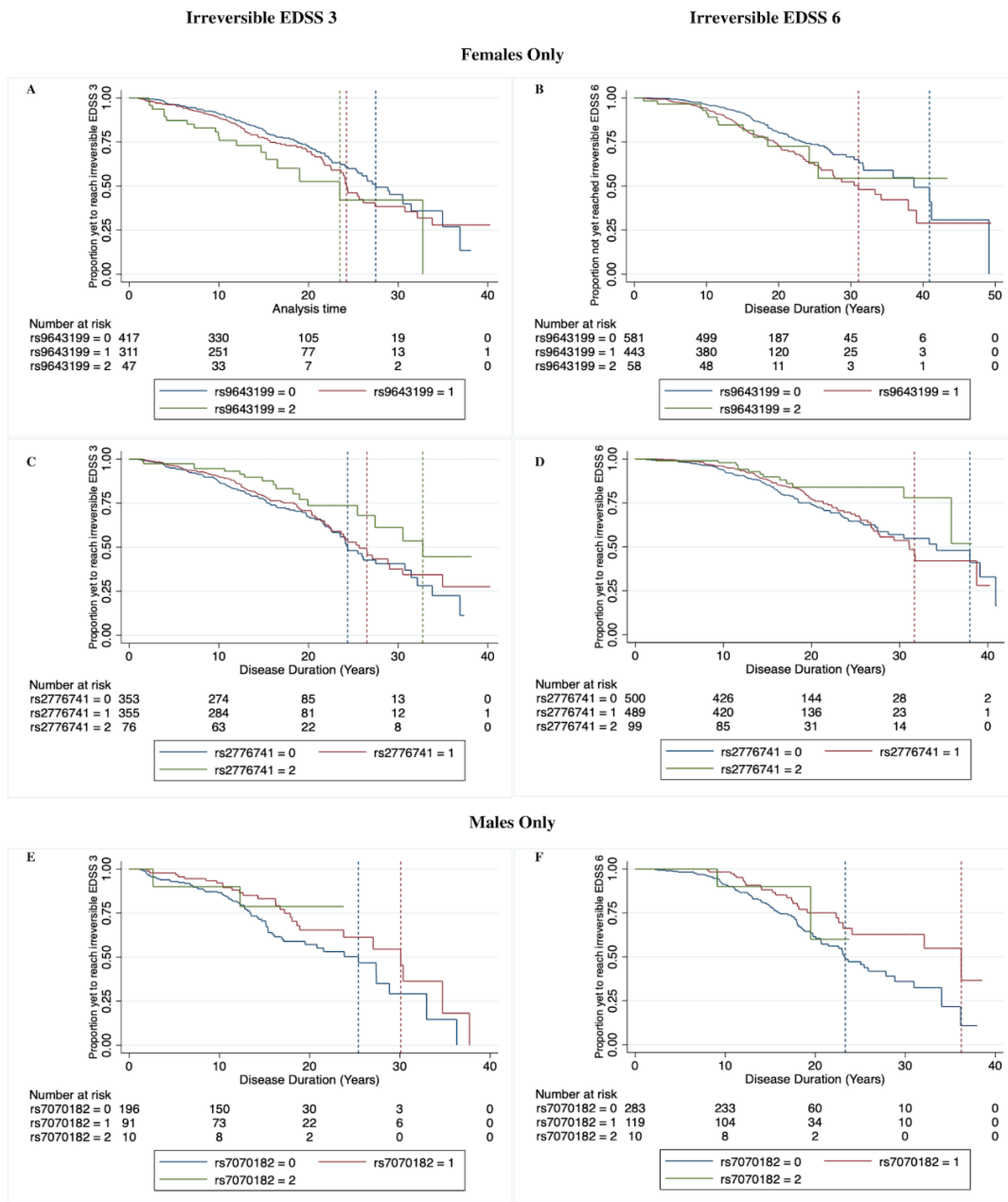
Při analýzách podle pohlaví byly identifikovány dvě SNV, které byly konzistentně spojeny s dobou do irEDSS3 a irEDSS6 u žen (*Obrázek 10*), ale ne u mužů. Nezávislými rizikovými faktory dřívějšího dosažení ireverzibilního EDSS 3 a 6 byly varinaty rs9643199 (intronická k MTSS1: irEDSS3 aHR 1,35, $P = 0,006$, *Obrázek 10 a*; irEDSS6 aHR 1,46, $P = 7,09 \times 10^{-4}$, *Obrázek 10 b*) a rs2776741 (nejblíže k RCAN3AS; irEDSS3 aHR 0,77, $P = 0,010$, *Obrázek 10 c*; irEDSS6 aHR 0,74, $P = 0,005$, *Obrázek 10 c*). SNV rs7070182 intronická k TCF7L2 (*Obrázek 10 c*) byla jedinou variantou konzistentně spojenou s dobou do irEDSS3 (aHR 0,59, $P = 0,013$, *Obrázek 10 d*) a irEDSS6 (aHR 0,56, $P = 0,005$, *Obrázek 10 e*) u mužů, bez vlivu u žen.



Obrázek 9: Kaplanovy-Meierovy křivky přežití zobrazující dobu do dosažení nevratných milníků EDSS na základě přítomnosti (1,2) nebo nepřítomnosti (0) menší alely v každém lokusu a) rs7289446 intronický k SEZ6L a čas do ireverzibilního EDSS 3 (aHR 0,77, $P = 0,008$) b) rs7289446 intronický k SEZ6L a čas do ireverzibilního EDSS 6 (aHR 0,72, $P = 4,85 \times 10^{-4}$) c) rs295254 intronický k RCL1 a čas do ireverzibilního EDSS 3 (aHR 1,33, $P = 9,10 \times 10^{-4}$) d) rs295254 intronický k RCL1 a čas do nezvratného EDSS 6 (aHR 1,32, $P = 7,37 \times 10^{-4}$) e) rs111399831 nejbliže k SUCLA2 a čas do ireverzibilního EDSS 3 (aHR 0,77, $P = 0,036$) f)

*rs11399831 nejbliže k SUCLA2 a čas do ireverzibilního EDSS 6 (aHR 0,74, P = 2,82x10⁻⁴)-
označení obrázků posunout na začátek řádku (asi stačí zmenšit písmo)*

Legenda: EDSS – Expanded Disability Status Scale



Obrázek 10: Kaplanovy-Meierovy křivky přežití zobrazující dobu do dosažení nevratných milníků EDSS na základě přítomnosti (1, 2) nebo nepřítomnosti (0) minoritní alely na každém lokusu a) rs9643199 intronický k MTSS1 čas do ireverzibilního EDSS 3 u žen b) rs9643199 intronický k MTSS1 a čas do ireverzibilního EDSS 6 u žen c) rs2776741 v blízkosti RCAN3AS a čas do ireverzibilního EDSS 3 u žen d) rs2776741 v blízkosti RCAN3AS a čas do ireverzibilního EDSS 6 u žen e) rs7070182 intronický k TCF7L2 a čas k ireverzibilnímu EDSS 3 u mužů f) rs7070182 intronický k TCF7L2 a čas k ireverzibilnímu EDSS 6 u mužů.

Legenda: EDSS – Expanded Disability Status Scale

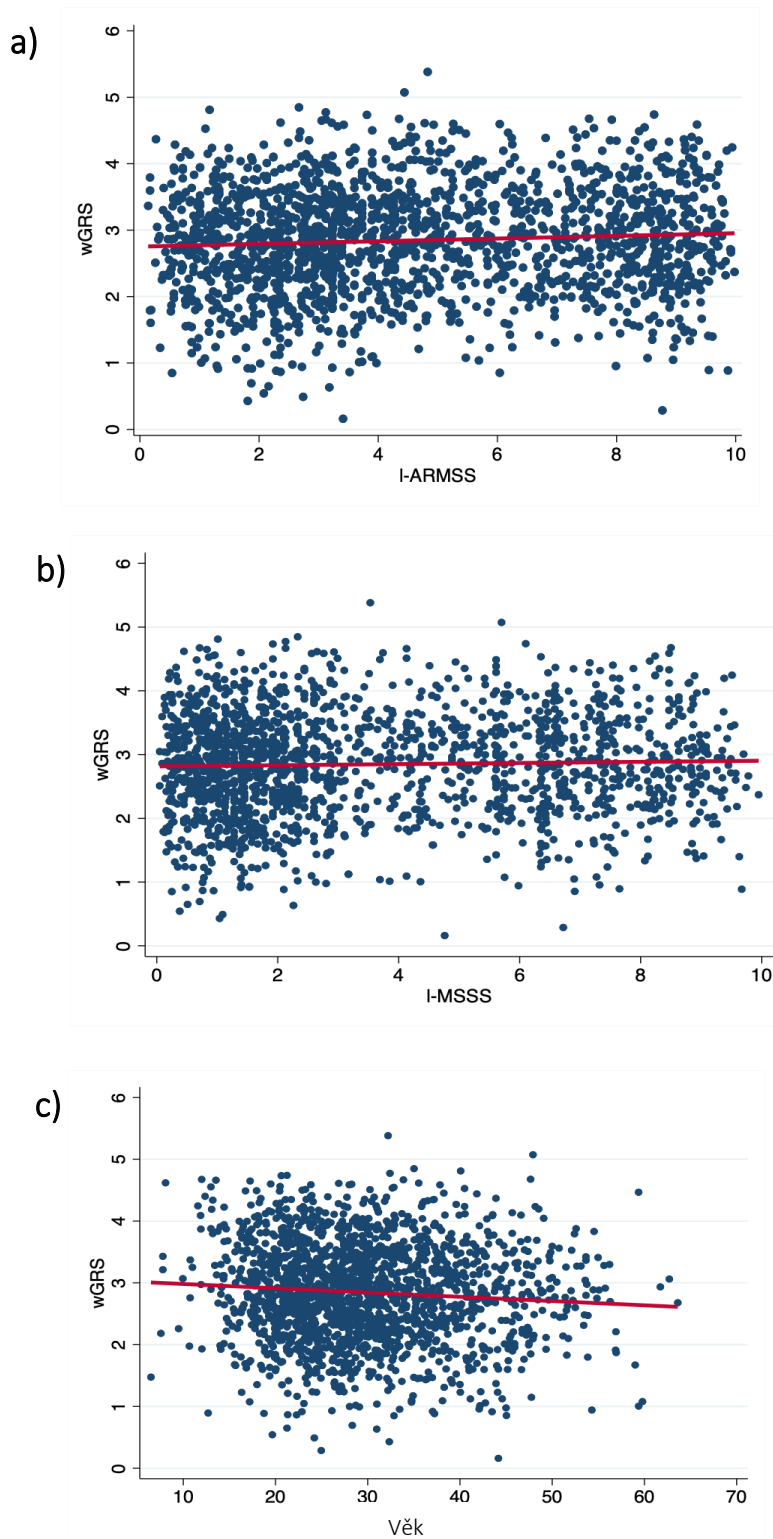
4.2.3.4 Validace dříve publikovaných předpokládaných SNV závažnosti RS

Bylo potvrzeno, že homozygotita u hlavní evropské SNV označující HLA-DRB1*15:01, rs3135388, byla spojena s dřívějším výskytem AAO (rs3135388, 29,2 roku proti 30,4 roku, $P = 0,005$). Kromě DRB1*15:01 jsme testovali 116 předpokládaných asociací SNVs, které nejsou součástí HLA, s průřezovými ukazateli závažnosti RS: MSSS, závažností onemocnění a AAO. Podařilo se nám replikovat asociaci mezi rs868824, intronickou ke genu IMMP2L na chromozomu 7, s AAO ($\beta = -1,0935$ roku; $P = 4,31 \times 10^{-4}$), avšak žádná jiná předpokládaná varianta závažnosti nesplnila nebo nepřekročila po Bonferroniho korekci replikační práh ($P = 4,31 \times 10^{-4}$) (Jokubaitis, V.G. et al., 2022).

4.2.3.5 Asociace alel náchylnosti k RS s fenotypy závažnosti RS

Alela HLA-DRB1*15:01 nebyla spojena se závažností onemocnění podle I-ARMSS ani I-MSSS, stejně jako žádná jiná SNV-genotypizovaná HLA alela (HLA-DRB1*03:01, HLA-DRB1*130:01, HLA-DRB1*08:01, HLA-DQB1*03:02, HLA-A*02:01, HLA-DQA1*01:01, HLA-B*44:02 a HLA-B*55:01).

Snažili jsme se také zjistit, zda existuje souvislost mezi známými variantami náchylnosti k RS (wGRS) a námi sledovanými fenotypy závažnosti RS. Zjistili jsme slabé pozitivní korelace mezi wGRS náchylnosti k RS a I-ARMSS ($r = 0,07$, $P = 0,003$; *Obrázek 11 a*); I-MSSS ($r = 0,03$, $P = 0,19$; *Obrázek 11 b*); a slabou negativní korelaci s AAO ($r = -0,08$, $P = 0,0005$; *Obrázek 11 c*). Nezjistili jsme souvislost mezi I-ARMSS nebo I-MSSS a známými non-HLA autozomálními rizikovými variantami (International Multiple Sclerosis Genetics 2019), které byly přímo genotypizovány (198/200), $P > 1 \times 10^{-3}$.



Obrázek 11: Vážené genetické skóre rizika RS (wGRS) vynesené proti a) I-ARMSS ($r = 0,07$; $P = 0,003$) b) I-MSSS ($r = 0,03$; $P = 0,19$) c) Věk počátku RS ($r = -0,08$; $P = 0,0005$) vykazuje slabou korelaci mezi wGRS a fenotypy, které jsou předmětem zájmu.

Legenda: RS – roztroušená skleróza, wGRS – vážené genetické skóre rizika RS, I-ARMSS – Age-Related Multiple Sclerosis Severity Score, I-MSSS - longitudinal Multiple Sclerosis Severity Score

5. Diskuze

5.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1

V této studii jsme nezjistili žádný vliv polymorfismu HMOX1 (GT)_n na rychlost progresu RS. Progrese byla urychlena pouze dobře známými rizikovými faktory, jako je pozdní začátek RS nebo primárně progresivní průběh RS. Klinicky významné je, že léčba DMDs byla spojena s nižším výskytem rychlé progresu postižení.

Jedná se o první studii hodnotící vliv (GT)_n polymorfismu HMOX1 na rychlost progresu RS.

Distribuce (GT)_n polymorfismu promotoru HMOX1 v naší studii byla podobná jako v jiných pracích a nejčastěji se vyskytovaly alely s 23 a 30 opakováními (Baan, C. et al., 2004, Exner, M. et al., 2004a, Chen, Y.H. et al., 2002, Schillinger, M. et al., 2004, Yamada, N. et al., 2000). Protože naše populace nevykazovala žádný jiný převažující počet opakování, na rozdíl od některých jiných studovaných populací (vykazujících 14 nebo 37 opakování) (D'Silva, S. et al., 2011, Mustafa, S. et al., 2008, Yamada, N. et al., 2000), drželi jsme se konvenčního dichotomického designu studie. Podle naší hypotézy by alely s méně než 25 (GT)_n opakováními, a tedy s pravděpodobně vyšší transkripční aktivitou vedoucí ke zvýšené aktivitě HO-1, měly souviset se sníženým rizikem rychlé progresu postižení u RS. Pokud jde o imunitně zprostředkované poruchy, podobné paradigma již dříve použili Katana a spolupracovníci (Katana, E. et al., 2010), kteří prokázali vyšší zastoupení dárců s krátkými promotory HMOX1 u u dobře fungujících alotransplantátů ledvin.

Nosičství krátké alely promotoru HMOX1 vedoucí k vyšší expresi HO-1 je dále spojeno s nižším rizikem revmatoidní artritidy (Rueda, B. et al., 2007) a chronické obstrukční plicní nemoci (CHOPN) (Yamada, N. et al., 2000) nebo s delším přežitím pacientů po transplantaci kostní dřeně (v závislosti na genotypu dárce štěpu) (Horio, T. et al., 2020). Například u ulcerózní kolitidy, Crohnovy choroby a dalších autoimunitních poruch gastrointestinálního systému nebyl pozorován žádný vliv polymorfismu promotoru HMOX1 (GT)_n na průběh a závažnost onemocnění. (Andersen, V. et al., 2010, Hausmann, M. et al., 2008).

Expese HO-1 byla u modelů idiopatických zánětlivých střevních onemocnění (IBD) spojena s mírou střevního poškození, podobná pozorování byla učiněna u psoriázy nebo u CHOPN (Campbell, N.K. et al., 2021), a uvažuje se využití induktorů HO-1 (např. kumarinu a jiných fytoosterolů) v léčbě těchto onemocnění (Campbell, N.K. et al., 2018, Funes, S.C. et al., 2020). Některá registrovaná léčiva vedou ke zvýšení exprese HO-1, avšak není jasné, zda je jejich efekt zprostředkován právě HO-1. Jedná se např. o dimetyl-fumarát, schválený pro léčbu RS a lupénky

(Ghoreschi, K. et al., 2011), nebo 5-aminosalicylát používaný v léčbě IBD (Campbell, N.K. et al., 2021, Kang, S. et al., 2017). V roce 2013 byla publikována studie Fagoneho a spolupracovníků, kteří pozorovali nižší hladiny HO-1 v mononukleárních krevních buňkách u pacientů s RS ve srovnání s kontrolami (zdravými a osobami s epilepsií). Dále pozorovali pokles HO-1 během relapsu RS. Podání interferonu beta naproti očekávání koncentraci HO-1 snižovalo (Fagone, P. et al., 2013).

Na základě našich výsledků jsme hypotézu o vlivu polymorfismu promotoru HMOX1 na průběh RS zamítli. Námi pozorovaný nedostatek vlivu polymorfismu HMOX1 (GT)_n na průběh RS lze přičíst dualistické úloze HO-1 a jejích induktorů a produktů. Exprese HO-1 je silně indukována hemem, který má silně cytotoxické vlastnosti (Kumar, S. a Bandyopadhyay, U., 2005), a dále řadou prooxidačních a prozánětlivých faktorů (Ferrandiz, M.L. a Devesa, I., 2008). HO-1 a její produkty regulují zánětlivou odpověď na úrovni makrofágů (Vijayan, V. et al., 2018), dendritických buněk a T-lymfocytů (Campbell, N.K. et al., 2018). Některé produkty HO-1 mohou být neurotoxické, jako bilirubin u kernikteru - potenciálně smrtelného onemocnění kojenců (D'Silva, S. et al., 2011). Železo, které je rovněž produkováno HO-1, katalyzuje tvorbu volných radikálů v oligodendrocytech u EAE a jeho akumulace v mitochondriích vede k neurodegeneraci (Levine, S.M. a Chakrabarty, A., 2004). U RS volné železo zvyšuje oxidativní stres, způsobuje mitochondriální poškození (Mahad, D.H. et al., 2015) a zvýšeně se hromadí v mikroglii (Dal-Bianco, A. et al., 2017). Samotná indukce HO-1 v CNS navíc může být ovlivněna epigenetickými (Ray, P.D. et al., 2015, Zhang, Z. et al., 2017) nebo posttranslačními modifikacemi (Cheng, X. et al., 2013, Medina, M.V. et al., 2020), které nejsou dostatečně známy. Polymorfismus HMOX1 je tedy pouze jedním z mnoha faktorů, které ovlivňují expresi HO-1. Studie zaměřené na přímé stanovení aktivity HO-1 tímto omezením netrpí, ovšem mohou zkoumat pouze jednotlivé, dostupné buněčné populace, v kontextu RS většinou z periferní krve.

Jako sekundární výsledek jsme potvrdili výsledky jiných studií, které ukázaly, že DMDs jsou účinné při zpomalování progresu postižení u pacientů s roztroušenou sklerózou. (Johnson K.P., Brooks B. R. et al., 1998, TIMSS., 1993, Jacobs, L.D. et al., 1996). Přestože jsme přímo neporovnávali časový průběh změn EDSS u pacientů s DMDs a bez DMDs, pomocí našeho dichotomického designu jsme zjistili, že podíl pacientů bez DMDs byl významně vyšší mezi subjekty s rychlou než s opožděnou akumulací postižení (64 % vs. 44 %), hodnoceno jako EDSS 4 dosažené do 9 let od vzniku RS. I když mechanismy účinku DMDs nejsou zcela objasněny, je známo, že tyto léky potlačují prozánětlivé cytokiny, jako jsou TNF α , IL-1 a další, z nichž mnohé

indukují expresi HO-1 (Brod, S.A. et al., 1996, Chabot, S. et al., 1997, Rep, M.H. et al., 1996). Hem-oxygenáza 1 je schopna v makrofázích indukovat interferon beta prostřednictvím interferon regulatory factor 3 (IRF3) (Tzima, S. et al., 2009). Jelikož však rozdílná úroveň exprese HO-1 určená polymorfismem (GT)_n nevykazuje žádný měřitelný dopad na míru progresu postižení, je nepravděpodobné, že by HO-1 hrála významnou roli ve zprostředkování léčebného účinku. Dimetyl-fumarát, který indukuje HO-1 prostřednictvím NRF2 (erythroid 2-related factor) (Ghoreschi, K. et al., 2011), v léčbě naší kohorty nebyl použit.

Závěrem lze říci, že naše studie nepodporuje roli promotorového polymorfismu (GT)_n HMOX1 v prognóze pacientů s roztroušenou sklerózou. Na gen HMOX1 jsme se zaměřili na základě znalosti o zvýšení exprese HO-1 v reakci na oxidativní stres (Schipper, H.M. et al., 2009), její přítomnosti v demyelinizačních lézích (Gozzelino, R. et al., 2010) a jejího protektivního účinku v animálních modelech EAE (Chakrabarty, A. et al., 2003, Chen, Y.H. et al., 2002, Chora, A.A. et al., 2007, Liu, Y. et al., 2001). Předpokládáme, že z rozsáhlých multicentrických celogenomových asociačních studií, které zkoumají přímo osoby s RS, mohou vyplynout genetické varianty ukazující na kandidátní geny ovlivňující rozvoj, průběh RS a léčebnou odpověď. Tento přístup byl využit např. Cenitem a spolupracovníky, kteří replikovali asociaci varianty genu pro glypican 5 s odpovědí na léčbu interferonem beta (Cenit, M.D. et al., 2009), na niž poukázala GWAS provedená dříve (Byun, E. et al., 2008). Jiná studie ovšem tuto asociaci neprokázala (Sellebjerg, F. et al., 2014). Podobně snížené riziko RS u nositelů genotypu C/C genu TYK2 (SNP rs34536443) pro tyrozin-kinázu 2, vedoucí k její snížené odpovědi na IL-12 a IL-23, bylo odhaleno GWAS (IMSGC et al., 2013, Krueger, J.G. et al., 2022). Léčebný efekt orálních inhibitorů Tyrosin-kinázy 2 je prozatím studován u jiných autoimunitních onemocnění, se slibnými výsledky u psoriázy (Krueger, J.G. et al., 2022).

5.2 Studie II: Phenotype/Genotype Project

Naše GWAS studie využila jedinečný, multicentrický, prospektivně sledovaný, longitudinální a hluboce fenotypizovaný soubor klinických dat (Butzkueven, H. et al., 2006) s cílem osvětlit genetickou strukturu, která je základem klinické heterogenity roztroušené sklerózy. Naše primární analýzy neidentifikovaly žádné běžné varianty se střední až velkou velikostí účinku, které by přispívaly k závažnosti roztroušené sklerózy. Časem a na ještě větších kohortách bude pravděpodobně potvrzeno, že závažnost roztroušené sklerózy je alespoň částečně určována polygenními mechanismy s malou velikostí účinku.

Naše výsledky ukázaly, že běžné genetické varianty vysvětlují pouze cca 20 % dědičnosti závažnosti, a to s velkým rozpětím odchylky. Průběh RS tedy není pod silnou genetickou kontrolou, což naznačuje, že průběh RS je do určité míry modifikovatelný vhodnou a včasnou intervencí DMDs, což je v souladu s klinickými zkušenostmi (Iaffaldano, P. et al., 2021). To je patrné i v naší studii, kde byla polovině pacientů z kohorty se závažným průběhem RS roztroušená skleróza diagnostikována v době před zavedením DMDs ve srovnání se čtvrtinou pacientů z kohorty s mírným průběhem. To je v souladu s epidemiologickými studiemi, které v porovnání s historickými kohortami pozorují méně případů těžšího postižení (Beiki, O. et al., 2019, Hua, L.H. et al., 2021, Simonsen, C.S. et al., 2021, Tintore, M. et al., 2021).

Naše studie byla navržena k identifikaci genetických faktorů spojených s progresí RS nezávislou na relapsech, což je recentně přijatý koncept v oblasti RS (Kappos, L. et al., 2020, University of California, S.F.M.S.E.T. et al., 2019).

Naše GWAS neidentifikovala žádné SNV, které by překročily stanovený práh významnosti $P < 5 \times 10^{-8}$. Nejvýznamnějšími signály, které vplynuly z analýz I-ARMSS i I-MSSS, byly varianty intronické k SEZ6L, genu s funkcí v CNS. Integrace třiceti nejvýznamnějších SNV identifikovaných v našich analýzách GWAS do analýz přežití EDSS milníků postižení určila, že šest z těchto variant má další důkazy o modulaci závažnosti, a proto se pravděpodobně jedná o skutečné asociace. Pět z těchto variant se nacházelo v intronické části nebo v blízkosti genů, které se podílejí na funkci CNS. Jednalo se opět o varianty intronické k SEZ6L spolu s: rs295254 intronické k RCL1, rs9643199 intronické k MTSS1, rs2776741 nejbližší k RCAN3AS a rs7070182 intronické k TCF7L2. Poslední tři jmenované mají účinky specifické pro pohlaví. Identifikovali jsme také varianty, které se podílejí na mitochondriální funkci: rs9643199 intronickou k MTSS1 (s pleiotropní rolí) a navíc rs111399831, nejbližší k SUCLA2. Poměry rizika spojené s dosažením ireverzibilního EDSS 3 nebo 6, které propůjčuje nosičství minoritní alely u každé SNV, odpovídaly velikosti účinku těchto variant v našich analýzách GWAS: to znamená, že velikost účinku byla malá, ale významná v analýzách přežití. Varianty, které jsme popsali v našich analýzách, jsou intronické nebo v blízkosti genů a jsou pravděpodobně spíše značkovací než kauzální. K ověření toho, zda jsou tyto varianty skutečně asociovány se závažností RS, bude nutné provedení studie na větší kohortě.

Gen SEZ6L kóduje Seizure-like protein 6. Ten je významný v regulaci hustoty dendritů a v procesu kognitivního a motorického učení i udržení motorických funkcí v průběhu života. Jeho poruchy vedou k poruchám vývoje nervového systému, psychiatrickým i neurodegenerativním

(Nash, A. et al., 2020). Gen *MTSS1* hraje roli ve vazbě cytoskeletu k buněčné membráně (Suetsugu, S. et al., 2014) a má význam např. pro buněčnou mobilitu u nádorů, při vývoji CNS a tvorbě dendritických trnů (Saarikangas, J. et al., 2015). Byla nalezena souvislost s *MTSS1* a hustotou arborizace Purkyňových buněk a objemem kortexu (Kawabata Galbraith, K. et al., 2018, Minkeviciene, R. et al., 2019). Postupná ztráta synapsí je patrná v akutních i chronických demyelinizačních lézích (Dutta, R. et al., 2011, Vercellino, M. et al., 2021). Ztráta synapsí je asociována s dysfunkcí neuronálních sítí (Di Filippo, M. et al., 2018), z čehož lze usuzovat na selhání synaptické plasticity v kompenzaci neuronálního poškození. Je tedy možné, že varianty nalezené naší studií jsou podkladem nižších schopností kompenzace nebo horšího přežívání neuronů u pacientů se závažným průběhem RS. Tyto signály nicméně nebyly statisticky významné a vyžadují další validaci.

Identifikovali jsme asociaci varianty intronické k *TCF7L2* a závažnosti RS u mužů. Je možné, že to odráží nízkou sílu studie více než jev specifický pro pohlaví. *TCF7L2* je transkripční faktor, který je součástí Wnt signalizační dráhy (Dias, C. et al., 2021) a inhibuje diferenciaci oligodendroglie (Sock, E. a Wegner, M., 2021). Zajímavé je, že analýza obohacení genových sad ukázala na vyšší zastoupení dráhy Wnt. Spolu s vyšším zastoupením signálních drah progesteronu, který hraje roli v regulaci remyelinizace (Kipp, M. et al., 2012), to podporuje představu, že snížená schopnost remyelinizace predisponuje jedince k horšímu průběhu RS.

Analýzy obohacení genových sad ukazují na vyšší zastoupení genů významných pro funkci mozečku. Mozeček hraje klíčovou roli v řízení pohybu a kognici (Clark, S.V. et al., 2021). Je známo, že cerebellární příznaky jsou prediktorem horší prognózy RS (Le, M. et al., 2021).

V rámci sekundárních analýz se podařilo replikovat asociaci mezi nejsilnější alelou zvyšující riziko RS a začátkem onemocnění (Masterman, T. et al., 2000, Van der Walt, A. et al., 2011). Dále byla naše studie první, která replikovala asociaci varianty *rs868824*, intronické k *IMMP2L*, a začátkem RS (Baranzini, S.E. et al., 2009). *IMMP2L*, proteáza lokalizovaná na vnitřní mitochondriální membráně, je spojena s buněčnou senescencí (He, Q. et al., 2020, Yuan, L. et al., 2018). Nejnovější důkazy ukazují na zrychlené buněčné a biologické stárnutí u lidí s roztroušenou sklerózou (Buhring, J. et al., 2021, Nicaise, A.M. et al., 2019, Si, Z. et al., 2021). Validace asociace *rs868824* s věkem počátku onemocnění by mohla přispět našemu porozumění rychlejšímu buněčnému stárnutí u RS.

Naše výsledky ukazují na možná relevantní vysvětlení heterogenity RS, kterou pozorujeme v klinické praxi. Nicméně námi pozorovaná pouze cca 20% heritabilita svědčí pro významnou

roli dalších faktorů. Je popsán např. efekt těhotenství (Nguyen, A.L. et al., 2019) nebo zanechání kouření (Ramanujam, R. et al., 2015). Předpokládáme i interakce mezi environmentálními a genetickými faktory, které mohou být v budoucnu osvětleny epigenetickými studiemi.

Náš model strojového učení využívající všechny SNV s $P \leq 0,01$ neposkytl přidaný vhled do genetické architektury závažnosti RS a potvrdil názor, že mnoho běžných SNPs přispívá k závažnosti RS velmi malým účinkem. Nicméně tento model strojového učení byl schopen přisoudit stupeň závažnosti RS s PPV 80% a NPV 88%. Tim výrazně překonal náš model zahrnující pouze klinická a demografická data dostupná při začátku onemocnění, který neměl lepší než náhodné výsledky. Přesnost klasifikace našeho algoritmu strojového učení nebyla podstatně ovlivněna přidáním klinických proměnných, které byly k dispozici při nástupu onemocnění, ani pohlavím, což je v souladu s předchozím zjištěním.

Součástí modelu bylo i wGRS, ale významně k jeho výsledkům nepřispělo. To potvrzuje naši hypotézu o tom, že geny spojené s náchylností k RS nejsou shodné s geny přispívajícími k závažnosti RS, a je to i v souladu s dřívějšími zjištěními (George, M.F. et al., 2016).

Námi vytvořený model je první model strojového učení využívající pouze data dostupná na počátku onemocnění. Dříve publikovaný model je srovnatelně úspěšný, ovšem využívá i údaje dostupné až po letech průběhu RS (Pinto, M.F. et al., 2020). Se zvyšováním dostupnosti genotypizace a zejména po validaci na nezávislé kohortě by bylo možné náš model využít v praxi.

Výsledky naší studie mohly být zkresleny léčbou, pro což svědčí vyšší podíl pacientů diagnostikovaných před nástupem vysoce účinné léčby ve skupině se závažným průběhem RS. Naopak osoby s mírným průběhem RS mohly spíše dobře reagovat na léčbu. Toto omezení jsme se snažili korigovat adjustováním na léčbu, což bylo umožněno přesným popisem průběhu a léčby RS v databázi MSBase.

Validaci na nezávislé kohortě jsme neprovedli, protože jsme neměli přístup k další podobné skupině pacientů. Nicméně pokusili jsme se naše výsledky validovat pomocí alternativních definic tíže RS, tj. pomocí času k dosažení ireverzibilních milníků postižení. To je nicméně parametr provázaný s I-ARMSS a I-MSSS, což je omezení, které nelze překonat bez nezávislé kohorty.

Předpokládáme, že náš model strojového učení by mohl být dále vylepšen zahrnutím údajů z vyšetření mozku magnetickou rezonancí a údajů o přítomnosti oligoklonálních pásů v mozkomíšním moku, který nebyl pro velkou část pacientů dostupný, protože v Austrálii se

běžně neprovádí. Nicméně máme v úmyslu naši kohortu rozšířit, abychom mohli výsledky validovat a získali dostatečně velkou kohortu, která by umožnila studium odpovědi na léčbu různými DMDs.

6. Zhodnocení cílů a hypotéz

6.1 Studie I: Polymorfismus hem-oxygenázy 1

V této studii jsme nezjistili žádný vliv polymorfismu HMOX1 (GT)_n na rychlost progresu RS. Hypotézu, že (GT)_n polymorfismus promotoru HMOX1, vedoucí k nižší expresi hem-oxygenázy, je spojen s pomalejší progresí neurologického postižení, jsme zamítli.

Jako sekundární výsledek jsme potvrdili výsledky jiných studií, které odhalily faktory asociované s rychlejším nárůstem neurologického deficitu u RS. Progrese byla urychlena dobře známými rizikovými faktory, jako je pozdní začátek RS nebo primárně progresivní průběh RS. Důležité je, že léčba DMDs byla spojena s nižším výskytem rychlé progresu postižení, z čehož usuzujeme, že DMDs jsou účinné při zpomalování progresu postižení u pacientů s roztroušenou sklerózou.

6.2 Studie II: Phenotype/Genotype Project

Prokázali jsme, že běžné genetické varianty se střední až velkou velikostí účinku nepřispívají k závažnosti roztroušené sklerózy.

Demonstrujeme, že strojové učení využívající společné klastry SNV spolu s klinickými proměnnými, které jsou snadno dostupné v době diagnózy, může zlepšit prognostické schopnosti v době diagnózy a po další validaci má potenciál najít využití v klinické praxi.

V sekundárních analýzách stratifikovaných podle pohlaví jsme identifikovali dva genetické lokusy, které překročily prahy významnosti GWAS, což svědčí o pohlavním dimorfismu v závažnosti roztroušené sklerózy. Identifikovali jsme dalších šest variant se silnými důkazy o regulaci klinických výsledků. Pozorovali jsme nadměrné zastoupení genů exprimovaných v kompartmentech CNS obecně a konkrétně v mozečku. Ty se týkaly mitochondriální funkce, synaptické plasticity, oligodendroglální biologie, buněčné senescence, signálních drah vápníku a g-proteinových receptorů, což potvrzuje funkční dichotomii signálů a drah, které regulují závažnost roztroušené sklerózy versus riziko, a dále přispívá k našemu porozumění patogenezi roztroušené sklerózy.

7. Souhrn

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je chronické autoimunitní onemocnění centrální nervové soustavy. Je známo, že rozvoj RS je ovlivněn genetickou výbavou jedince a bylo identifikováno přes 200 bodových polymorfismů asociovaných s rizikem RS, převážně ovlivňujících imunitní funkce. Méně je známo o vlivu genetických faktorů na průběh již vzniklého onemocnění a v klinické praxi není dostupný genetický marker predikující léčebnou odpověď na imunomodulační léčbu.

Naše skupina se nejprve zaměřila na studium kandidátního genu vybraného na základě znalosti patofyziologie roztroušené sklerózy: HMOX1 pro hem-oxygenázu 1. Zkoumali jsme vztah $(GT)_n$ polymorfismu promotoru HMOX1, který ovlivňuje její expresi, a průběhu RS. Naše studie nezjistila vliv zkoumaného polymorfismu na tíži průběhu RS. Prokázali jsme však oddálení vzniku postižení následkem RS u pacientů léčených imunomodulační léčbou ve srovnání s pacienty, kteří imunomodulační léčbou léčení nebyli, což je klinicky významné zjištění.

Dále jsme se zúčastnili mezinárodního projektu nazvaného Genotype/Phenotype Project. Jedná se o celogenomovou asociační studii zkoumající tíži průběhu RS. Tato studie neodhalila jednonukleotidové varianty asociované s tíží RS. Na základě našich výsledků lze říci, že běžné bodové polymorfismy se střední a vyšší velikostí účinku ($OR > 1,2$) neovlivňují tíži RS.

Získaná data byla dále analyzována pomocí metod strojového učení. Model strojového učení využívající clustery bodových polymorfismů nejbližší dosažení statistické významnosti spolu s klinickými proměnnými známými v době diagnózy dokázal predikovat závažnost dalšího průběhu RS s AUROC 0,84. Tento model by tedy po další validaci mohl být užitečný v klinické praxi při volbě strategie léčby jednotlivých pacientů.

Zajímavé je, že využití wGRS (weighted Genetic Risk Score) zahrnující polymorfismy asociované s rozvojem RS nezvýšilo přesnost modelu. I další analýzy ukázaly vyšší zastoupení genů bez přímé souvislosti s imunitním systémem. To přispívá k našemu poznání patofyziologie RS. Nicméně naše studie heritabilitu tíže RS odhaduje na 19 %, což svědčí pro významný vliv faktorů prostředí, včetně léčby. Přestože naše studie zahrnovala podrobné údaje o léčbě, nebyl nalezen bodový polymorfismus statisticky významně asociovaný s léčebnou odpovědí na některý z imunomodulačních léků. Proto naše snahy nyní směřují k rozšíření studie a získání genetického markeru léčebné odpovědi.

8. Summary

Multiple sclerosis (MS) is a chronic autoimmune disease of the central nervous system. The development of MS is known to be influenced by an individual's genetic disposition and over 200 single nucleotide polymorphisms (SNPs) associated with MS risk have been identified, mostly related to immune function. Less is known about the influence of genetic factors on the course of disease and no genetic marker predicting therapeutic response to immunomodulatory therapy is available in clinical practice.

Our group first focused on the study of a candidate gene selected based on knowledge of the pathophysiology of MS: HMOX1 for heme oxygenase 1. We investigated the relationship between the (GT)_n polymorphism of the HMOX1 promoter, which influences its expression, and the course of MS. Our study did not find an effect of the studied polymorphism on the severity of MS. However, we demonstrated a delay in the onset of disability in patients treated with immunomodulatory therapy compared to patients not treated with immunomodulatory therapy, a clinically relevant finding.

Further, we participated in an international study called the Phenotype/Genotype Project. This is a genome-wide association study of MS severity. This study did not reveal SNPs associated with MS severity. Based on our results, common variants with moderate and higher effect sizes (OR > 1.2) do not affect MS severity.

The obtained data were further analyzed using machine learning methods. A machine learning model using clusters of SNPs together with clinical variables known at the time of diagnosis was able to predict the severity of the subsequent course of MS with an AUROC of 0.84. Thus, this model, after further validation, could be useful in clinical practice when choosing treatment strategies for individual patients.

Interestingly, the use of wGRS (weighted Genetic Risk Score) including polymorphisms associated with the MS susceptibility did not increase the accuracy of the model. Other analyses also showed overrepresentation of genes with no direct link to the immune system. This contributes to our understanding of the pathophysiology of MS. Nevertheless, our study estimated the heritability of MS severity at 19%, suggesting a significant influence of environmental factors, including treatment. Although our study included in-depth treatment data, no SNP was found to be statistically significantly associated with treatment response to any of the immunomodulatory drugs. Therefore, our efforts are now directed towards expanding the study and obtaining a genetic marker of treatment response.

9. Literatura:

1. Absinta M, Ha SK, Nair G, Sati P, Luciano NJ, Palisoc M, Louveau A, Zaghoul KA, Pittaluga S, Kipnis J, Reich DS. Human and nonhuman primate meninges harbor lymphatic vessels that can be visualized noninvasively by MRI. *Elife* 2017;6.
2. Akaishi T, Takahashi T, Nakashima I. Peripheral blood monocyte count at onset may affect the prognosis in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2018;319:37-40.
3. Al-Mojel M, Alroughani R, Kannankeril T, Dashti M, Al-Temaimi R. GP6 rs2304166 polymorphism is associated with response to natalizumab in multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis and Demyelinating Disorders* 2019;4(1):2.
4. Alexoudi A, Zachaki S, Stavropoulou C, Gavrili S, Spiliopoulou C, Papadodima S, Karageorgiou CE, Sambani C. Possible Implication of GSTP1 and NQO1 Polymorphisms on Natalizumab Response in Multiple Sclerosis. *Ann Clin Lab Sci* 2016;46(6):586-91.
5. Alfredsson L, Olsson T. Lifestyle and Environmental Factors in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2019;9(4).
6. Amato MP, De Stefano N, Inglese M, Morena E, Ristori G, Salvetti M, Trojano M. Secondary Prevention in Radiologically Isolated Syndromes and Prodromal Stages of Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 2022;13:787160.
7. Andersen V, Ernst A, Christensen J, Ostergaard M, Jacobsen BA, Tjonneland A, Krarup HB, Vogel U. The polymorphism rs3024505 proximal to IL-10 is associated with risk of ulcerative colitis and Crohns disease in a Danish case-control study. *BMC Med Genet* 2010;11:82.
8. Ascherio A, Munger KL. EBV and Autoimmunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 2015;390(Pt 1):365-85.
9. Ascherio A, Munger KL, White R, Kochert K, Simon KC, Polman CH, Freedman MS, Hartung HP, Miller DH, Montalban X, Edan G, Barkhof F, Pleimes D, Radu EW, Sandbrink R, Kappos L, Pohl C. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA Neurol* 2014;71(3):306-14.
10. Attfeld KE, Jensen LT, Kaufmann M, Friese MA, Fugger L. The immunology of multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 2022.
11. Baan C, Peeters A, Lemos F, Uitterlinden A, Doxiadis I, Claas F, Ijzermans J, Roodnat J, Weimar W. Fundamental role for HO-1 in the self-protection of renal allografts. *Am J Transplant* 2004;4(5):811-8.

12. Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000;192(3):393-404.
13. Baranzini SE, Wang J, Gibson RA, Galwey N, Naegelin Y, Barkhof F, Radue EW, Lindberg RL, Uitdehaag BM, Johnson MR, Angelakopoulou A, Hall L, Richardson JC, Prinjha RK, Gass A, Geurts JJ, Kragt J, Sombekke M, Vrenken H, Qualley P, Lincoln RR, Gomez R, Caillier SJ, George MF, Mousavi H, Guerrero R, Okuda DT, Cree BA, Green AJ, Waubant E, Goodin DS, Pelletier D, Matthews PM, Hauser SL, Kappos L, Polman CH, Oksenberg JR. Genome-wide association analysis of susceptibility and clinical phenotype in multiple sclerosis. *Human molecular genetics* 2009;18(4):767-78.
14. Barcellos LF, Sawcer S, Ramsay PP, Baranzini SE, Thomson G, Briggs F, Cree BC, Begovich AB, Villoslada P, Montalban X, Uccelli A, Savettieri G, Lincoln RR, DeLoa C, Haines JL, Pericak-Vance MA, Compston A, Hauser SL, Oksenberg JR. Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum Mol Genet* 2006;15(18):2813-24.
15. Baughman EJ, Mendoza JP, Ortega SB, Ayers CL, Greenberg BM, Frohman EM, Karandikar NJ. Neuroantigen-specific CD8+ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J Autoimmun* 2011;36(2):115-24.
16. Beiki O, Frumento P, Bottai M, Manouchehrinia A, Hillert J. Changes in the Risk of Reaching Multiple Sclerosis Disability Milestones In Recent Decades: A Nationwide Population-Based Cohort Study in Sweden. *JAMA Neurol* 2019;76(6):665-71.
17. Benkert P, Meier S, Schaedelin S, Manouchehrinia A, Yaldizli O, Maceski A, Oechtering J, Achtnichts L, Conen D, Derfuss T, Lalive PH, Mueller C, Muller S, Naegelin Y, Oksenberg JR, Pot C, Salmen A, Willemse E, Kockum I, Blennow K, Zetterberg H, Gobbi C, Kappos L, Wiendl H, Berger K, Sormani MP, Granziera C, Piehl F, Leppert D, Kuhle J, Nf LRDitSMSCSG. Serum neurofilament light chain for individual prognostication of disease activity in people with multiple sclerosis: a retrospective modelling and validation study. *Lancet Neurol* 2022;21(3):246-57.
18. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, Jia X, Xiao L, Xia Z, Liu C, Klotz L, Stauffer U, Baranzini SE, Kumpfel T, Hohlfeld R, Krishnamoorthy G, Wekerle H. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114(40):10719-24.

19. Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 2011;479(7374):538-41.
20. Bjornevik K, Cortese M, Healy BC, Kuhle J, Mina MJ, Leng Y, Elledge SJ, Niebuhr DW, Scher AI, Munger KL, Ascherio A. Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* 2022;375(6578):296-301.
21. Brod SA, Marshall GD, Jr., Henninger EM, Sriram S, Khan M, Wolinsky JS. Interferon-beta 1b treatment decreases tumor necrosis factor-alpha and increases interleukin-6 production in multiple sclerosis. *Neurology* 1996;46(6):1633-8.
22. Brynedal B, Wojcik J, Esposito F, Debailleul V, Yaouanq J, Martinelli-Boneschi F, Edan G, Comi G, Hillert J, Abderrahim H. MGAT5 alters the severity of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology* 2010;220(1-2):120-4.
23. Buhring J, Hecker M, Fitzner B, Zettl UK. Systematic Review of Studies on Telomere Length in Patients with Multiple Sclerosis. *Aging Dis* 2021;12(5):1272-86.
24. Bulik-Sullivan BK, Loh PR, Finucane HK, Ripke S, Yang J, Schizophrenia Working Group of the Psychiatric Genomics C, Patterson N, Daly MJ, Price AL, Neale BM. LD Score regression distinguishes confounding from polygenicity in genome-wide association studies. *Nat Genet* 2015;47(3):291-5.
25. Bustamante MF, Morcillo-Suarez C, Malhotra S, Rio J, Leyva L, Fernandez O, Zettl UK, Killestein J, Brassat D, Garcia-Merino JA, Sanchez AJ, Urcelay E, Alvarez-Lafuente R, Villar LM, Alvarez-Cermeno JC, Farre X, Lechner-Scott J, Vandebroek K, Rodriguez-Antiguedad A, Drulovic JS, Martinelli Boneschi F, Chan A, Oksenberg J, Navarro A, Montalban X, Comabella M. Pharmacogenomic study in patients with multiple sclerosis: Responders and nonresponders to IFN-beta. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2015;2(5):e154.
26. Butzkueven H, Chapman J, Cristiano E, Grand'Maison F, Hoffmann M, Izquierdo G, Jolley D, Kappos L, Leist T, Pohlau D, Rivera V, Trojano M, Verheul F, Malkowski JP. MSBase: an international, online registry and platform for collaborative outcomes research in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis* 2006;12(6):769-74.
27. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, Villoslada P, Fernandez O, Brassat D, Comabella M, Wang J, Barcellos LF, Baranzini SE, Oksenberg JR. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008;65(3):337-44.

28. Calabresi PA, Kieseier BC, Arnold DL, Balcer LJ, Boyko A, Pelletier J, Liu S, Zhu Y, Seddighzadeh A, Hung S, Deykin A, Investigators AS. Pegylated interferon beta-1a for relapsing-remitting multiple sclerosis (ADVANCE): a randomised, phase 3, double-blind study. *Lancet Neurol* 2014a;13(7):657-65.
29. Calabresi PA, Radue EW, Goodin D, Jeffery D, Rammohan KW, Reder AT, Vollmer T, Agius MA, Kappos L, Stites T, Li B, Cappiello L, von Rosenstiel P, Lublin FD. Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet Neurol* 2014b;13(6):545-56.
30. Campbell NK, Fitzgerald HK, Dunne A. Regulation of inflammation by the antioxidant haem oxygenase 1. *Nat Rev Immunol* 2021;21(7):411-25.
31. Campbell NK, Fitzgerald HK, Malara A, Hambly R, Sweeney CM, Kirby B, Fletcher JM, Dunne A. Naturally derived Heme-Oxygenase 1 inducers attenuate inflammatory responses in human dendritic cells and T cells: relevance for psoriasis treatment. *Sci Rep* 2018;8(1):10287.
32. Cao X, Mitra AK, Pounds S, Crews KR, Gandhi V, Plunkett W, Dolan ME, Hartford C, Raimondi S, Campana D, Downing J, Rubnitz JE, Ribeiro RC, Lamba JK. RRM1 and RRM2 pharmacogenetics: association with phenotypes in HapMap cell lines and acute myeloid leukemia patients. *Pharmacogenomics* 2013;14(12):1449-66.
33. Carlstrom KE, Ewing E, Granqvist M, Gyllenberg A, Aeinehband S, Enoksson SL, Checa A, Badam TV, Huang J, Gomez-Cabrero D, Gustafsson M, Al Nimer F, Wheelock CE, Kockum I, Olsson T, Jagodic M, Piehl F. Therapeutic efficacy of dimethyl fumarate in relapsing-remitting multiple sclerosis associates with ROS pathway in monocytes. *Nat Commun* 2019;10(1):3081.
34. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P, Watier H. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 2002;99(3):754-8.
35. Cenit MD, Blanco-Kelly F, de las Heras V, Bartolome M, de la Concha EG, Urcelay E, Arroyo R, Martinez A. Glypican 5 is an interferon-beta response gene: a replication study. *Mult Scler* 2009;15(8):913-7.
36. Clarelli F, Liberatore G, Sorosina M, Osiceanu AM, Esposito F, Mascia E, Santoro S, Pavan G, Colombo B, Moiola L, Martinelli V, Comi G, Martinelli-Boneschi F. Pharmacogenetic

- study of long-term response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics J* 2017;17(1):84-91.
37. Clark SV, Semmel ES, Aleksonis HA, Steinberg SN, King TZ. Cerebellar-Subcortical-Cortical Systems as Modulators of Cognitive Functions. *Neuropsychol Rev* 2021;31(3):422-46.
 38. Cohen JA, Arnold DL, Comi G, Bar-Or A, Gujrathi S, Hartung JP, Cravets M, Olson A, Frohna PA, Selmaj KW, Group RS. Safety and efficacy of the selective sphingosine 1-phosphate receptor modulator ozanimod in relapsing multiple sclerosis (RADIANCE): a randomised, placebo-controlled, phase 2 trial. *Lancet Neurol* 2016;15(4):373-81.
 39. Coles AJ, Twyman CL, Arnold DL, Cohen JA, Confavreux C, Fox EJ, Hartung HP, Havrdova E, Selmaj KW, Weiner HL, Miller T, Fisher E, Sandbrink R, Lake SL, Margolin DH, Oyuela P, Panzara MA, Compston DA, investigators C-MI. Alemtuzumab for patients with relapsing multiple sclerosis after disease-modifying therapy: a randomised controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012;380(9856):1829-39.
 40. Comabella M, Craig DW, Morcillo-Suarez C, Rio J, Navarro A, Fernandez M, Martin R, Montalban X. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2009;66(8):972-8.
 41. Comabella M, Vandenbroeck K. Pharmacogenomics and multiple sclerosis: moving toward individualized medicine. *Curr Neurol Neurosci Rep* 2011;11(5):484-91.
 42. Cruciani C, Puthenparampil M, Tomas-Ojer P, Jelcic I, Docampo MJ, Planas R, Manogaran P, Opfer R, Wicki C, Reindl M, Jelcic I, Lutterotti A, Martin R, Sospedra M. T-Cell Specificity Influences Disease Heterogeneity in Multiple Sclerosis. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2021;8(6).
 43. Cunningham S, Graham C, Hutchinson M, Droogan A, O'Rourke K, Patterson C, McDonnell G, Hawkins S, Vandenbroeck K. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN-beta treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin Pharmacol Ther* 2005;78(6):635-46.
 44. D'Silva S, Borse V, Colah RB, Ghosh K, Mukherjee MB. Association of (GT)_n repeats promoter polymorphism of heme oxygenase-1 gene with serum bilirubin levels in healthy Indian adults. *Genet Test Mol Biomarkers* 2011;15(4):215-8.
 45. Dal-Bianco A, Grabner G, Kronnerwetter C, Weber M, Hoftberger R, Berger T, Auff E, Leutmezer F, Trattinig S, Lassmann H, Bagnato F, Hametner S. Slow expansion of multiple

- sclerosis iron rim lesions: pathology and 7 T magnetic resonance imaging. *Acta Neuropathol* 2017;133(1):25-42.
46. Das S, Forer L, Schonherr S, Sidore C, Locke AE, Kwong A, Vrieze SI, Chew EY, Levy S, McGue M, Schlessinger D, Stambolian D, Loh PR, Iacono WG, Swaroop A, Scott LJ, Cucca F, Kronenberg F, Boehnke M, Abecasis GR, Fuchsberger C. Next-generation genotype imputation service and methods. *Nat Genet* 2016;48(10):1284-7.
 47. De Jager PL, Chibnik LB, Cui J, Reischl J, Lehr S, Simon KC, Aubin C, Bauer D, Heubach JF, Sandbrink R, Tyblova M, Lelkova P, Steering committee of the Bs, Steering committee of the Bs, Steering committee of the LTFs, Steering committee of the CCRs, Havrdova E, Pohl C, Horakova D, Ascherio A, Hafler DA, Karlson EW. Integration of genetic risk factors into a clinical algorithm for multiple sclerosis susceptibility: a weighted genetic risk score. *Lancet Neurol* 2009;8(12):1111-9.
 48. DeLuca GC, Ramagopalan SV, Herrera BM, Dymont DA, Lincoln MR, Montpetit A, Pugliatti M, Barnardo MC, Risch NJ, Sadovnick AD, Chao M, Sotgiu S, Hudson TJ, Ebers GC. An extremes of outcome strategy provides evidence that multiple sclerosis severity is determined by alleles at the HLA-DRB1 locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104(52):20896-901.
 49. Di Filippo M, Portaccio E, Mancini A, Calabresi P. Multiple sclerosis and cognition: synaptic failure and network dysfunction. *Nat Rev Neurosci* 2018;19(10):599-609.
 50. Dias C, Pfundt R, Kleefstra T, Shuurs-Hoeijmakers J, Boon EMJ, van Hagen JM, Zwijnenburg P, Weiss MM, Keren B, Mignot C, Isapof A, Weiss K, Hershkovitz T, Iacono M, Maitz S, Feichtinger RG, Kotzot D, Mayr JA, Ben-Omran T, Mahmoud L, Pais LS, Walsh CA, Shashi V, Sullivan JA, Stong N, Lecoquierre F, Guerrot AM, Charollais A, Rodan LH. De novo variants in TCF7L2 are associated with a syndromic neurodevelopmental disorder. *Am J Med Genet A* 2021;185(8):2384-90.
 51. Diaz-Villamarin X, Pinar-Morales R, Barrero-Hernandez FJ, Antunez-Rodriguez A, Cabeza-Barrera J, Moron-Romero R. Pharmacogenetics of siponimod: A systematic review. *Biomed Pharmacother* 2022;153:113536.
 52. Durmanova V, Shawkatova I, Javor J, Parnicka Z, Copikova-Cundrakova D, Turcani P, Lisa I, Gajdosechova B, Buc M, Bucova M. VLA4 Gene Polymorphism and Susceptibility to Multiple Sclerosis in Slovaks. *Folia Biol (Praha)* 2015;61(1):8-13.

53. Dutta R, Chang A, Doud MK, Kidd GJ, Ribaldo MV, Young EA, Fox RJ, Staugaitis SM, Trapp BD. Demyelination causes synaptic alterations in hippocampi from multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2011;69(3):445-54.
54. Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, Armstrong H, Cousin K, Bell RB, Hader W, Paty DW, Hashimoto S, Oger J, Duquette P, Warren S, Gray T, O'Connor P, Nath A, Auty A, Metz L, Francis G, Paulseth JE, Murray TJ, Pryse-Phillips W, Nelson R, Freedman M, Brunet D, Bouchard JP, Hinds D, Risch N. A full genome search in multiple sclerosis. *Nat Genet* 1996;13(4):472-6.
55. Esposito F, Sorosina M, Ottoboni L, Lim ET, Replogle JM, Raj T, Brambilla P, Liberatore G, Guaschino C, Romeo M, Pertel T, Stankiewicz JM, Martinelli V, Rodegher M, Weiner HL, Brassat D, Benoist C, Patsopoulos NA, Comi G, Elyaman W, Martinelli Boneschi F, De Jager PL. A pharmacogenetic study implicates SLC9a9 in multiple sclerosis disease activity. *Ann Neurol* 2015;78(1):115-27.
56. Exner M, Bohmig GA, Schillinger M, Regele H, Watschinger B, Horl WH, Raith M, Mannhalter C, Wagner OF. Donor heme oxygenase-1 genotype is associated with renal allograft function. *Transplantation* 2004a;77(4):538-42.
57. Exner M, Minar E, Wagner O, Schillinger M. The role of heme oxygenase-1 promoter polymorphisms in human disease. *Free Radic Biol Med* 2004b;37(8):1097-104.
58. Fagone P, Patti F, Mangano K, Mammana S, Coco M, Touil-Boukoffa C, Chikovani T, Di Marco R, Nicoletti F. Heme oxygenase-1 expression in peripheral blood mononuclear cells correlates with disease activity in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2013;261(1-2):82-6.
59. Ferrandiz ML, Devesa I. Inducers of heme oxygenase-1. *Curr Pharm Des* 2008;14(5):473-86.
60. Fewings NL, Gatt PN, McKay FC, Parnell GP, Schibeci SD, Edwards J, Basuki MA, Goldinger A, Fabis-Pedrini MJ, Kermode AG, Manrique CP, McCauley JL, Nickles D, Baranzini SE, Burke T, Vucic S, Stewart GJ, Booth DR. The autoimmune risk gene ZMIZ1 is a vitamin D responsive marker of a molecular phenotype of multiple sclerosis. *J Autoimmun* 2017;78:57-69.
61. Fissolo N, Pappolla A, Rio J, Villar LM, Perez-Hoyos S, Sanchez A, Gutierrez L, Montalban X, Comabella M. Serum Levels of CXCL13 Are Associated With Teriflunomide Response in Patients With Multiple Sclerosis. *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* 2023;10(1):e200050.

62. Florou D, Katsara M, Feehan J, Dardiotis E, Apostolopoulos V. Anti-CD20 Agents for Multiple Sclerosis: Spotlight on Ocrelizumab and Ofatumumab. *Brain Sci* 2020;10(10).
63. Fox RJ, Miller DH, Phillips JT, Hutchinson M, Havrdova E, Kita M, Yang M, Raghupathi K, Novas M, Sweetser MT, Vigiotta V, Dawson KT, Investigators CS. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 or glatiramer in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367(12):1087-97.
64. Friese MA, Schattling B, Fugger L. Mechanisms of neurodegeneration and axonal dysfunction in multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2014;10(4):225-38.
65. Funes SC, Rios M, Fernandez-Fierro A, Covian C, Bueno SM, Riedel CA, Mackern-Oberti JP, Kalergis AM. Naturally Derived Heme-Oxygenase 1 Inducers and Their Therapeutic Application to Immune-Mediated Diseases. *Front Immunol* 2020;11:1467.
66. Fusco C, Andreone V, Coppola G, Luongo V, Guerini F, Pace E, Florio C, Pirozzi G, Lanzillo R, Ferrante P, Vivo P, Mini M, Macri M, Orefice G, Lombardi ML. HLA-DRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 2001;57(11):1976-9.
67. George MF, Briggs FB, Shao X, Gianfrancesco MA, Kockum I, Harbo HF, Celius EG, Bos SD, Hedstrom A, Shen L, Bernstein A, Alfredsson L, Hillert J, Olsson T, Patsopoulos NA, De Jager PL, Oturai AB, Sondergaard HB, Sellebjerg F, Sorensen PS, Gomez R, Caillier SJ, Cree BA, Oksenberg JR, Hauser SL, D'Alfonso S, Leone MA, Martinelli Boneschi F, Sorosina M, van der Mei I, Taylor BV, Zhou Y, Schaefer C, Barcellos LF. Multiple sclerosis risk loci and disease severity in 7,125 individuals from 10 studies. *Neurol Genet* 2016;2(4):e87.
68. Ghoreschi K, Bruck J, Kellerer C, Deng C, Peng H, Rothfuss O, Hussain RZ, Gocke AR, Respa A, Glocova I, Valtcheva N, Alexander E, Feil S, Feil R, Schulze-Osthoff K, Rupec RA, Lovett-Racke AE, Dringen R, Racke MK, Rocken M. Fumarates improve psoriasis and multiple sclerosis by inducing type II dendritic cells. *J Exp Med* 2011;208(11):2291-303.
69. Giacalone G, Clarelli F, Osiceanu AM, Guaschino C, Brambilla P, Sorosina M, Liberatore G, Zauli A, Esposito F, Rodegher M, Ghezzi A, Galimberti D, Patti F, Barizzone N, Guerini F, Martinelli V, Leone M, Comi G, D'Alfonso S, Martinelli Boneschi F. Analysis of genes, pathways and networks involved in disease severity and age at onset in primary-progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 2015;21(11):1431-42.

70. Giladi A, Wagner LK, Li H, Dorr D, Medaglia C, Paul F, Shemer A, Jung S, Yona S, Mack M, Leutz A, Amit I, Mildner A. Cxcl10(+) monocytes define a pathogenic subset in the central nervous system during autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 2020;21(5):525-34.
71. Giovannoni G, Comi G, Cook S, Rammohan K, Rieckmann P, Soelberg Sorensen P, Vermersch P, Chang P, Hamlett A, Musch B, Greenberg SJ, Group CS. A placebo-controlled trial of oral cladribine for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362(5):416-26.
72. Giovannoni G, Tomic D, Bright JR, Havrdova E. "No evident disease activity": The use of combined assessments in the management of patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2017;23(9):1179-87.
73. Gold R, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Giovannoni G, Selmaj K, Tornatore C, Sweetser MT, Yang M, Sheikh SI, Dawson KT, Investigators DS. Placebo-controlled phase 3 study of oral BG-12 for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2012;367(12):1098-107.
74. Goris A, Pauwels I, Gustavsen MW, van Son B, Hilven K, Bos SD, Celius EG, Berg-Hansen P, Aarseth J, Myhr KM, D'Alfonso S, Barizzone N, Leone MA, Martinelli Boneschi F, Sorosina M, Liberatore G, Kockum I, Olsson T, Hillert J, Alfredsson L, Bedri SK, Hemmer B, Buck D, Berthele A, Knier B, Biberacher V, van Pesch V, Sindic C, Bang Oturai A, Sondergaard HB, Sellebjerg F, Jensen PE, Comabella M, Montalban X, Perez-Boza J, Malhotra S, Lechner-Scott J, Broadley S, Slee M, Taylor B, Kermod AG, Gourraud PA, International Multiple Sclerosis Genetics C, Sawcer SJ, Andreassen BK, Dubois B, Harbo HF. Genetic variants are major determinants of CSF antibody levels in multiple sclerosis. *Brain* 2015;138(Pt 3):632-43.
75. Goris A, Vandebergh M, McCauley JL, Saarela J, Cotsapas C. Genetics of multiple sclerosis: lessons from polygenicity. *Lancet Neurol* 2022;21(9):830-42.
76. Goscinski WJ, McIntosh P, Felzmann U, Maksimenko A, Hall CJ, Gureyev T, Thompson D, Janke A, Galloway G, Killeen NE, Raniga P, Kaluza O, Ng A, Poudel G, Barnes DG, Nguyen T, Bonnington P, Egan GF. The multi-modal Australian ScienceS Imaging and Visualization Environment (MASSIVE) high performance computing infrastructure: applications in neuroscience and neuroinformatics research. *Front Neuroinform* 2014;8:30.
77. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2010;50:323-54.
78. Gross CC, Ahmetshahic D, Ruck T, Schulte-Mecklenbeck A, Schwarte K, Jorgens S, Scheu S, Windhagen S, Graefe B, Melzer N, Klotz L, Arolt V, Wiendl H, Meuth SG, Alferink J.

- Alemtuzumab treatment alters circulating innate immune cells in multiple sclerosis. *Neuro Immunol Neuroinflamm* 2016a;3(6):e289.
79. Gross CC, Schulte-Mecklenbeck A, Runzi A, Kuhlmann T, Posevitz-Fejfar A, Schwab N, Schneider-Hohendorf T, Herich S, Held K, Konjevic M, Hartwig M, Dornmair K, Hohlfeld R, Ziemssen T, Klotz L, Meuth SG, Wiendl H. Impaired NK-mediated regulation of T-cell activity in multiple sclerosis is reconstituted by IL-2 receptor modulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016b;113(21):E2973-82.
 80. Gross R, Healy BC, Cepok S, Chitnis T, Khoury SJ, Hemmer B, Weiner HL, Hafler DA, De Jager PL. Population structure and HLA DRB1 1501 in the response of subjects with multiple sclerosis to first-line treatments. *J Neuroimmunol* 2011;233(1-2):168-74.
 81. Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, Terwedow H, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Haynes CS, Roses AD, Lee A, Shaner B, Menold M, Seboun E, Fitoussi RP, Gartioux C, Reyes C, Ribierre F, Gyapay G, Weissenbach J, Hauser SL, Goodkin DE, Lincoln R, Usuku K, Oksenberg JR, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Nat Genet* 1996;13(4):469-71.
 82. Hametner S, Dal Bianco A, Trattinig S, Lassmann H. Iron related changes in MS lesions and their validity to characterize MS lesion types and dynamics with Ultra-high field magnetic resonance imaging. *Brain Pathol* 2018;28(5):743-9.
 83. Hansen T, Skytthe A, Stenager E, Petersen HC, Kyvik KO, Bronnum-Hansen H. Risk for multiple sclerosis in dizygotic and monozygotic twins. *Mult Scler* 2005;11(5):500-3.
 84. Hauser SL, Bar-Or A, Cohen JA, Comi G, Correale J, Coyle PK, Cross AH, de Seze J, Leppert D, Montalban X, Selmaj K, Wiendl H, Kerloeguen C, Willi R, Li B, Kakarieka A, Tomic D, Goodyear A, Pingili R, Haring DA, Ramanathan K, Merschhemke M, Kappos L, Asclepios I, Groups AIT. Ofatumumab versus Teriflunomide in Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2020;383(6):546-57.
 85. Hauser SL, Belachew S, Kappos L. Ocrelizumab in Primary Progressive and Relapsing Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376(17):1694.
 86. Hauser SL, Cree BAC. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am J Med* 2020;133(12):1380-90 e2.
 87. Hausmann M, Paul G, Kellermeier S, Frey I, Scholmerich J, Falk W, Menzel K, Fried M, Herfarth H, Rogler G. (GT)_N dinucleotide repeat polymorphism of haem oxygenase-1

- promotor region is not associated with inflammatory bowel disease risk or disease course. *Clin Exp Immunol* 2008;153(1):81-5.
88. Havrdova E, Galetta S, Stefoski D, Comi G. Freedom from disease activity in multiple sclerosis. *Neurology* 2010;74 Suppl 3:S3-7.
 89. Havrdova E, Kobelt G, Berg J, Capsa D, Gannedahl M, Dolezal T, European Multiple Sclerosis Platform. New insights into the burden and costs of multiple sclerosis in Europe: Results of the Czech Republic. *Mult Scler* 2017;23(2_suppl):41-52.
 90. He A, Merkel B, Brown JWL, Zhovits Ryerson L, Kister I, Malpas CB, Sharmin S, Horakova D, Kubala Havrdova E, Spelman T, Izquierdo G, Eichau S, Trojano M, Lugaresi A, Hupperts R, Sola P, Ferraro D, Lycke J, Grand'Maison F, Prat A, Girard M, Duquette P, Larochelle C, Svenningsson A, Petersen T, Grammond P, Granella F, Van Pesch V, Bergamaschi R, McGuigan C, Coles A, Hillert J, Piehl F, Butzkueven H, Kalincik T, group MSs. Timing of high-efficacy therapy for multiple sclerosis: a retrospective observational cohort study. *Lancet Neurol* 2020;19(4):307-16.
 91. He Q, Gu L, Lin Q, Ma Y, Liu C, Pei X, Li PA, Yang Y. The *Imp2l* Mutation Causes Ovarian Aging Through ROS-Wnt/beta-Catenin-Estrogen Pathway: Preventive Effect of Melatonin. *Endocrinology* 2020;161(9).
 92. Hedstrom AK, Alfredsson L, Lundkvist Ryner M, Fogdell-Hahn A, Hillert J, Olsson T. Smokers run increased risk of developing anti-natalizumab antibodies. *Mult Scler* 2014a;20(8):1081-5.
 93. Hedstrom AK, Hillert J, Olsson T, Alfredsson L. Smoking and multiple sclerosis susceptibility. *Eur J Epidemiol* 2013;28(11):867-74.
 94. Hedstrom AK, Ryner M, Fink K, Fogdell-Hahn A, Alfredsson L, Olsson T, Hillert J. Smoking and risk of treatment-induced neutralizing antibodies to interferon beta-1a. *Mult Scler* 2014b;20(4):445-50.
 95. Hibbs ML, Bonadonna L, Scott BM, McKenzie IF, Hogarth PM. Molecular cloning of a human immunoglobulin G Fc receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988;85(7):2240-4.
 96. Hocevar K, Ristic S, Peterlin B. Pharmacogenomics of Multiple Sclerosis: A Systematic Review. *Front Neurol* 2019;10:134.
 97. Horio T, Morishita E, Mizuno S, Uchino K, Hanamura I, Espinoza JL, Morishima Y, Kodera Y, Onizuka M, Kashiwase K, Fukuda T, Doki N, Miyamura K, Mori T, Nakao S, Takami A. Donor

- Heme Oxygenase-1 Promoter Gene Polymorphism Predicts Survival after Unrelated Bone Marrow Transplantation for High-Risk Patients. *Cancers (Basel)* 2020;12(2).
98. Hu QD, Ang BT, Karsak M, Hu WP, Cui XY, Duka T, Takeda Y, Chia W, Sankar N, Ng YK, Ling EA, Maciag T, Small D, Trifonova R, Kopan R, Okano H, Nakafuku M, Chiba S, Hirai H, Aster JC, Schachner M, Pallen CJ, Watanabe K, Xiao ZC. F3/contactin acts as a functional ligand for Notch during oligodendrocyte maturation. *Cell* 2003;115(2):163-75.
99. Hua LH, Hersh CM, Tian F, Mowry EM, Fitzgerald KC. Clinical characteristics of a large multi-center cohort of people with multiple sclerosis over age 60. *Mult Scler Relat Disord* 2021;47:102637.
100. Huang Y, Xu Z, Xiong S, Sun F, Qin G, Hu G, Wang J, Zhao L, Liang YX, Wu T, Lu Z, Humayun MS, So KF, Pan Y, Li N, Yuan TF, Rao Y, Peng B. Repopulated microglia are solely derived from the proliferation of residual microglia after acute depletion. *Nat Neurosci* 2018;21(4):530-40.
101. Hughes S, Spelman T, Trojano M, Lugaresi A, Izquierdo G, Grand'maison F, Duquette P, Girard M, Grammond P, Oreja-Guevara C, Hupperts R, Boz C, Bergamaschi R, Giuliani G, Rio ME, Lechner-Scott J, van Pesch V, Iuliano G, Fiol M, Verheul F, Barnett M, Slee M, Herbert J, Kister I, Vella N, Moore F, Petkovska-Boskova T, Shaygannejad V, Jokubaitis V, McDonnell G, Hawkins S, Kee F, Gray O, Butzkueven H, Group MSS. The Kurtzke EDSS rank stability increases 4 years after the onset of multiple sclerosis: results from the MSBase Registry. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012;83(3):305-10.
102. Chabot S, Williams G, Yong VW. Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferonbeta-1b. *J Clin Invest* 1997;100(3):604-12.
103. Chakrabarty A, Emerson MR, LeVine SM. Heme oxygenase-1 in SJL mice with experimental allergic encephalomyelitis. *Mult Scler* 2003;9(4):372-81.
104. Chen SJ, Wang YL, Lo WT, Wu CC, Hsieh CW, Huang CF, Lan YH, Wang CC, Chang DM, Sytwu HK. Erythropoietin enhances endogenous haem oxygenase-1 and represses immune responses to ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 2010;162(2):210-23.
105. Chen YH, Lin SJ, Lin MW, Tsai HL, Kuo SS, Chen JW, Charng MJ, Wu TC, Chen LC, Ding YA, Pan WH, Jou YS, Chau LY. Microsatellite polymorphism in promoter of heme oxygenase-1

- gene is associated with susceptibility to coronary artery disease in type 2 diabetic patients. *Hum Genet* 2002;111(1):1-8.
- 106.Cheng X, Ku CH, Siow RC. Regulation of the Nrf2 antioxidant pathway by microRNAs: New players in micromanaging redox homeostasis. *Free Radic Biol Med* 2013;64:4-11.
- 107.Chitnis T, Graves J, Weinstock-Guttman B, Belman A, Olsen C, Misra M, Aaen G, Benson L, Candee M, Gorman M, Greenberg B, Krupp L, Lotze T, Mar S, Ness J, Rose J, Rubin J, Schreiner T, Tillema J, Waldman A, Rodriguez M, Casper C, Waubant E, Centers USNoPM. Distinct effects of obesity and puberty on risk and age at onset of pediatric MS. *Ann Clin Transl Neurol* 2016;3(12):897-907.
- 108.Chora AA, Fontoura P, Cunha A, Pais TF, Cardoso S, Ho PP, Lee LY, Sobel RA, Steinman L, Soares MP. Heme oxygenase-1 and carbon monoxide suppress autoimmune neuroinflammation. *J Clin Invest* 2007;117(2):438-47.
- 109.laffaldano P, Lucisano G, Butzkueven H, Hillert J, Hyde R, Koch-Henriksen N, Magyari M, Pellegrini F, Spelman T, Sorensen PS, Vukusic S, Trojano M. Early treatment delays long-term disability accrual in RRMS: Results from the BMSD network. *Mult Scler* 2021:13524585211010128.
- 110.ILLUMINA. Infinium® Expanded Multi-Ethnic Genotyping Array (MEGAEX): Data Sheet. In: *Illumina* [online]. San Diego, California, USA, 2015 [cit. 2023-03-05]. Dostupné z: www.illumina.com
- 111.International HapMap Consortium. The International HapMap Project. *Nature* 2003;426(6968):789-96.
- 112.International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Multiple sclerosis genomic map implicates peripheral immune cells and microglia in susceptibility. *Science* 2019;365(6460).
- 113.International Multiple Sclerosis Genetics Consortium , Beecham AH, Patsopoulos NA, Xifara DK, Davis MF, Kempainen A, Cotsapas C, Shah TS, Spencer C, Booth D, Goris A, Oturai A, Saarela J, Fontaine B, Hemmer B, Martin C, Zipp F, D'Alfonso S, Martinelli-Boneschi F, Taylor B, Harbo HF, Kockum I, Hillert J, Olsson T, Ban M, Oksenberg JR, Hintzen R, Barcellos LF, Wellcome Trust Case Control C, International IBDGC, Agliardi C, Alfredsson L, Alizadeh M, Anderson C, Andrews R, Sondergaard HB, Baker A, Band G, Baranzini SE, Barizzone N, Barrett J, Bellenguez C, Bergamaschi L, Bernardinelli L, Berthele A, Biberacher V, Binder TM, Blackburn H, Bomfim IL, Brambilla P, Broadley S, Brochet B, Brundin L, Buck D, Butzkueven H, Caillier SJ, Camu W, Carpentier W, Cavalla P, Celius EG, Coman I, Comi G,

Corrado L, Cosemans L, Cournu-Rebeix I, Cree BA, Cusi D, Damotte V, Defer G, Delgado SR, Deloukas P, di Sapio A, Dilthey AT, Donnelly P, Dubois B, Duddy M, Edkins S, Elovaara I, Esposito F, Evangelou N, Fiddes B, Field J, Franke A, Freeman C, Frohlich IY, Galimberti D, Gieger C, Gourraud PA, Graetz C, Graham A, Grummel V, Guaschino C, Hadjixenofontos A, Hakonarson H, Halfpenny C, Hall G, Hall P, Hamsten A, Harley J, Harrower T, Hawkins C, Hellenthal G, Hillier C, Hobart J, Hoshi M, Hunt SE, Jagodic M, Jelcic I, Jochim A, Kendall B, Kermod A, Kilpatrick T, Koivisto K, Konidari I, Korn T, Kronsbein H, Langford C, Larsson M, Lathrop M, Lebrun-Frenay C, Lechner-Scott J, Lee MH, Leone MA, Leppa V, Liberatore G, Lie BA, Lill CM, Linden M, Link J, Luessi F, Lycke J, Macciardi F, Mannisto S, Manrique CP, Martin R, Martinelli V, Mason D, Mazibrada G, McCabe C, Mero IL, Mescheriakova J, Moutsianas L, Myhr KM, Nagels G, Nicholas R, Nilsson P, Piehl F, Pirinen M, Price SE, Quach H, Reunanen M, Robberecht W, Robertson NP, Rodegher M, Rog D, Salvetti M, Schnetz-Boutaud NC, Sellebjerg F, Selter RC, Schaefer C, Shaunak S, Shen L, Shields S, Siffrin V, Slee M, Sorensen PS, Sorosina M, Sospedra M, Spurkland A, Strange A, Sundqvist E, Thijs V, Thorpe J, Ticca A, Tienari P, van Duijn C, Visser EM, Vucic S, Westerlind H, Wiley JS, Wilkins A, Wilson JF, Winkelmann J, Zajicek J, Zindler E, Haines JL, Pericak-Vance MA, Ivinson AJ, Stewart G, Hafler D, Hauser SL, Compston A, McVean G, De Jager P, Sawcer SJ, McCauley JL. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2013;45(11):1353-60.

114. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007;357(9):851-62.

115. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, Dilthey A, Su Z, Freeman C, Hunt SE, Edkins S, Gray E, Booth DR, Potter SC, Goris A, Band G, Oturai AB, Strange A, Saarela J, Bellenguez C, Fontaine B, Gillman M, Hemmer B, Gwilliam R, Zipp F, Jayakumar A, Martin R, Leslie S, Hawkins S, Giannoulatou E, D'Alfonso S, Blackburn H, Martinelli Boneschi F, Liddle J, Harbo HF, Perez ML, Spurkland A, Waller MJ, Mycko MP, Ricketts M, Comabella M, Hammond N, Kockum I, McCann OT, Ban M, Whittaker P, Kempainen A, Weston P, Hawkins C, Widaa S, Zajicek J, Dronov S, Robertson

N, Bumpstead SJ, Barcellos LF, Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BA, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, de Bakker PI, Debouverie M, D'Hooghe M B, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SF, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung HP, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermode AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppa V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macciardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero IL, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr KM, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanan M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Ruckert IM, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PM, Smestad C, Sorensen PS, Sondergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen AM, Sundqvist E, Syvanen AC, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CN, Wichmann HE, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivins AJ, De Jager PL, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011;476(7359):214-9.

116. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium. Low-Frequency and Rare-Coding Variation Contributes to Multiple Sclerosis Risk. *Cell* 2018;175(6):1679-87 e7.

117. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH, Alam JJ, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownschidle CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty DS, Kinkel RP, Mass MK, Munschauer FE, 3rd, Priore RL, Pullicino PM, Scherokman BJ, Whitham RH, et al. Intramuscular interferon beta-1a for

- disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996;39(3):285-94.
118. Jerome F, Trevor H, Robert T. Additive logistic regression: a statistical view of boosting (With discussion and a rejoinder by the authors). 2000 4/1;28(2):. *The Annals of Statistics*. 2000;4(28):337-407.
119. Jersild C, Svejgaard A, Fog T. HL-A antigens and multiple sclerosis. *Lancet* 1972;1(7762):1240-1.
120. JH F. Greedy Function Approximation: A Gradient Boosting Machine. *The Annals of Statistics* 2001;29(5):1189-232.
121. Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB, Vollmer T, Weiner LP, Wolinsky JS, Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. *Neurology* 1998;50(3):701-8.
122. Jokubaitis VG, Campagna MP, Ibrahim O, Stankovich J, Kleinova P, Matesanz F, Hui D, Eichau S, Slee M, Lechner-Scott J, Lea R, Kilpatrick TJ, Kalincik T, De Jager PL, Beecham A, McCauley JL, Taylor BV, Vucic S, Laverick L, Vodehnalova K, Garcia-Sanchez MI, Alcina A, van der Walt A, Havrdova EK, Izquierdo G, Patsopoulos N, Horakova D, Butzkueven H. Not all roads lead to the immune system: the genetic basis of multiple sclerosis severity. *Brain* 2022.
123. Kalincik T, Manouchehrinia A, Sobisek L, Jokubaitis V, Spelman T, Horakova D, Havrdova E, Trojano M, Izquierdo G, Lugaresi A, Girard M, Prat A, Duquette P, Grammond P, Sola P, Hupperts R, Grand'Maison F, Pucci E, Boz C, Alroughani R, Van Pesch V, Lechner-Scott J, Terzi M, Bergamaschi R, Iuliano G, Granella F, Spitaleri D, Shaygannejad V, Oreja-Guevara C, Slee M, Ampapa R, Verheul F, McCombe P, Olascoaga J, Amato MP, Vucic S, Hodgkinson S, Ramo-Tello C, Flechter S, Cristiano E, Rozsa C, Moore F, Luis Sanchez-Menoyo J, Laura Saladino M, Barnett M, Hillert J, Butzkueven H, Group MSS. Towards personalized therapy for multiple sclerosis: prediction of individual treatment response. *Brain* 2017;140(9):2426-43.
124. Kang S, Kim W, Jeong S, Lee Y, Nam J, Lee S, Jung Y. Oxidized 5-aminosalicylic acid activates Nrf2-HO-1 pathway by covalently binding to Keap1: Implication in anti-inflammatory actions of 5-aminosalicylic acid. *Free Radic Biol Med* 2017;108:715-24.

125. Kappos L, Bar-Or A, Cree BAC, Fox RJ, Giovannoni G, Gold R, Vermersch P, Arnold DL, Arnould S, Scherz T, Wolf C, Wallstrom E, Dahlke F, Investigators EC. Siponimod versus placebo in secondary progressive multiple sclerosis (EXPAND): a double-blind, randomised, phase 3 study. *Lancet* 2018;391(10127):1263-73.
126. Kappos L, Fox RJ, Burcklen M, Freedman MS, Havrdova EK, Hennessy B, Hohlfeld R, Lublin F, Montalban X, Pozzilli C, Scherz T, D'Ambrosio D, Linscheid P, Vaclavkova A, Pirozek-Lawniczek M, Kracker H, Sprenger T. Ponesimod Compared With Teriflunomide in Patients With Relapsing Multiple Sclerosis in the Active-Comparator Phase 3 OPTIMUM Study: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Neurol* 2021;78(5):558-67.
127. Kappos L, Radue EW, O'Connor P, Polman C, Hohlfeld R, Calabresi P, Selmaj K, Agoropoulou C, Leyk M, Zhang-Auberson L, Burtin P, Group FS. A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2010;362(5):387-401.
128. Kappos L, Wolinsky JS, Giovannoni G, Arnold DL, Wang Q, Bernasconi C, Model F, Koendgen H, Manfrini M, Belachew S, Hauser SL. Contribution of Relapse-Independent Progression vs Relapse-Associated Worsening to Overall Confirmed Disability Accumulation in Typical Relapsing Multiple Sclerosis in a Pooled Analysis of 2 Randomized Clinical Trials. *JAMA Neurol* 2020;77(9):1132-40.
129. Karam RA, Rezk NA, Amer MM, Fathy HA. Immune response genes receptors expression and polymorphisms in relation to multiple sclerosis susceptibility and response to INF-beta therapy. *IUBMB Life* 2016;68(9):727-34.
130. Karni A, Abraham M, Monsonogo A, Cai G, Freeman GJ, Hafler D, Khoury SJ, Weiner HL. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* 2006;177(6):4196-202.
131. Katana E, Skoura L, Giakoustidis D, Takoudas D, Malisiovas N, Daniilidis M. Association between the heme oxygenase-1 promoter polymorphism and renal transplantation outcome in Greece. *Transplant Proc* 2010;42(7):2479-85.
132. Kaufmann T, van der Meer D, Doan NT, Schwarz E, Lund MJ, Agartz I, Alnaes D, Barch DM, Baur-Streubel R, Bertolino A, Bettella F, Beyer MK, Boen E, Borgwardt S, Brandt CL, Buitelaar J, Celius EG, Cervenka S, Conzelmann A, Cordova-Palomera A, Dale AM, de Quervain DJF, Di Carlo P, Djurovic S, Dorum ES, Eisenacher S, Elvsashagen T, Espeseth T, Fatouros-Bergman H, Flyckt L, Franke B, Frei O, Haatveit B, Haberg AK, Harbo HF, Hartman

- CA, Heslenfeld D, Hoekstra PJ, Hogestol EA, Jernigan TL, Jonassen R, Jonsson EG, Karolinska Schizophrenia P, Kirsch P, Kloszewska I, Kolskar KK, Landro NI, Le Hellard S, Lesch KP, Lovestone S, Lundervold A, Lundervold AJ, Maglanoc LA, Malt UF, Mecocci P, Melle I, Meyer-Lindenberg A, Moberget T, Norbom LB, Nordvik JE, Nyberg L, Oosterlaan J, Papalino M, Papassotiropoulos A, Pauli P, Pergola G, Persson K, Richard G, Rokicki J, Sanders AM, Selbaek G, Shadrin AA, Smeland OB, Soininen H, Sowa P, Steen VM, Tsolaki M, Ulrichsen KM, Vellas B, Wang L, Westman E, Ziegler GC, Zink M, Andreassen OA, Westlye LT. Common brain disorders are associated with heritable patterns of apparent aging of the brain. *Nat Neurosci* 2019;22(10):1617-23.
133. Kawabata Galbraith K, Fujishima K, Mizuno H, Lee SJ, Uemura T, Sakimura K, Mishina M, Watanabe N, Kengaku M. MTSS1 Regulation of Actin-Nucleating Formin DAAM1 in Dendritic Filopodia Determines Final Dendritic Configuration of Purkinje Cells. *Cell Rep* 2018;24(1):95-106 e9.
134. Keller CW, Ruck T, McHugh D, Pfeuffer S, Gross CC, Korsukewitz C, Melzer N, Klotz L, Meuth SG, Munz C, Nimmerjahn F, Wiendl H, Lunemann JD. Impact of FcγR variants on the response to alemtuzumab in multiple sclerosis. *Ann Clin Transl Neurol* 2019;6(12):2586-94.
135. Kidd T, Carey N, Mold F, Westwood S, Miklaucich M, Konstantara E, Sterr A, Cooke D. A systematic review of the effectiveness of self-management interventions in people with multiple sclerosis at improving depression, anxiety and quality of life. *PLoS One* 2017;12(10):e0185931.
136. King IL, Dickendesher TL, Segal BM. Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* 2009;113(14):3190-7.
137. Kingwell E, Leray E, Zhu F, Petkau J, Edan G, Oger J, Tremlett H. Multiple sclerosis: effect of beta interferon treatment on survival. *Brain* 2019;142(5):1324-33.
138. Kipp M, Amor S, Krauth R, Beyer C. Multiple sclerosis: neuroprotective alliance of estrogen-progesterone and gender. *Front Neuroendocrinol* 2012;33(1):1-16.
139. Koch-Henriksen N, Sorensen PS, Magyari M. Relapses add to permanent disability in relapsing multiple sclerosis patients. *Mult Scler Relat Disord* 2021;53:103029.
140. Kral A, Kovarnik T, Kralik L, Skalicka H, Horak J, Mintz GS, Uhrova J, Sonka M, Wahle A, Downe R, Aschermann M, Martasek P, Linhart A. Genetic variants in haem oxygenase-1

- and endothelial nitric oxide synthase influence the extent and evolution of coronary artery atherosclerosis. *Folia Biol (Praha)* 2011;57(5):182-90.
141. Krueger JG, McInnes IB, Blauvelt A. Tyrosine kinase 2 and Janus kinase–signal transducer and activator of transcription signaling and inhibition in plaque psoriasis. *J Am Acad Dermatol* 2022;86(1):148-57.
142. Kuhlmann T, Ludwin S, Prat A, Antel J, Bruck W, Lassmann H. An updated histological classification system for multiple sclerosis lesions. *Acta Neuropathol* 2017;133(1):13-24.
143. Kulakova OG, Tsareva EY, Boyko AN, Shchur SG, Gusev EI, Lvovs D, Favorov AV, Vandebroek K, Favorova OO. Allelic combinations of immune-response genes as possible composite markers of IFN-beta efficacy in multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics* 2012;13(15):1689-700.
144. Kulakova OG, Tsareva EY, Lvovs D, Favorov AV, Boyko AN, Favorova OO. Comparative pharmacogenetics of multiple sclerosis: IFN-beta versus glatiramer acetate. *Pharmacogenomics* 2014;15(5):679-85.
145. Kumar S, Bandyopadhyay U. Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett* 2005;157(3):175-88.
146. Kuokkanen S, Sundvall M, Terwilliger JD, Tienari PJ, Wikstrom J, Holmdahl R, Pettersson U, Peltonen L. A putative vulnerability locus to multiple sclerosis maps to 5p14-p12 in a region syntenic to the murine locus Eae2. *Nat Genet* 1996;13(4):477-80.
147. Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983;33(11):1444-52.
148. Kurtzke JF. Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress. *Brain* 2013;136(Pt 9):2904-17.
149. Lanz TV, Brewer RC, Ho PP, Moon JS, Jude KM, Fernandez D, Fernandes RA, Gomez AM, Nadj GS, Bartley CM, Schubert RD, Hawes IA, Vazquez SE, Iyer M, Zuchero JB, Teegen B, Dunn JE, Lock CB, Kipp LB, Cotham VC, Ueberheide BM, Aftab BT, Anderson MS, DeRisi JL, Wilson MR, Bashford-Rogers RJM, Platten M, Garcia KC, Steinman L, Robinson WH. Clonally expanded B cells in multiple sclerosis bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature* 2022;603(7900):321-7.
150. Laugel B, Borlat F, Galibert L, Vicari A, Weissert R, Chvatchko Y, Bruniquel D. Cladribine inhibits cytokine secretion by T cells independently of deoxycytidine kinase activity. *J Neuroimmunol* 2011;240-241:52-7.

151. Le M, Malpas C, Sharmin S, Horakova D, Havrdova E, Trojano M, Izquierdo G, Eichau S, Ozakbas S, Lugaresi A, Prat A, Girard M, Duquette P, Larochelle C, Alroughani R, Bergamaschi R, Sola P, Ferraro D, Grammond P, Grand' Maison F, Terzi M, Boz C, Hupperts R, Butzkueven H, Pucci E, Granella F, Van Pesch V, Soysal A, Yamout BI, Lechner-Scott J, Spitaleri D, Ampapa R, Turkoglu R, Iuliano G, Ramo-Tello C, Sanchez-Menoyo JL, Sidhom Y, Gouider R, Shaygannejad V, Prevost J, Altintas A, Fragoso YD, McCombe PA, Petersen T, Slee M, Barnett MH, Vucic S, Van Der Walt A, Kalincik T. Disability outcomes of early cerebellar and brainstem symptoms in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2021;27(5):755-66.
152. Lebrun-Frenay C, Kantarci O, Siva A, Sormani MP, Pelletier D, Okuda DT, year Risc study group on behalf of Sfsep O. Radiologically Isolated Syndrome: 10-Year Risk Estimate of a Clinical Event. *Ann Neurol* 2020;88(2):407-17.
153. Levine SM, Chakrabarty A. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1012:252-66.
154. Lincoln MR, Schneider R, Oh J. Vitamin D as disease-modifying therapy for multiple sclerosis? *Expert Rev Clin Immunol* 2021;17(7):691-3.
155. Lisak RP, Nedelkoska L, Benjamins JA, Schalk D, Bealmear B, Touil H, Li R, Muirhead G, Bar-Or A. B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *J Neuroimmunol* 2017;309:88-99.
156. Liu Y, Zhu B, Luo L, Li P, Paty DW, Cynader MS. Heme oxygenase-1 plays an important protective role in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Neuroreport* 2001;12(9):1841-5.
157. Locatelli G, Theodorou D, Kendirli A, Jordao MJC, Staszewski O, Phulphagar K, Cantuti-Castelvetri L, Dagkalis A, Bessis A, Simons M, Meissner F, Prinz M, Kerschensteiner M. Mononuclear phagocytes locally specify and adapt their phenotype in a multiple sclerosis model. *Nat Neurosci* 2018;21(9):1196-208.
158. Loh PR, Tucker G, Bulik-Sullivan BK, Vilhjalmsjon BJ, Finucane HK, Salem RM, Chasman DI, Ridker PM, Neale BM, Berger B, Patterson N, Price AL. Efficient Bayesian mixed-model analysis increases association power in large cohorts. *Nat Genet* 2015;47(3):284-90.
159. Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat Genet* 2003;33(2):177-82.

160. Lotfi K, Juliusson G, Albertioni F. Pharmacological basis for cladribine resistance. *Leuk Lymphoma* 2003;44(10):1705-12.
161. Louveau A, Smirnov I, Keyes TJ, Eccles JD, Rouhani SJ, Peske JD, Derecki NC, Castle D, Mandell JW, Lee KS, Harris TH, Kipnis J. Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 2015;523(7560):337-41.
162. Lublin FD, Haring DA, Ganjgahi H, Ocampo A, Hatami F, Cuklina J, Aarden P, Dahlke F, Arnold DL, Wiendl H, Chitnis T, Nichols TE, Kieseier BC, Bermel RA. How patients with multiple sclerosis acquire disability. *Brain* 2022;145(9):3147-61.
163. Lublin FD, Reingold SC, Cohen JA, Cutter GR, Sorensen PS, Thompson AJ, Wolinsky JS, Balcer LJ, Banwell B, Barkhof F, Bebo B, Jr., Calabresi PA, Clanet M, Comi G, Fox RJ, Freedman MS, Goodman AD, Inglese M, Kappos L, Kieseier BC, Lincoln JA, Lubetzki C, Miller AE, Montalban X, O'Connor PW, Petkau J, Pozzilli C, Rudick RA, Sormani MP, Stuve O, Waubant E, Polman CH. Defining the clinical course of multiple sclerosis: the 2013 revisions. *Neurology* 2014;83(3):278-86.
164. Lutfullin I, Eveslage M, Bittner S, Antony G, Flaskamp M, Luessi F, Salmen A, Gisevius B, Klotz L, Korsukewitz C, Berthele A, Groppa S, Then Bergh F, Wildemann B, Bayas A, Tumani H, Meuth SG, Trebst C, Zettl UK, Paul F, Heesen C, Kuempfel T, Gold R, Hemmer B, Zipp F, Wiendl H, Lunemann JD, German Competence Network Multiple S. Association of obesity with disease outcome in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2022.
165. Magne D, Mezin F, Palmer G, Guerne PA. The active metabolite of leflunomide, A77 1726, increases proliferation of human synovial fibroblasts in presence of IL-1beta and TNF-alpha. *Inflamm Res* 2006;55(11):469-75.
166. Mahad DH, Trapp BD, Lassmann H. Pathological mechanisms in progressive multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2015;14(2):183-93.
167. Mahurkar S, Moldovan M, Suppiah V, Sorosina M, Clarelli F, Liberatore G, Malhotra S, Montalban X, Antiguada A, Krupa M, Jokubaitis VG, McKay FC, Gatt PN, Fabis-Pedrini MJ, Martinelli V, Comi G, Lechner-Scott J, Kermod AG, Slee M, Taylor BV, Vandebroek K, Comabella M, Boneschi FM, Australian, New Zealand Multiple Sclerosis Genetics C, King C. Response to interferon-beta treatment in multiple sclerosis patients: a genome-wide association study. *Pharmacogenomics J* 2017;17(4):312-8.

168. Makarem YS, Hareedy MS, Hassanien M, Ahmed EA, Hetta HF, Mohamed AA. Frequency and impact of DHODH, ABCG2 and CYP2C19 SNPs on the therapeutic efficacy, tolerability and toxicity of leflunomide. *Pharmacogenomics* 2021;22(18):1201-9.
169. Manouchehrinia A, Huang J, Hillert J, Alfredsson L, Olsson T, Kockum I, Constantinescu CS. Smoking Attributable Risk in Multiple Sclerosis. *Front Immunol* 2022;13:840158.
170. Manouchehrinia A, Tench CR, Maxted J, Bibani RH, Britton J, Constantinescu CS. Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study. *Brain* 2013;136(Pt 7):2298-304.
171. Manouchehrinia A, Westerlind H, Kingwell E, Zhu F, Carruthers R, Ramanujam R, Ban M, Glaser A, Sawcer S, Tremlett H, Hillert J. Age Related Multiple Sclerosis Severity Score: Disability ranked by age. *Mult Scler* 2017;23(14):1938-46.
172. Maple PA, Ascherio A, Cohen JI, Cutter G, Giovannoni G, Shannon-Lowe C, Tanasescu R, Gran B. The Potential for EBV Vaccines to Prevent Multiple Sclerosis. *Front Neurol* 2022;13:887794.
173. Marshall O, Lu H, Brisset JC, Xu F, Liu P, Herbert J, Grossman RI, Ge Y. Impaired cerebrovascular reactivity in multiple sclerosis. *JAMA Neurol* 2014;71(10):1275-81.
174. Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Annals of neurology* 2000;48(2):211-9.
175. McGinley MP, Goldschmidt CH, Rae-Grant AD. Diagnosis and Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *JAMA* 2021;325(8):765-79.
176. Medana I, Martinic MA, Wekerle H, Neumann H. Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am J Pathol* 2001;159(3):809-15.
177. Medina MV, Sapochnik D, Garcia Sola M, Coso O. Regulation of the Expression of Heme Oxygenase-1: Signal Transduction, Gene Promoter Activation, and Beyond. *Antioxid Redox Signal* 2020;32(14):1033-44.
178. Mi H, Thomas P. PANTHER pathway: an ontology-based pathway database coupled with data analysis tools. *Methods Mol Biol* 2009;563:123-40.
179. Minkeviciene R, Hlushchenko I, Virenque A, Lahti L, Khanal P, Rauramaa T, Koistinen A, Leinonen V, Noe FM, Hotulainen P. MIM-Deficient Mice Exhibit Anatomical Changes in Dendritic Spines, Cortex Volume and Brain Ventricles, and Functional Changes in Motor Coordination and Learning. *Front Mol Neurosci* 2019;12:276.

180. Mohn N, Grote-Levi L, Hopfner F, Eiz-Vesper B, Maecker-Kolhoff B, Warnke C, Suhs KW, Wattjes MP, Hoglinger GU, Skripuletz T. Innovative therapeutic concepts of progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Neurol* 2022;269(5):2403-13.
181. Montalban X, Hauser SL, Kappos L, Arnold DL, Bar-Or A, Comi G, de Seze J, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Lublin F, Rammohan KW, Selmaj K, Traboulsee A, Sauter A, Masterman D, Fontoura P, Belachew S, Garren H, Mairon N, Chin P, Wolinsky JS, Investigators OC. Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *N Engl J Med* 2017;376(3):209-20.
182. Motyl J, Friedova L, Vaneckova M, Krasensky J, Lorincz B, Blahova Dusankova J, Anelova M, Fuchs TA, Kubala Havrdova E, Benedict RHB, Horakova D, Uher T. Isolated Cognitive Decline in Neurologically Stable Patients with Multiple Sclerosis. *Diagnostics (Basel)* 2021;11(3).
183. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, Shah TS, Patsopoulos NA, Alfredsson L, Anderson CA, Attfield KE, Baranzini SE, Barrett J, Binder TM, Booth D, Buck D, Celius EG, Cotsapas C, D'Alfonso S, Dendrou CA, Donnelly P, Dubois B, Fontaine B, Lar Fugger L, Goris A, Gourraud PA, Graetz C, Hemmer B, Hillert J, International IBDGC, Kockum I, Leslie S, Lill CM, Martinelli-Boneschi F, Oksenberg JR, Olsson T, Oturai A, Saarela J, Sondergaard HB, Spurkland A, Taylor B, Winkelmann J, Zipp F, Haines JL, Pericak-Vance MA, Spencer CC, Stewart G, Hafler DA, Ivinson AJ, Harbo HF, Hauser SL, De Jager PL, Compston A, McCauley JL, Sawcer S, McVean G, International Multiple Sclerosis Genetics C. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2015a;47(10):1107-13.
184. Moutsianas L, Jostins L, Beecham AH, Dilthey AT, Xifara DK, Ban M, Shah TS, Patsopoulos NA, Alfredsson L, Anderson CA, Attfield KE, Baranzini SE, Barrett J, Binder TMC, Booth D, Buck D, Celius EG, Cotsapas C, D'Alfonso S, Dendrou CA, Donnelly P, Dubois B, Fontaine B, Fugger L, Goris A, Gourraud PA, Graetz C, Hemmer B, Hillert J, International IBDGC, Kockum I, Leslie S, Lill CM, Martinelli-Boneschi F, Oksenberg JR, Olsson T, Oturai A, Saarela J, Sondergaard HB, Spurkland A, Taylor B, Winkelmann J, Zipp F, Haines JL, Pericak-Vance MA, Spencer CCA, Stewart G, Hafler DA, Ivinson AJ, Harbo HF, Hauser SL, De Jager PL, Compston A, McCauley JL, Sawcer S, McVean G. Class II HLA interactions modulate genetic risk for multiple sclerosis. *Nat Genet* 2015b;47(10):1107-13.

185. Mustafa S, Weltermann A, Fritsche R, Marsik C, Wagner O, Kyrle PA, Eichinger S. Genetic variation in heme oxygenase 1 (HMOX1) and the risk of recurrent venous thromboembolism. *J Vasc Surg* 2008;47(3):566-70.
186. Nash A, Aumann TD, Pignoni M, Lichtenthaler SF, Takeshima H, Munro KM, Gunnarsen JM. Lack of Sez6 Family Proteins Impairs Motor Functions, Short-Term Memory, and Cognitive Flexibility and Alters Dendritic Spine Properties. *Cereb Cortex* 2020;30(4):2167-84.
187. Nguyen AL, Eastaugh A, van der Walt A, Jokubaitis VG. Pregnancy and multiple sclerosis: Clinical effects across the lifespan. *Autoimmun Rev* 2019;18(10):102360.
188. Nicaise AM, Wagstaff LJ, Willis CM, Paisie C, Chandok H, Robson P, Fossati V, Williams A, Crocker SJ. Cellular senescence in progenitor cells contributes to diminished remyelination potential in progressive multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2019;116(18):9030-9.
189. Nielsen NM, Munger KL, Koch-Henriksen N, Hougaard DM, Magyari M, Jorgensen KT, Lundqvist M, Simonsen J, Jess T, Cohen A, Stenager E, Ascherio A. Neonatal vitamin D status and risk of multiple sclerosis: A population-based case-control study. *Neurology* 2017;88(1):44-51.
190. Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sorensen PS, Hjalgrim H. Multiple sclerosis after infectious mononucleosis. *Arch Neurol* 2007;64(1):72-5.
191. O'Connor P, Wolinsky JS, Confavreux C, Comi G, Kappos L, Olsson TP, Benzerdjeb H, Truffinet P, Wang L, Miller A, Freedman MS, Group TT. Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2011;365(14):1293-303.
192. Oko A, Wyrwicz LS, Glyda M, Idasiak-Piechocka I, Binczak-Kuleta A, Kaczmarczyk M, Drozd A, Ciechanowicz A, Czekalski S. CD52 gene polymorphism and its potential effect on the response to alemtuzumab in renal transplant recipients. *Ann Acad Med Stetin* 2009;55(2):22-6.
193. Okuda DT, Mowry EM, Beheshtian A, Waubant E, Baranzini SE, Goodin DS, Hauser SL, Pelletier D. Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome. *Neurology* 2009;72(9):800-5.
194. Ontaneda D, Thompson AJ, Fox RJ, Cohen JA. Progressive multiple sclerosis: prospects for disease therapy, repair, and restoration of function. *Lancet* 2017;389(10076):1357-66.
195. Oturai DB, Bach Sondergaard H, Koch-Henriksen N, Andersen C, Laursen JH, Gustavsen S, Kristensen JT, Magyari M, Sorensen PS, Sellebjerg F, Thorner LW, Ullum H, Oturai AB.

- Exposure to passive smoking during adolescence is associated with an increased risk of developing multiple sclerosis. *Mult Scler* 2021;27(2):188-97.
196. Park JH, Shin SD, Song KJ, Hong KJ, Ro YS, Choi JW, Choi SW. Prediction of good neurological recovery after out-of-hospital cardiac arrest: A machine learning analysis. *Resuscitation* 2019;142:127-35.
197. Parks NE, Jackson-Tarlton CS, Vacchi L, Merdad R, Johnston BC. Dietary interventions for multiple sclerosis-related outcomes. *Cochrane Database Syst Rev* 2020;5(5):CD004192.
198. Pawlik A, Herczynska M, Kurzawski M, Safranow K, Dziedziejko V, Drozdziak M. The effect of exon (19C>A) dihydroorotate dehydrogenase gene polymorphism on rheumatoid arthritis treatment with leflunomide. *Pharmacogenomics* 2009;10(2):303-9.
199. Paz-Zulueta M, Paras-Bravo P, Cantarero-Prieto D, Blazquez-Fernandez C, Oterino-Duran A. A literature review of cost-of-illness studies on the economic burden of multiple sclerosis. *Mult Scler Relat Disord* 2020;43:102162.
200. Peroni S, Sorosina M, Malhotra S, Clarelli F, Osiceanu AM, Ferre L, Roostaei T, Rio J, Midaglia L, Villar LM, Alvarez-Cermeno JC, Guaschino C, Radaelli M, Citterio L, Lechner-Scott J, Spataro N, Navarro A, Martinelli V, Montalban X, Weiner HL, de Jager P, Comi G, Esposito F, Comabella M, Martinelli-Boneschi F. A pharmacogenetic study implicates NINJ2 in the response to Interferon-beta in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2020;26(9):1074-82.
201. Pinto MF, Oliveira H, Batista S, Cruz L, Pinto M, Correia I, Martins P, Teixeira C. Prediction of disease progression and outcomes in multiple sclerosis with machine learning. *Scientific Reports* 2020;10(1):21038.
202. Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW, Investigators A. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 2006;354(9):899-910.
203. Preiningerova JL, Jiraskova Zakostelska Z, Srinivasan A, Ticha V, Kovarova I, Kleinova P, Tlaskalova-Hogenova H, Kubala Havrdova E. Multiple Sclerosis and Microbiome. *Biomolecules* 2022;12(3).
204. Prineas JW, Parratt JD. Oligodendrocytes and the early multiple sclerosis lesion. *Ann Neurol* 2012;72(1):18-31.
205. Prinz M, Jung S, Priller J. Microglia Biology: One Century of Evolving Concepts. *Cell* 2019;179(2):292-311.

206. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998;352(9139):1498-504.
207. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, Thomas L, Ferreira MA, Bender D, Maller J, Sklar P, de Bakker PI, Daly MJ, Sham PC. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007;81(3):559-75.
208. Ramanujam R, Hedstrom AK, Manouchehrinia A, Alfredsson L, Olsson T, Bottai M, Hillert J. Effect of Smoking Cessation on Multiple Sclerosis Prognosis. *JAMA Neurol* 2015;72(10):1117-23.
209. Ray PD, Huang BW, Tsuji Y. Coordinated regulation of Nrf2 and histone H3 serine 10 phosphorylation in arsenite-activated transcription of the human heme oxygenase-1 gene. *Biochim Biophys Acta* 2015;1849(10):1277-88.
210. Rep MH, Hintzen RQ, Polman CH, van Lier RA. Recombinant interferon-beta blocks proliferation but enhances interleukin-10 secretion by activated human T-cells. *J Neuroimmunol* 1996;67(2):111-8.
211. Rio J, Rovira A, Gasperini C, Tintore M, Prosperini L, Otero-Romero S, Comabella M, Vidal-Jordana A, Galan I, Midaglia L, Rodriguez-Acevedo B, Zabalza A, Castillo J, Arrambide G, Nos C, Cobo A, Tur C, Auger C, Sastre-Garriga J, Montalban X. Treatment response scoring systems to assess long-term prognosis in self-injectable DMTs relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *J Neurol* 2022;269(1):452-9.
212. Romagnoni A, Jegou S, Van Steen K, Wainrib G, Hugot JP, International Inflammatory Bowel Disease Genetics C. Comparative performances of machine learning methods for classifying Crohn Disease patients using genome-wide genotyping data. *Sci Rep* 2019;9(1):10351.
213. Rosati G. The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol Sci* 2001;22(2):117-39.
214. Ross CJ, Towfic F, Shankar J, Laifenfeld D, Thoma M, Davis M, Weiner B, Kusko R, Zeskind B, Knappertz V, Grossman I, Hayden MR. A pharmacogenetic signature of high response to Copaxone in late-phase clinical-trial cohorts of multiple sclerosis. *Genome Med* 2017;9(1):50.

215. Rossi S, Motta C, Studer V, Monteleone F, De Chiara V, Buttari F, Barbieri F, Bernardi G, Battistini L, Cutter G, Stuve O, Salvetti M, Centonze D. A genetic variant of the anti-apoptotic protein Akt predicts natalizumab-induced lymphocytosis and post-natalizumab multiple sclerosis reactivation. *Mult Scler* 2013;19(1):59-68.
216. Rotstein D, Montalban X. Reaching an evidence-based prognosis for personalized treatment of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2019;15(5):287-300.
217. Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, Achiti I, Confavreux C, Coustans M, le Page E, Edan G, McDonnell GV, Hawkins S, Trojano M, Liguori M, Cocco E, Marrosu MG, Tesser F, Leone MA, Weber A, Zipp F, Mitterski B, Epplen JT, Oturai A, Sorensen PS, Celius EG, Lara NT, Montalban X, Villoslada P, Silva AM, Marta M, Leite I, Dubois B, Rubio J, Butzkueven H, Kilpatrick T, Mycko MP, Selmaj KW, Rio ME, Sa M, Salemi G, Savettieri G, Hillert J, Compston DA. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64(7):1144-51.
218. Rueda B, Oliver J, Robledo G, Lopez-Nevot MA, Balsa A, Pascual-Salcedo D, Gonzalez-Gay MA, Gonzalez-Escribano MF, Martin J. HO-1 promoter polymorphism associated with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 2007;56(12):3953-8.
219. Saarikangas J, Kourdougli N, Senju Y, Chazal G, Segerstrale M, Minkeviciene R, Kuurne J, Mattila PK, Garrett L, Holter SM, Becker L, Racz I, Hans W, Klopstock T, Wurst W, Zimmer A, Fuchs H, Gailus-Durner V, Hrabe de Angelis M, von Ossowski L, Taira T, Lappalainen P, Rivera C, Hotulainen P. MIM-Induced Membrane Bending Promotes Dendritic Spine Initiation. *Dev Cell* 2015;33(6):644-59.
220. Sage PT, Schildberg FA, Sobel RA, Kuchroo VK, Freeman GJ, Sharpe AH. Dendritic Cell PD-L1 Limits Autoimmunity and Follicular T Cell Differentiation and Function. *J Immunol* 2018;200(8):2592-602.
221. Saligrama N, Zhao F, Sikora MJ, Serratelli WS, Fernandes RA, Louis DM, Yao W, Ji X, Idoyaga J, Mahajan VB, Steinmetz LM, Chien YH, Hauser SL, Oksenberg JR, Garcia KC, Davis MM. Opposing T cell responses in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature* 2019;572(7770):481-7.
222. Sato S, Yamamoto K, Matsushita T, Isobe N, Kawano Y, Iinuma K, Niino M, Fukazawa T, Nakamura Y, Watanabe M, Yonekawa T, Masaki K, Yoshimura S, Murai H, Yamasaki R, Kira J, Japan Multiple Sclerosis Genetics C. Copy number variations in multiple sclerosis and neuromyelitis optica. *Ann Neurol* 2015;78(5):762-74.

- 223.Sawcer S. Bayes factors in complex genetics. *Eur J Hum Genet* 2010;18(7):746-50.
- 224.Sawcer S, Ban M, Maranian M, Yeo TW, Compston A, Kirby A, Daly MJ, De Jager PL, Walsh E, Lander ES, Rioux JD, Hafler DA, Ivinson A, Rimmler J, Gregory SG, Schmidt S, Pericak-Vance MA, Akesson E, Hillert J, Datta P, Oturai A, Ryder LP, Harbo HF, Spurkland A, Myhr KM, Laaksonen M, Booth D, Heard R, Stewart G, Lincoln R, Barcellos LF, Hauser SL, Oksenberg JR, Kenealy SJ, Haines JL, International Multiple Sclerosis Genetics C. A high-density screen for linkage in multiple sclerosis. *Am J Hum Genet* 2005;77(3):454-67.
- 225.Sawcer S, Franklin RJ, Ban M. Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol* 2014;13(7):700-9.
- 226.Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, Robertson N, Clayton D, Goodfellow PN, Compston A. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *Nat Genet* 1996;13(4):464-8.
- 227.Sayad A, Ghafouri-Fard S, Omrani MD, Noroozi R, Taheri M. Myxovirus resistance protein A (MxA) polymorphism is associated with IFNbeta response in Iranian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 2017;38(6):1093-9.
- 228.Sellebjerg F, Sondergaard HB, Koch-Henriksen N, Sorensen PS, Oturai AB. Prediction of response to interferon therapy in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2014;130(4):268-75.
- 229.Schillinger M, Exner M, Minar E, Mlekusch W, Mullner M, Mannhalter C, Bach FH, Wagner O. Heme oxygenase-1 genotype and restenosis after balloon angioplasty: a novel vascular protective factor. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(6):950-7.
- 230.Schipper HM, Song W, Zukor H, Hascalovici JR, Zeligman D. Heme oxygenase-1 and neurodegeneration: expanding frontiers of engagement. *J Neurochem* 2009;110(2):469-85.
- 231.Si Z, Sun L, Wang X. Evidence and perspectives of cell senescence in neurodegenerative diseases. *Biomed Pharmacother* 2021;137:111327.
- 232.Simonsen CS, Flemmen HO, Broch L, Brunborg C, Berg-Hansen P, Moen SM, Celius EG. The course of multiple sclerosis rewritten: a Norwegian population-based study on disease demographics and progression. *J Neurol* 2021;268(4):1330-41.
- 233.Simpson S, Jr., Blizzard L, Otahal P, Van der Mei I, Taylor B. Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2011;82(10):1132-41.

- 234.Simpson S, Jr., van der Mei I, Lucas RM, Ponsonby AL, Broadley S, Blizzard L, Ausimmune/AusLong Investigators G, Taylor B. Sun Exposure across the Life Course Significantly Modulates Early Multiple Sclerosis Clinical Course. *Front Neurol* 2018;9:16.
- 235.Sinnecker T, Schumacher S, Mueller K, Pache F, Dusek P, Harms L, Ruprecht K, Nytrova P, Chawla S, Niendorf T, Kister I, Paul F, Ge Y, Wuerfel J. MRI phase changes in multiple sclerosis vs neuromyelitis optica lesions at 7T. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2016;3(4):e259.
- 236.Sock E, Wegner M. Using the lineage determinants Olig2 and Sox10 to explore transcriptional regulation of oligodendrocyte development. *Dev Neurobiol* 2021.
- 237.Sorensen PS, Sellebjerg F, Hartung HP, Montalban X, Comi G, Tintore M. The apparently milder course of multiple sclerosis: changes in the diagnostic criteria, therapy and natural history. *Brain* 2020;143(9):2637-52.
- 238.Spelman T, Magyari M, Piehl F, Svenningsson A, Rasmussen PV, Kant M, Sellebjerg F, Joensen H, Hillert J, Lycke J. Treatment Escalation vs Immediate Initiation of Highly Effective Treatment for Patients With Relapsing-Remitting Multiple Sclerosis: Data From 2 Different National Strategies. *JAMA Neurol* 2021;78(10):1197-204.
- 239.Sriram U, Barcellos LF, Villoslada P, Rio J, Baranzini SE, Caillier S, Stillman A, Hauser SL, Montalban X, Oksenberg JR. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun* 2003;4(2):147-52.
- 240.Stampanoni Bassi M, Buttari F, Simonelli I, Gilio L, Furlan R, Finardi A, Marfia GA, Visconti A, Paolillo A, Storto M, Gambardella S, Ferese R, Salvetti M, Uccelli A, Matarese G, Centonze D, De Vito F. A Single Nucleotide ADA Genetic Variant Is Associated to Central Inflammation and Clinical Presentation in MS: Implications for Cladribine Treatment. *Genes (Basel)* 2020;11(10).
- 241.Suetsugu S, Kurisu S, Takenawa T. Dynamic shaping of cellular membranes by phospholipids and membrane-deforming proteins. *Physiol Rev* 2014;94(4):1219-48.
- 242.Svenningsson A, Frisell T, Burman J, Salzer J, Fink K, Hallberg S, Hambræus J, Axelsson M, Nimer FA, Sundstrom P, Gunnarsson M, Johansson R, Mellergard J, Rosenstein I, Ayad A, Sjoblom I, Risedal A, de Flon P, Gilland E, Lindeberg J, Shawket F, Piehl F, Lycke J. Safety and efficacy of rituximab versus dimethyl fumarate in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis or clinically isolated syndrome in Sweden: a rater-blinded, phase 3, randomised controlled trial. *Lancet Neurol* 2022;21(8):693-703.

243. Tahmasebinia F, Pourgholaminejad A. The role of Th17 cells in auto-inflammatory neurological disorders. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017;79(Pt B):408-16.
244. Tajouri L, Ovcarić M, Curtain R, Johnson MP, Griffiths LR, Csurhes P, Pender MP, Lea RA. Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. *J Neurogenet* 2005;19(1):25-38.
245. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993;43(4):655-61. Thiele Nee Schrewe L, Guse K, Tietz S, Remlinger J, Demir S, Pedreiturria X, Hoepner R, Salmen A, Pistor M, Turner T, Engelhardt B, Hermann DM, Luhder F, Wiese S, Chan A. Functional relevance of the multi-drug transporter *abcg2* on teriflunomide therapy in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2020;17(1):9.
246. Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G, Correale J, Fazekas F, Filippi M, Freedman MS, Fujihara K, Galetta SL, Hartung HP, Kappos L, Lublin FD, Marrie RA, Miller AE, Miller DH, Montalban X, Mowry EM, Sorensen PS, Tintore M, Traboulsee AL, Trojano M, Uitdehaag BMJ, Vukusic S, Waubant E, Weinshenker BG, Reingold SC, Cohen JA. Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol* 2018;17(2):162-73.
247. Tintore M, Cobo-Calvo A, Carbonell P, Arrambide G, Otero-Romero S, Rio J, Tur C, Comabella M, Nos C, Arevalo MJ, Midaglia L, Galan I, Vidal-Jordana A, Castillo J, Rodriguez-Acevedo B, Zabalza A, Salerno A, Auger C, Sastre-Garriga J, Rovira A, Montalban X. Effect of Changes in MS Diagnostic Criteria Over 25 Years on Time to Treatment and Prognosis in Patients With Clinically Isolated Syndrome. *Neurology* 2021.
248. Trapp BD, Stys PK. Virtual hypoxia and chronic necrosis of demyelinated axons in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2009;8(3):280-91.
249. Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 2008;172(1):146-55.
250. Tzima S, Victoratos P, Kranidioti K, Alexiou M, Kollias G. Myeloid heme oxygenase-1 regulates innate immunity and autoimmunity by modulating IFN-beta production. *J Exp Med* 2009;206(5):1167-79.

251. University of California SFMSET, Cree BAC, Hollenbach JA, Bove R, Kirkish G, Sacco S, Caverzasi E, Bischof A, Gundel T, Zhu AH, Papinutto N, Stern WA, Bevan C, Romeo A, Goodin DS, Gelfand JM, Graves J, Green AJ, Wilson MR, Zamvil SS, Zhao C, Gomez R, Ragan NR, Rush GQ, Barba P, Santaniello A, Baranzini SE, Oksenberg JR, Henry RG, Hauser SL. Silent progression in disease activity-free relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2019;85(5):653-66.
252. Van der Walt A, Stankovich J, Bahlo M, Taylor BV, Van der Mei IA, Foote SJ, Rubio JP, Kilpatrick TJ, Butzkueven H. Heterogeneity at the HLA-DRB1 allelic variation locus does not influence multiple sclerosis disease severity, brain atrophy or cognition. *Multiple sclerosis* 2011;17(3):344-52.
253. Vandebergh M, Andlauer TFM, Zhou Y, Mallants K, Held F, Aly L, Taylor BV, Hemmer B, Dubois B, Goris A. Genetic Variation in WNT9B Increases Relapse Hazard in Multiple Sclerosis. *Ann Neurol* 2021;89(5):884-94.
254. Vandebergh M, Dubois B, Goris A. Effects of Vitamin D and Body Mass Index on Disease Risk and Relapse Hazard in Multiple Sclerosis: A Mendelian Randomization Study. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm* 2022;9(3).
255. Vandebroek K, Alloza I, Swaminathan B, Antiguedad A, Otaegui D, Olascoaga J, Barcina MG, de las Heras V, Bartolome M, Fernandez-Arquero M, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R, Cenit MC, Urcelay E. Validation of IRF5 as multiple sclerosis risk gene: putative role in interferon beta therapy and human herpes virus-6 infection. *Genes Immun* 2011;12(1):40-5.
256. Vercellino M, Marasciulo S, Grifoni S, Vallino-Costassa E, Bosa C, Pasanisi MB, Crociara P, Casalone C, Chio A, Giordana MT, Corona C, Cavalla P. Acute and chronic synaptic pathology in multiple sclerosis gray matter. *Mult Scler* 2021:13524585211022174.
257. Verma ND, Lam AD, Chiu C, Tran GT, Hall BM, Hodgkinson SJ. Multiple sclerosis patients have reduced resting and increased activated CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)T regulatory cells. *Sci Rep* 2021;11(1):10476.
258. Veroni C, Serafini B, Rosicarelli B, Fagnani C, Aloisi F. Transcriptional profile and Epstein-Barr virus infection status of laser-cut immune infiltrates from the brain of patients with progressive multiple sclerosis. *J Neuroinflammation* 2018;15(1):18.
259. Vijayan V, Wagener F, Immenschuh S. The macrophage heme-heme oxygenase-1 system and its role in inflammation. *Biochem Pharmacol* 2018;153:159-67.

260. Vosslamber S, van der Voort LF, van den Elskamp IJ, Heijmans R, Aubin C, Uitdehaag BM, Crusius JB, van der Pouw Kraan TC, Comabella M, Montalban X, Hafler DA, De Jager PL, Killestein J, Polman CH, Verweij CL. Interferon regulatory factor 5 gene variants and pharmacological and clinical outcome of Interferonbeta therapy in multiple sclerosis. *Genes Immun* 2011;12(6):466-72.
261. Walton C, King R, Rechtman L, Kaye W, Leray E, Marrie RA, Robertson N, La Rocca N, Uitdehaag B, van der Mei I, Wallin M, Helme A, Angood Napier C, Rijke N, Baneke P. Rising prevalence of multiple sclerosis worldwide: Insights from the Atlas of MS, third edition. *Multiple Sclerosis Journal* 2020;26(14):1816-21.
262. Walz L, Brooks JC, Shavelle RM, Robertson N, Harding KE. Life expectancy in multiple sclerosis by EDSS score. *Mult Scler Relat Disord* 2022;68:104219.
263. Watanabe K, Taskesen E, van Bochoven A, Posthuma D. Functional mapping and annotation of genetic associations with FUMA. *Nat Commun* 2017;8(1):1826.
264. Westerlind H, Ramanujam R, Uvehag D, Kuja-Halkola R, Boman M, Bottai M, Lichtenstein P, Hillert J. Modest familial risks for multiple sclerosis: a registry-based study of the population of Sweden. *Brain* 2014;137(Pt 3):770-8.
265. Wijnands JMA, Kingwell E, Zhu F, Zhao Y, Hogg T, Stadnyk K, Ekuma O, Lu X, Evans C, Fisk JD, Marrie RA, Tremlett H. Health-care use before a first demyelinating event suggestive of a multiple sclerosis prodrome: a matched cohort study. *Lancet Neurol* 2017;16(6):445-51.
266. Williamson D, Selfe J, Gordon T, Lu YJ, Pritchard-Jones K, Murai K, Jones P, Workman P, Shipley J. Role for amplification and expression of glypican-5 in rhabdomyosarcoma. *Cancer Res* 2007;67(1):57-65.
267. Yamada N, Yamaya M, Okinaga S, Nakayama K, Sekizawa K, Shibahara S, Sasaki H. Microsatellite polymorphism in the heme oxygenase-1 gene promoter is associated with susceptibility to emphysema. *Am J Hum Genet* 2000;66(1):187-95.
268. Yang J, Lee SH, Goddard ME, Visscher PM. GCTA: a tool for genome-wide complex trait analysis. *Am J Hum Genet* 2011;88(1):76-82.
269. Yuan L, Zhai L, Qian L, Huang, Ding Y, Xiang H, Liu X, Thompson JW, Liu J, He YH, Chen XQ, Hu J, Kong QP, Tan M, Wang XF. Switching off IMMP2L signaling drives senescence via simultaneous metabolic alteration and blockage of cell death. *Cell Res* 2018;28(6):625-43.
270. Zarzuelo-Romero MJ, Perez-Ramirez C, Cura Y, Carrasco-Campos MI, Marangoni-Iglesiás LM, Ramirez-Tortosa MC, Jimenez-Morales A. Influence of Genetic Polymorphisms on

Clinical Outcomes of Glatiramer Acetate in Multiple Sclerosis Patients. *J Pers Med* 2021;11(10).

271.Zhang Z, Guo Z, Zhan Y, Li H, Wu S. Role of histone acetylation in activation of nuclear factor erythroid 2-related factor 2/heme oxygenase 1 pathway by manganese chloride. *Toxicol Appl Pharmacol* 2017;336:94-100.

272.Zhou Y, Graves JS, Simpson S, Jr., Charlesworth JC, Mei IV, Waubant E, Barcellos LF, Belman A, Krupp L, Lucas R, Ponsonby AL, Taylor BV, Ausimmmune/AusLong investigators g. Genetic variation in the gene LRP2 increases relapse risk in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2017;88(10):864-8.

10. Seznam publikací

Souhrnný IF = 33,56

10.1 Seznam publikací *in extenso*, které jsou podkladem disertační práce

1. **Zborníková P**, Králík L, Lelková P, Kalinčík T, Havrdová E, Martásek P. (2012) Microsatellite polymorphism in haem oxygenase 1 gene promoter in multiple sclerosis. *Folia Biol (Praha)*. 58(2):69-74. PMID: 22578957. IF₂₀₂₁ = 1,167
2. Jokubaitis V. G., Campagna M. P., Ibrahim O., Stankovich J., **Kleinova P.**, Matesanz F., Hui D., Eichau S., Slee M., Lechner-Scott J., Lea R., Kilpatrick T. J., Kalincik T., De Jager P. L., Beecham A., McCauley J. L., Taylor B. V., Vucic S., Laverick L., Vodehnalova K., García-Sánchez M.-I., Alcina A., van der Walt A., Kubala Havrdova E., Izquierdo G., Patsopoulos N., Horakova D., Butzkueven H. (2022) Not all roads lead to the immune system: the genetic basis of multiple sclerosis severity, *Brain*, awac449, <https://doi.org/10.1093/brain/awac449>. IF₂₀₂₁ = 15,255

10.2 Seznam publikací *in extenso*, které nejsou podkladem disertační práce

1. Nytrová P., **Kleinová P.**, Preiningerová Lízrová J., Král V., Hindoš M., Vaněčková M., Havrdová E., Horáková D. "Neuromyelitis optica a poruchy jejího širšího spektra – retrospektivní analýza klinických a paraklinických nálezů". *Ceská a Slovenská Neurologie a Neurochirurgie* 2015; 78/111(1): 72-77. IF₂₀₂₁ = 0,411
2. Kuhle, J., Disanto G., Dobson R., Adiutori R., Bianchi L., Topping J., Bestwick J. P., Meier U. C., Marta M., Dalla Costa G., Runia T., Evdoshenko E., Lazareva N., Thouvenot E., Iaffaldano P., Drenzo V., Khademi M., Piehl F., Comabella M., Sombekke M., Killestein J., Hegen H., Rauch S., D'Alfonso S., Alvarez-Cermeno J. C., **Kleinova P.**, Horakova D., Roesler R., Lauda F., Llufríu S., Avsar T., Uygunoglu U., Altintas A., Saip S., Menge T., Rajda C., Bergamaschi R., Moll N., Khalil M., Marignier R., Dujmovic I., Larsson H., Malmestrom C., Scarpini E., Fenoglio C., Wergeland S., Laroni A., Annibali V., Romano S., Martinez A. D., Carra A., Salvetti M., Uccelli A., Torkildsen O., Myhr K. M., Galimberti D., Rejdak K., Lycke J., Frederiksen J. L., Drulovic J., Confavreux C., Brassat D., Enzinger C., Fuchs S., Bosca I., Pelletier J., Picard C., Colombo E., Franciotta D., Derfuss T., Lindberg R., Yaldizli O., Vecsei L., Kieseier B. C., Hartung H. P., Villoslada P., Siva A., Saiz A., Tumani H., Havrdova E., Villar L. M., Leone M., Barizzone N., Deisenhammer F., Teunissen C., Montalban X., Tintore M., Olsson

- T., Trojano M., Lehmann S., Castelnovo G., Lapin S., Hintzen R., Kappos L., Furlan R., Martinelli V., Comi G., Ramagopalan S. V. , Giovannoni G. Conversion from clinically isolated syndrome to multiple sclerosis: A large multicentre study. *Multiple Sclerosis Journal* 2015, **21**(8): 1013-1024. IF₂₀₂₁ = 5,855
3. Preiningerova, J. L., Jiraskova Zakostelska Z., Srinivasan A., Ticha V., Kovarova I., **Kleinova P.**, Tlaskalova-Hogenova H. a Kubala Havrdova E. Multiple Sclerosis and Microbiome. *Biomolecules* 2022, **12**(3). IF₂₀₂₁ = 6,064
4. Stastna, D., Menkyova I., Drahota J., Hrnčiarova T., Kubala Havrdova E., Vachova M., Anđelova M., **Kleinova P.**, Kovarova I., Krasulova E., Preiningerova J. L., Novakova I., Novotna K., Novotna M., Nytrova P., Pavlickova J., Srpova B., Storey K., Ticha V., Tyblova M., Uher T., Vodehnalova K., Horakova D. To be or not to be vaccinated: The risk of MS or NMOSD relapse after COVID-19 vaccination and infection. *Multiple Sclerosis and Related Disorders Journal* 2022, **65**: 104014. IF₂₀₂₁ = 4,808

10.3 Seznam publikací v recenzovaných neimpaktovaných periodikách *in extenso*, které nejsou podkladem disertační práce

1. **Zborníková P.**, Krasulová E., Bušek P., Nytrová P., Peterová V., Špačková N., Havrdová E. Autoimunitní limbická encefalitida asociovaná s LGI1 protilátkami. *Neurologie pro praxi*. 2012, **13**(6), 343-346.

10.4 Další publikace - části knih

1. **Kleinová P.**, Martásek P. Genetika roztroušené sklerózy. In Havrdová E. *Roztroušená skleróza*. Praha: Mladá fronta, 2013, s. 85-99. ISBN: 978-80-204-3154-7
2. **Kleinová P.** Epileptický status po léčbě ataky: Jde opravdu o ataku RS?. In: Horáková D. *Autoimunita nervového systému v kazuistikách*. Praha: Mladá fronta, 2017, s. 47-54. ISBN 978-80-204-4572-8.