

Korelace exprese MxA mRNA s hladinami neutralizačních protilátek proti INF β u pacientů s roztroušenou sklerózou

MUDr. Václav Maťoška¹, MUDr. Jana Libertínová², Mgr. Tereza Kumstýřová¹, Mgr. Miroslav Zajac³, MUDr. Eva Meluzínová², Mgr. Zuzana Lacinová¹, MUDr. Aleš Tomek², MUDr. Luděk Táborský¹

¹OKBHI, Nemocnice Na Homolce, Praha

²Neurologická klinika 2. LF a FN Motol, Praha

³Ústav lékařské mikrobiologie 2. LF a FN Motol, Praha

Myxovirus resistance protein A patří mezi dynaminy, které mají roli v procesu antivirové rezistence a je výhradně indukovan interferonem, tedy rovněž aplikací preparáty interferonu β (INF β) v rámci léčby relaps-remitující roztroušené sklerózy (RR-RS). Během terapie INF β se v 10–30 % případů objevují neutralizační protilátky vůči INF β (NABs), jejichž výskyt je asociován s poklesem efektivity léčby. Cílem naší studie bylo prokázání korelace hladin exprese genu MxA a NABs na souboru pacientů a stanovení cutoff hodnoty pro negativní hladiny MxA. Studie byla provedena na kohortě pacientů s RR RS: negativní kontroly – 105; NABs pozitivní – 16; NABs negativní – 43. Naše studie prokázala, v souladu s dalšími studiemi, vysokou shodu výskytu NABs a depleci exprese MxA. Cutoff hodnota exprese MxA byla stanovena jako 95 percentil hodnot negativních kontrol: MxA/GAPDH = 160.

Klíčová slova: MxA, roztroušená skleróza, interferon, NABs.

Correlation of MxA mRNA expression with NABs levels in patients with multiple sclerosis

Myxovirus resistance protein A (MxA) belongs to dynamin superfamily. MxA is a component of antiviral response and is solely induced by interferons, thus by in vivo application of interferon β (INF β) as well. In patients with multiple sclerosis (MS), neutralizing antibodies (NABs) appearing during INF β treatment in 10–30 % of cases, decrease its bioactivity and therapeutic efficacy. The aim of this study was to show the correlation of MxA and Nabs levels on the cohort with relaps-remitting form of MS (RR-MS) and to set up the cutoff value for the baseline levels of MxA in population. The cohort sustained of 16 NABs positive, 43 NABs negative patients and 105 negative controls. This study demonstrates high correlation in high NABs levels and depletion of MxA expression. The cutoff MxA/GAPDH (baseline) value was assigned as a 95 percentile of values of negative controls: MxA/GAPDH = 160.

Key words: MxA, multiple sclerosis, interferon, NABs.

Seznam zkratk:

INF β – interferon B

RR-RS – relaps-remitující roztroušená skleróza

mRNA – messenger RNA (informační nebo mediátorová RNA)

MxA – myxovirus resistance protein A

NABs – neutralizační protilátky

Úvod

Imunomodulační léčba INF β je pacientům s RR RS aplikovaná/podávaná již od roku 1993 (INF β Multiple Sclerosis Study Group). Studie jako PRISMS (The preventiv of relapses and disability by interferon β -1a subcutaneously in multiple sclerosis) prokázaly při této léčbě signifikantní snížení počtu relapsů i aktivity lézí na MR (Hesse a kol., 2009). Data z prodloužené studie prokázala přetrvávající benefit léčby INF β trvající přes 4 roky (PRISMS, 1998; PRISMS, 2001). V těchto studiích se rovněž potvrdil vývoj neutralizačních protilátek (NABs) proti INF β -1a (Rebif) u 24 % pacientů (dávka 22 μ g). NABs se dnes

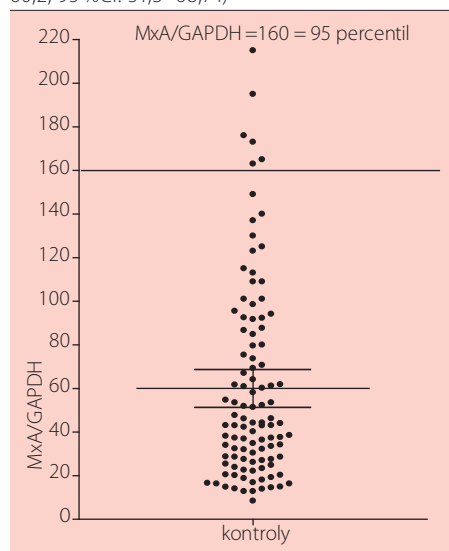
v praxi rutinně prokazují nepřímou metodou cytopatického efektu, kde se hodnotí inhibice lýzy A549 buněk virem encefalomyocarditidy. Byť je tento test brán jako jeden ze zlatých standardů hodnocení léčby, není co do hodnocení „in vivo“ efektu INF β optimální, neboť neposkytuje dostatečně reálný obraz efektu INF β . Pro přesnější hodnocení biologického efektu INF β u RS byly proto nedávno zavedeny další markery: měření MxA (Myxovirus resistance protein A) proteinu, nebo měření exprese genu MxA kvantifikací mRNA. MxA protein patří do skupiny dynaminů, které mají roli v procesu antivirové rezistence a je výhradně indukovan interferonem, tedy rovněž aplikací preparáty interferonu β (INF β) v rámci léčby relaps-remitující roztroušené sklerózy (RR-RS). Chybějící exprese MxA proteinu a výskyt NABs byly popsány v řadě publikací (Pachner a kol., 2006; Pachner a kol., 2003). Indukce MxA proteinu, nebo exprese MxA mRNA, odráží navázání interferonu na lymfocytární receptor, aktivaci intracelulární signální trans-

dukce a v prvním případě produkci proteinu, jakožto biologickou odpověď na aplikaci INF β (1–11). Naše studie měla za úkol verifikovat již publikovaná data korelace NABs/MxA mRNA na souboru českých RR RS pacientů a pro zavedení tohoto markeru do diagnostické praxe určit cutoff hodnotu pro populační rozmezí exprese MxA mRNA.

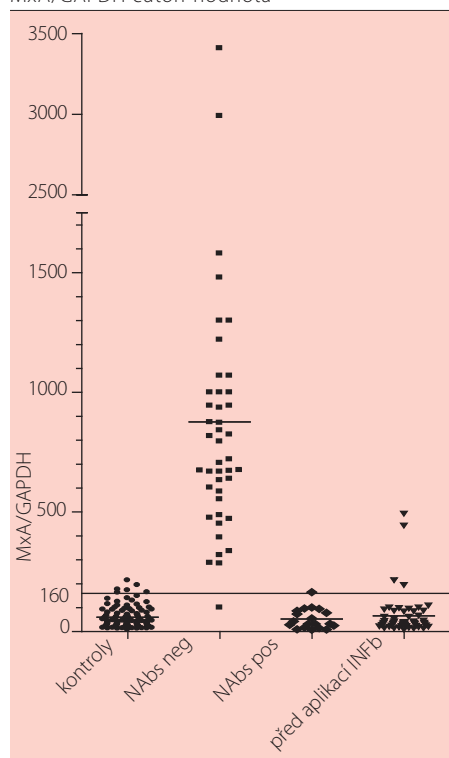
Metody

Soubor: do studie bylo zahrnuto 171 pacientů (126 žen a 45 mužů, průměrný věk 37 let) Pro účely stanovení horní hraniční hodnoty RS populačního rozptylu (rozmezí populačních hodnot) MxA mRNA bylo použito 106 náběhů od pacientů s RR RS bez léčby interferonem nebo před první aplikací interferonu. 59 pacientů podstupovalo léčbu interferonovým preparátem déle než 12 měsíců (Avonex, Betaferon, Rebif), z nichž byla u 16 pacientů prokázána pozitivita NABs (NABs+). U 4 pacientů NABs+ byly hodnoty jednoznačně

Obrázek 1. Stanovení cutoff hodnoty MxA/GAPDH. Hodnota byla stanovena jako 95 percentil MxA/GAPDH hodnot u 105 kontrolních vzorků (průměr: 60,2; 95 %CI: 51,3–68,74)



Obrázek 2. Porovnání indukce MxA mRNA exprese u kontrolní skupiny (105 vzorků), NABs negativních vzorků (43), NABs pozitivních (> 100) (4 pacienti – opakovaná vyšetření po 3 měsících) a vzorcích před aplikací interferonu (54). Na grafu je vyznačena MxA/GAPDH cutoff hodnota



pozitivní (> 100). U 43 pacientů nebyly detekované NABs. Náběry byly prováděny před aplikací a 10–14 hodin po aplikaci s ohledem na maximální expresi MxA mRNA po podání interferonu (Gilli a kol., 2006).

Kvantitativní PCR analýza MxA mRNA:

izolace mRNA z EDTA náběrů plné krve byla provedena komerčním kitem (QIAamp RNA blood mini kit). Vzorky pacientů byly zpraco-

vány do 2 hodin po náběru. Koncentrace RNA byly měřeny na přístroji Qubit2 (Invitrogen). RT-qPCR bylo provedeno na přístroji RotorGene 3000A (CorbettResearch) pomocí kitu Express One-Step SYBR GreenER Universal (Invitrogen), podle protokolu výrobce. PCR primery pro MxA a housekeeping gen GAPDH (glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza) byly publikované (Bertolotto et al., 2001). Genová exprese MxA byla vyjádřena poměrem komparativních koncentrací MxA/GAPDH (Comparative quantitation; Corbett research) vyšetřovaných vzorků.

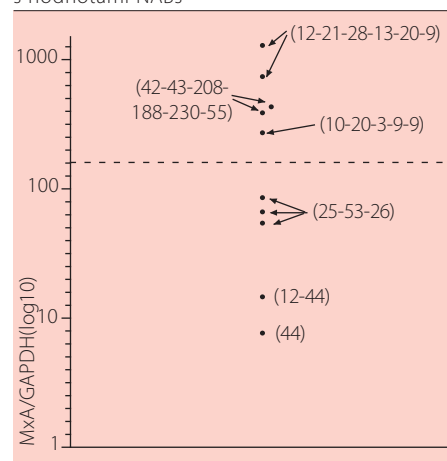
NABs: stanovení NABs bylo provedeno metodou cytopatického efektu, založené na blokádě interferonové aktivity neutralizačními protilátkami obsaženými v séru pacienta (Pungor a kol., 1998). Interpretace výsledků byla provedena Kawadeho výpočtem neutralizačního titru NABs. Výsledky > 20 jsou průkazem positivity výskytu NABs, hodnoty > 100 znamenají jednoznačnou ztrátu biologického efektu interferonu.

Statistika: statistická analýza byla provedena pomocí statistického programu GraphPad Prism4. Pro určení statistických hodnot (průměry ± SD, mediány, minimální a maximální hodnoty) byly použity neparametrické statistické testy. Pro zkoumání rozložení hodnot byl použit D'Agostino&Pearson omnibus normality test. Pro porovnání hodnot exprese MxA u jednotlivých skupin pacientů jsme použili Mann-Whitney U-test.

Výsledky

Z poměru MxA/GAPDH (dále jenom MxA/GAPDH) získaných od negativních (INFβ neléčených) pacientů jsme určili horní hranici RS populačního rozptylu jako 95 percentil z těchto hodnot (Excel, Microsoft Office). Ze 106 hodnot jsme zahrnuli do výpočtu 105. Jedna hodnota (MxA/GAPDH = 443) byla posouzena jako odlehlá („outlier“) (Gilli a kol., 2005). Hodnota horní hranice (cutoff) MxA/GAPDH byla pro aplikovanou metodiku rovna: MxA/GAPDH = 160,2 (obrázek 1). U 50 pacientů z 54 nabíraných před aplikací INFβ byl hodnota MxA/GAPDH negativní = pod cutoff hodnotou. U pacientů s vysokou pozitivitou NABs (> 100) byly všechny hodnoty MxA/GAPDH po aplikaci INFβ (MxA/GAPDH (P)) rovněž negativní. U pacientů se slabou pozitivitou NABs (20 < > 100) a u pacientů s hodnotami NABs oscilujícími kolem, nebo nižšími než 20 byly hodnoty MxA/GAPDH (P) individuální (obrázek 2, 3). U pacientů bez detekovaných NABs bylo 42 ze 43 hodnot MxA/GAPDH (P) vyšších než cutoff hodnota.

Obrázek 3. Příklady hodnoty MxA/GAPDH u pacientů s historií slabě pozitivních NABs nebo oscilujících kolem hodnoty 20 (hodnoty uvedené v závorkách). Je patrná individuální exprese MxA u jednotlivých pacientů bez jednoznačné korelace s hodnotami NABs



Diskuze

Data z našeho souboru potvrzují závěry z jiných studií a to, že měření MxA mRNA z plné krve nabízí praktickou možnost sledování biologické odpovědi na aplikaci interferonu u RS pacientů. Touto metodou lze spolehlivě prokázat jak NABs pozitivitu tak primární neodpovídavost na INFβ (Gilli a kol., 2005). Náběry pacientů po aplikaci INFβ lze provádět v rozpětí mezi 10–24 hodinami (Gilli a kol., 2005). Toto rozpětí dává pohodlnou možnost monitorovat efektivitu léčby v běžné klinické praxi. Pro klinické využití jsme v naší studii stanovili horní hranici RS populační exprese MxA mRNA jako 95 percentil ze 105 získaných hodnot z náběrů pacientů neléčených INFβ: MxA/GAPDH = 160. Naše studie prokázala v souladu s dalšími, že u jednoznačné positivity NABs je exprese MxA mRNA utlumena a blízká normální populační expresi (median hodnot poměrů MxA/GAPDH u kontrol = 44; u NABs + pacientů MxA/GAPDH (P) = 55; p = 0,6043), (Bertolotto a kol., 2001; Deisenhammer a kol., 2000; Hesse a kol., 2009; Gilli a kol., 2006; Gilli a kol., 2005; Gilli a kol., 2004; Kracke a kol., 2000; Pachner a kol., 2005; Pachner a kol., 2006; Pachner a kol., 2003; PRISMS, 1998; PRISMS, 2001; Pungor a kol., 1998). U NABs negativních pacientů naopak je exprese výrazně znásobena (median hodnot poměrů MxA/GAPDH (P) u NABs negativních pacientů po aplikaci INFβ = 720; p < 0,0001). Objektem dalšího zkoumání zůstává možnost predikce efektivitu léčby a výběru farmaka pro případy, kde hodnoty NABs jsou nízké, oscilující, nebo opětovně negativní. V těchto případech vyvstává možnost orientace léčby podle exprese MxA mRNA. Z pilotních výsledků lze usuzovat, že míra exprese MxA mRNA bude záviset jednak na

momentální hladině výskytu NAbs, ale zřejmě i na imunitní konstituci pacienta a neutralizační kapacitě protilátek. Ilustrativním příkladem je pacient s pozitivní historií hladin NAbs (42–43–208–188–230–55) a opakovanou dostatečnou expresí MxA mRNA (MxA/GAPDH (P): 428; 382). Také je potřeba brát v úvahu zvýšené hodnoty exprese MxA v případech virových infekcí, jako možný zdroj falešné positivity. Pro určitou standardizaci v těchto mezních případech je nutné další sledování na větším počtu pacientů. Na základě výsledků naší studie lze měření exprese MxA mRNA u RS pacientů považovat za efektivní přímé měření efektivity léčby INFβ.

Literatura

1. Bertolotto A, Gilli F, Sala A, Audano L, Castello A, Magliola U, Melis F, Giordana MT. Evaluation of bioavailability of three types of IFNβ in multiple sclerosis patients by a new quantitative-competitive-PCR method for MxA quantification. *J. Immunol. Methods* 256 1–2 2001: 141–152.
2. Hesse D, Sellebjerg F, Soelberg Sorensen P. Absence of MxA induction by interferon² in patients with MS reflects complete loss of bioactivity *Neurology* 2009; 73: 372–377
3. Deisenhammer F, Mayringer I, Harvey J, Dilitz E, Gasse T, Stadlbauer D, Reindl M, Berger T. A comparative study of the relative bioavailability of different interferon beta preparations. *Neurology*. 2000; 54: 2055–2060.
4. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Capobianco M, Bertolotto A. Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. *Mult Scler* 2006; 12: 47–57.
5. Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Di Sapio A, Capobianco M, Bertolotto A. Biological responsiveness to first injection of interferon -beta in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 158: 195–203.
6. Gilli F, Marnetto F, Stefanuto G, Rinaldi V, Farinazzo F, Malucchi S, Capobianco M, Caldano M, Sala A, Bertolotto A. Comparison of three PCR assays for the evaluation of interferon-beta biological activity in patients with multiple sclerosis. *Mol Diagn* 2004; 8: 185–194.
7. INF beta Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis: clinical results of a multi-center, randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43: 655–661.
8. Kracke A, von Wussow P, Al-Masri AN, Dalley G, Windhagen A, Heidenreich F. Mx proteins in blood leukocytes for monitoring interferon beta-1b therapy in patients with MS. *Neurology*. 2000; 54: 193–199.
9. Pachner AR, Dail D, Pak E, Narayan K. The importance of measuring IFNβ bioactivity: monitoring in MS patients and the effect of anti-IFNβ antibodies. *J Neuroimmunol* 2005; 166: 180–188.
10. Pachner AR, Narayan K, Pak E. Multiplex analysis of expression of three IFNbeta-induced genes in antibody-positive MS patients. *Neurology* 2006; 66: 444–446.
11. Pachner AR, Narayan K, Price N, Hurd M, Dail D. MxA gene

expression analysis as an interferon-β bioactivity measurement in patients with multiple sclerosis and the identification of antibody-mediated decreased bioactivity. *Mol Diagn* 2003; 7: 17–25.

12. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon β-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebocontrolled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352: 1498–1504.

13. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon β-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group and University of British Columbia MS/MRI Analysis Group. PRISMS-4: long-term efficacy of interferon-beta-1a in relapsing MS. *Neurology*. 2001; 56: 1628–1636.

14. Pungor E, Files JG, Gabe JD, Do LT, Foley WP, Gray JL, Nelson JW, Nestaas E, Taylor JL, Grossberg SE. A novel bioassay for the determination of neutralizing antibodies to IFNβ1b. *J Interferon Cytokine Res* 1998; 18: 1025–1030.

Článek doručen redakci: 11. 7. 2011

Článek přijat k publikaci: 6. 9. 2011

MUDr. Václav Maťoška
OKBHI, Nemocnice Na Homolce
Roentgenova 2, 150 00 Praha
vaclav.matoska@gmail.com

