

**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**Lékařská fakulta**  
**Neurologická klinika, Fakultní nemocnice Brno**

## **HABILITAČNÍ PRÁCE**

**Úloha genetické predispozice  
a vybraných biomarkerů v imunopatogenezi  
roztroušené sklerózy**

**MUDr. Yvonne Benešová, Ph.D.**



**Brno 2018**

Práce byla vypracována na Neurologické klinice Lékařské fakulty Masarykovy univerzity Brno a Fakultní nemocnice Brno.

Prohlašuji, že jsem habilitační práci vypracovala samostatně s využitím zdrojů uvedených v soupisu literatury.

MUDr. Yvonne Benešová, Ph.D.  
Neurologická klinika LF MU a FN Brno

.....  
podpis autora

# Obsah

Prohlášení autora

Poděkování

<b>I Přehled problematiky .....</b>	<b>6</b>
<b>1 Úvod .....</b>	<b>6</b>
<b>2 Definice roztroušené sklerózy .....</b>	<b>8</b>
<b>3 Epidemiologie roztroušené sklerózy .....</b>	<b>9</b>
<b>3.1 Geografický gradient .....</b>	<b>9</b>
<b>3.2 Vliv etnika na riziko rozvoje roztroušené sklerózy .....</b>	<b>10</b>
<b>3.3 Vliv pohlaví na riziko rozvoje roztroušené sklerózy .....</b>	<b>11</b>
<b>3.4 Vliv migrace na riziko rozvoje roztroušené sklerózy .....</b>	<b>12</b>
<b>4 Etiopatogeneze roztroušené sklerózy .....</b>	<b>14</b>
<b>4.1 Environmentální faktory .....</b>	<b>14</b>
4.1.1 Virové infekce .....	14
4.1.2 Sluneční záření a nedostatek vitamínu D3 .....	18
4.1.3 Stres .....	25
4.1.4 Vliv výživy, sociální a kulturní faktory.....	26
<b>4.2 Genetické faktory .....</b>	<b>28</b>
4.2.1 Hlavní histokompatibilní komplex (MHC) .....	30
4.2.2 Asociace HLA s roztroušenou sklerózou .....	35
4.2.3 Molekulární mimikry u roztroušené sklerózy .....	38
4.2.4 Terapie založená na ovlivnění HLA .....	39
4.2.5 Souhrn .....	39
4.2.6 Funkční studie a epigenetické faktory u roztroušené sklerózy.....	39
<b>4.3 Závěr .....</b>	<b>42</b>
<b>5 Patofyziologie roztroušené sklerózy .....</b>	<b>43</b>
<b>6 Matrix metalloproteinázy .....</b>	<b>46</b>
<b>6.1 Definice .....</b>	<b>46</b>
<b>6.2 Rozdělení MMPs .....</b>	<b>46</b>
6.2.1 Matrix metalloproteináza - 9 a matrix metalloproteináza-2 .....	46
<b>6.3 Struktura genů pro MMPs .....</b>	<b>48</b>

<b>6.4 MMPs u roztroušené sklerózy .....</b>	<b>49</b>
<b>7 Klinická manifestace roztroušené sklerózy .....</b>	<b>51</b>
<b>8 Diagnostická kritéria roztroušené sklerózy .....</b>	<b>55</b>
<b>II Výzkumné práce.....</b>	<b>57</b>
<b>1 Cíle projektů .....</b>	<b>57</b>
<b>1.1 Genetická studie .....</b>	<b>57</b>
<b>1.2 Studie hladin enzymů .....</b>	<b>57</b>
<b>1.3 Hypotéza.....</b>	<b>58</b>
<b>2 Materiál a metodika .....</b>	<b>61</b>
<b>2.1 Genetická studie .....</b>	<b>61</b>
2.1.1 Soubor .....	61
2.1.2 Genetická analýza .....	61
<b>2.2 Studie hladin enzymů .....</b>	<b>65</b>
2.2.1 Soubor .....	65
2.2.2 Stanovení hladin enzymů .....	65
<b>3 Komentovaný soubor vlastních prací.....</b>	<b>66</b>
<b>4 Závěry .....</b>	<b>109</b>
<b>4.1 Genetické studie .....</b>	<b>109</b>
<b>4.2 Studie hladin metalloproteináz a jejich inhibitorů .....</b>	<b>110</b>
<b>5 Diskuse.....</b>	<b>110</b>
<b>6 Souhrn .....</b>	<b>117</b>
<b>7 Seznam použitých zkratk.....</b>	<b>118</b>
<b>8 Seznam použité literatury.....</b>	<b>121</b>



## Poděkování

Chtěla bych tímto poděkovat paní prof. MUDr. Anně Vašků, CSc., za možnost realizace projektu na Ústavu patologické fyziologie LF MU, odborné konzultace, cenné rady a pomoc při hodnocení získaných výsledků. Děkuji také přednostovi Neurologické kliniky FN Brno, prof. MUDr. Josefu Bednaříkovi, CSc., který mi umožnil habilitační práci vypracovat a za jeho podporu vzdělávání a vědecké činnosti na našem pracovišti. Dále bych chtěla bych tímto poděkovat prof. MUDr. Zdeňku Kadaňkovi, CSc., který byl mým školitelem v rámci postgraduálního studia a prof. MUDr. Jiřímu Litzmanovi, CSc. za cenné rady v průběhu postgraduálního studia.

Rovněž bych chtěla poděkovat všem svým kolegům a spolupracovníkům, kteří se podíleli na realizaci projektů. Laborantkám, zejména paní Svatavě Tschöplové za genotypizaci vzorků na Ústavu patologické fyziologie LF MU, RNDr. Haně Novotné a laborantkám, které prováděly stanovení hladin metalloproteináz na Oddělení klinické hematologie a biochemie FN Brno, doc. MUDr. Pavlu Štouračovi, Ph.D. a MUDr. Magdaléně Hladíkové, Ph.D. za spolupráci. Poděkování patří také sestřám na neurologické ambulanci FN Brno. Dík patří také všem pacientům a zdravým dobrovolníkům, kteří se výzkumu zúčastnili.

V neposlední řadě děkuji také za podporu Interní grantové agentury Ministerstva zdravotnictví IGA MZ ČR č. NR 8832-4/2006: „Matrix metalloproteinázy v imunopatogenezi roztroušené sklerózy.“

# I. Přehled problematiky

## 1 Úvod

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je chronické, zánětlivé, autoimunitní, demyelinizační onemocnění centrálního nervového systému (CNS). Odhaduje se, že postihuje více než 2.5 milionu lidí na světě, navíc jeho incidence a prevalence v posledních letech stále narůstá. (Hartung et al., 2004; Marie RA, 2013; <http://www.atlasofms.org>). Patří mezi nejčastější neurologická onemocnění, které vede k závažnému postižení mladých lidí ve věku od dvaceti do čtyřiceti let. Tato nemoc může významně zhoršit kvalitu života nemocných (Berrigan et al., 2016; Giordano et al., 2012; Hadgkiss et al., 2013; Lobentanz et al., 2004) a má významný socioekonomický dopad (Cadden et al., 2015).

Etiopatogeneze RS není dosud zcela uspokojivě objasněna, předpokládá se vliv genetických, enviromentálních a epigenetických faktorů (Hartung et al., 2004; Brutting et al., 2016). Genetická predispozice k rozvoji choroby je podložena mnoha genetickými a epidemiologickými studii (Bashinskaya et al., 2015; Hafler et al., 2007; Sawcer et al., 2015). Nejvyšší vnímavost k rozvoji onemocnění byla zjištěna u severoevropanů, zejména skandinávské populace (Compston et al., 1997; Oksenberg et al., 2013), naopak orientální rasa má až desetkrát nižší vnímavost k rozvoji choroby ve srovnání s rasou indoevropskou (Christiano et al., 2013; Langer-Gould et al., 2013; Langer-Gould et al., 2014; Makhani et al., 2014). Také familiární výskyt nemoci vliv dědičnosti potvrzuje. Bylo prokázáno zvýšené riziko postižení u příbuzných nemocného, zejména u jednovaječných dvojčat, u kterých se pohybuje v rozmezí od 24 % do 40 % a 3-5 % u dvouvaječných dvojčat (Cree B, 2008; Willer et al. 2003; Ristori et al., 2006).

Jedná se o komplexní onemocnění s polygenní dědičností, neboť na spuštění autoimunitního procesu se pravděpodobně podílí velké množství vysoce polymorfních genů. Tyto geny se u daného jedince vyskytují ve vazbách a různých kombinacích, což podmiňuje výraznou interindividuální variabilitu choroby (Ebers 1995; Bashinskaya et al., 2015). Velmi důležitou, avšak značně proměnnou komponentou, která zřejmě podmiňuje rozvoj i další průběh vlastního onemocnění, jsou zevní vlivy (Burrell et al., 2011; Correale et al., 2015; Handunnetthi et al., 2010; Steelman AJ, 2015) a faktory epigenetické (Akkad et al., 2015; Wu et al., 2016).

Dosud však nebyly nalezeny dostatečně spolehlivé genetické markery, které by umožnily zjistit míru individuálního rizika rozvoje RS, diagnostické a prediktivní markery dalšího průběhu onemocnění ani odpovědávosti daného jedince na specifickou léčbu. Biomarkery měřitelné v periferní krvi, poskytující informace o patofyziologickém procesu, aktivitě, tíži a prognóze onemocnění.

Slibnými kandidáty jsou geny a jejich varianty, tzv. polymorfismy, které ovlivňují komplexní patogenetický proces. Jedná se o geny pro lidské leukocytární antigeny (HLA), které hrají klíčovou roli ve zpracování antigenů myelinu, jejich prezentaci T-lymfocytům a iniciaci autoimunitního procesu (*Lincoln et al., 2005; Sadovnic 2012; Schmidt et al., 2007*). Dalším velmi významným faktorem, podmiňujícím rozvoj a progresi onemocnění je porušení hemato-encefalické bariéry (HEB), umožňující přestup zánětlivých buněk do CNS. Důležitou úlohu v tomto procesu mají geny pro matrix metalloproteinázy (MMPs) (*Goodin et al., 2002; Mirshafiey et al., 2014; Shimizu et al., 2014; Waubant et al., 2003*). a angiotensinogen (*Wosik et al., 2007*). Na progresi vlastního zánětlivého postižení a aktivaci infiltrujících imunokompetentních buněk se podstatně podílí geny kódující pro zánětlivé cytokiny (*Gregory et al., 2007; Mkjikian et al., 2011; Jäger et al., 2013*). Velmi důležitou roli hraje též variabilita vitamínu D, který je významným environmentálním faktorem. Navozuje silné antiproliferativní, prodiferenční a imunomodulační účinky (*Munger et al., 2006; Munger et al., 2014; Simon et al., 2012*).

**Cílem předkládané práce** je nalézt genetické polymorfismy, které se podílí na zvýšené vnímavosti k RS v české populaci, vyhodnotit jejich vliv na progresi choroby a zjistit případné rozdíly mezi pohlavími, neboť RS jako všechna ostatní autoimunitní onemocnění se častěji vyskytuje u žen. Nalézt vhodné biomarkery jednoduše měřitelné v séru a zhodnotit vztah jejich hladin ke klinickému průběhu, tíži onemocnění a stupni postižení.

Očekáváme, že práce by mohla přispět ke zjištění individuální genetické predispozice k rozvoji, další progresi onemocnění a odpovědávosti na cílenou terapii. Mohli bychom získat laboratorní markery, které by byly použitelné v klinické praxi, umožňující monitorovat průběh onemocnění a sledovat efekt léčby.

Rozšíření současných znalostí imunopatogenetických mechanismů RS může významně napomoci k vývoji nové, specifické, účinné farmakoterapie a zlepšit prognózu tohoto závažného onemocnění.

## 2 Definice roztroušené sklerózy

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je chronické, zánětlivé, autoimunitní, demyelinizační onemocnění centrálního nervového systému (CNS), postihující mozek, míchu a optické nervy. Dochází k poškození a ztrátě myelinu v zánětlivých ložiscích bílé hmoty CNS a současně již od počátku vede k axonální ztrátě (Zoukos, 2004; Hartung et al., 2004). Poprvé byla popsána jako samostatná choroba již v roce 1868 francouzským neurologem Jean-Martin Charcotem (1825–1893). Po shrnutí dřívějších nálezů, vlastních klinických pozorování a patologických studií Charcot nemoc nazval *sclérose en plaques*. Před Charcotem popsal mnoho klinických detailů choroby britský profesor patologie Robert Carswell (1793–1857) a francouzský profesor anatomické patologie Jean Cruveilhier (1791–1873). Typickou známkou RS je opakující se demyelinizace CNS, diseminovaná v prostoru a čase. Rozvíjí se zpravidla mezi 20. - 40. rokem života, zřídka se onemocnění klinicky manifestuje již v dětství nebo po 60. roce věku. Jedná se o onemocnění společensky a zdravotnický velmi závažné, neboť patří mezi nejčastější příčiny chronické invalidity mladých lidí.



**Obr. 1 Jean-Martin Charcot (1825-1893)**

Zdroj: The International MS Journal 2008; 15: 59-61.

### 3 Epidemiologie roztroušené sklerózy

#### 3.1 Geografický gradient

Odhaduje se, že RS postihuje více než 2,5 miliónu lidí na světě, navíc jeho incidence a prevalence v posledních letech stále mírně stoupá (Obr. 2, 3).

Byla provedena řada studií, které prokazují, že prevalence onemocnění se zvyšuje se vzdáleností od rovníku. Proto hovoříme o geografickém gradientu (Obr. 2, 3).

Nejvíce se vyskytuje na severu Spojených států amerických (USA), v Kanadě a severní Evropě, kde činí prevalence až 300/100 tis. obyvatel. Na jihu USA a v jižní Evropě činí okolo 80/100 tis., v Austrálii 90/100 tis. a na Středním východě 4–39/100 tis. obyvatel (Vachová, 2012). Mezi oblasti nízkého rizika s prevalencí do 20/100 tis. obyvatel řadíme Latinskou Ameriku, nejnižší riziko s prevalencí 5/100 tis. pak vidíme v Asii a Africe (Obr. 2, 3). Prevalence v České republice je vysoká, činí přibližně 150/100 tis. obyvatel (Havrdová, 2002). Pravidlo o stoupající prevalenci se zvyšující se zeměpisnou šířkou však neplatí absolutně, neboť prevalence na Sicílii činí 53/100 tis. obyvatel.

Rozložení RS popsal poprvé již v roce 1921 Charles Davenport v USA (Davenport CB, 1921). Zjistil, že se onemocnění více vyskytuje v severních státech, zejména v oblasti Great Lakes. Novější data v souladu s těmito staršími nálezy potvrzují vzrůstající prevalenci RS jiho-severním gradientem v rozmezí od 22/100 tis. do 106/100 tis. obyvatel (Compston A and Confavreux C, 2006). Interpretace těchto nálezů je však problematická vzhledem k vlnám imigrace do USA, neboť musíme vzít v úvahu rasovou distribuci a vliv etnického pozadí na prevalenci RS v určité geografické oblasti.

Naopak v Austrálii je možné zkoumat geneticky relativně homogenní populaci, kterou tvořili až do konce 20. století přistěhovalci z Anglie (Compston A and Confavreux C, 2006). Byly zde také prokázány významné geografické rozdíly s vyšší prevalencí na jihu a v Tasmánii ve srovnání se severní Austrálií. Výsledky však mohou být částečně ovlivněny koncentrací obyvatelstva ve městech. Tato data jsou v souladu s předchozími nálezy, že prevalence RS vzrůstá s narůstající zeměpisnou šířkou, a to na severní i jižní polokouli zrcadlově. Protože je australské obyvatelstvo geneticky homogenní, potvrzují tyto nálezy významný vliv environmentálních faktorů vázaných pravděpodobně na geografickou oblast a klimatické vlivy.

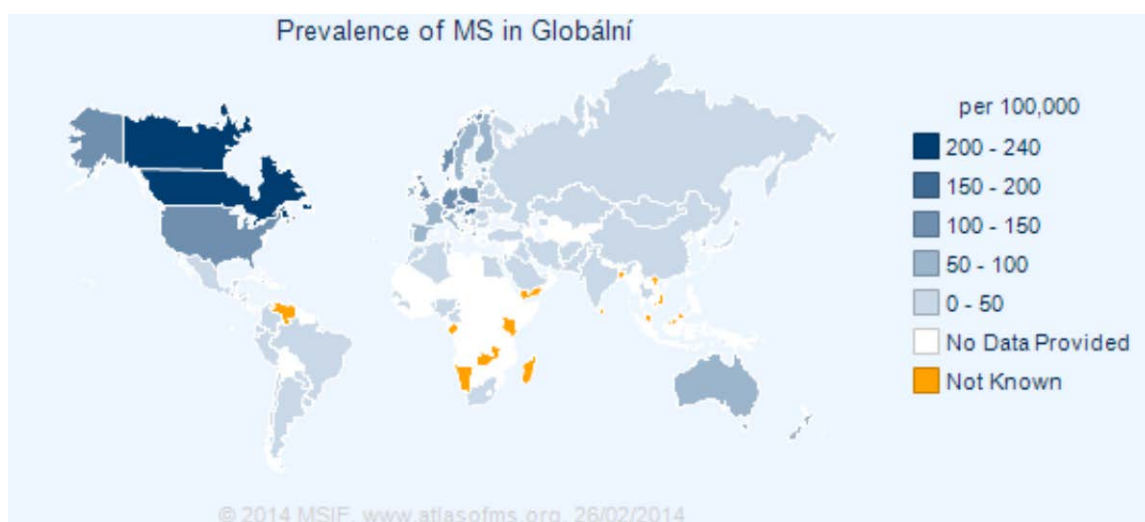
Analogická asociace mezi RS a geografickým gradientem byla prokázána v severní Evropě. V norské studii však k nárůstu prevalence nemoci se vzrůstající zeměpisnou šířkou

nedošlo, což ukazuje na možný vliv protektivního environmentálního faktoru (*Compston A and Confavreux C, 2006*).

Nejnovější a nejlépe doložitelná studie byla zpracována ve Francii. Data byla získaná z databáze národního zdravotního pojištění zemědělců (*Mutualité Sociale Agricole*), která zahrnovala informace čtyř milionů francouzských rolníků a jejich rodin (*Vukusic et al., 2007*). Tato populace je relativně stálá a málo migrující mezi regiony. V roce 2003 bylo do této databáze zařazeno 4 098 477 lidí, z nichž u 2 667 byla diagnostikována RS. Nemoc byla registrována již v době diagnózy. Byla nalezena prevalence 63/100 tis. obyvatel, přičemž v severovýchodní oblasti byla signifikantně vyšší (100/100 tis. obyvatel) ve srovnání s oblastí jihozápadní (50/100 tis.). Vyšší riziko rozvoje RS je tedy asociováno s narůstající zeměpisnou šířkou.

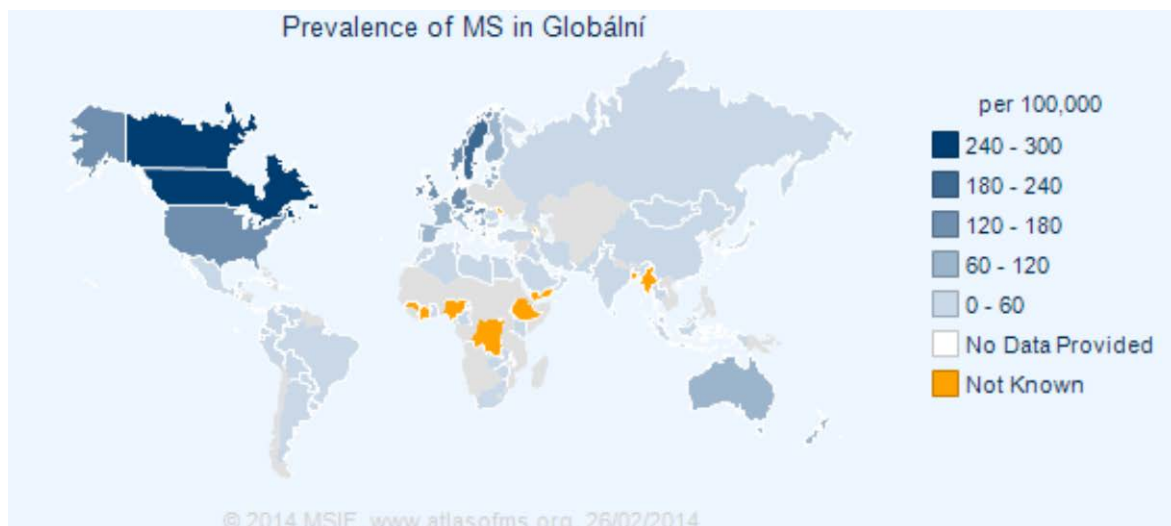
### 3.2 Vliv etnika na riziko rozvoje roztroušené sklerózy

Frekvence výskytu nemoci se liší u jednotlivých etnik, nejvyšší vnímavost má indoevropská rasa, černá rasa poloviční a orientální nejnižší. Z epidemiologických studií je zřejmá vysoká vnímavost k onemocnění zejména u skandinávské populace, zvýšené riziko nalézáme také u dalších severoevropanů. Irské nálezy z Orknejí a Shetlandů potvrzují vyšší prevalenci RS u nordických potomků ve srovnání s keltskými. V USA byla vyšší prevalence RS zjištěna u původních skandinávských přistěhovalců v okolí oblasti Great Lakes.



**Obr. 2 Prevalence RS ve světě v roce 2008.**

Zdroj: World Health Organisation. Multiple sclerosis International Federation [on-line]. Atlas Multiple sclerosis resources in the world 2008. Dostupné z WWW: <<http://www.atlasofms.org/>>.



**Obr. 3 Prevalence RS ve světě v roce 2013.**

Zdroj: World Health Organisation. Multiple sclerosis International Federation [on-line]. Atlas Multiple sclerosis resources in the world 2013. Dostupné z WWW: <<http://www.atlasofms.org/>>.

### 3.3 Vliv pohlaví na riziko rozvoje roztroušené sklerózy

RS postihuje častěji ženy, ve srovnání s muži v rozmezí od 1,5–2,5× a tento nepoměr se v posledních letech dále zvyšuje (Orton *et al.*, 2006). Častější postižení žen je prokázáno také u jiných autoimunitních chorob, např. systémový lupus erythematoses se u žen vyskytuje dokonce až v poměru 9:1.

Faktory, které přispívají ke zvýšené predispozici žen k rozvoji RS a ostatním autoimunitním onemocněním ve srovnání s muži, nejsou jednoznačně objasněny. Vzhledem k tomu, že nejčastěji dochází k rozvoji autoimunitních onemocnění v období časně dospělosti, která souvisí s hormonálními změnami, předpokládá se vliv pohlavních chromozomů a rovněž i vliv hormonální. Pohlavní hormony ovlivňují imunitní systém, HEB a parenchymální buňky CNS, modulují také expresi mnoha genů, včetně genů kódujících cytokiny (Nicot A, 2009). Estrogeny prostřednictvím intranukleárních estrogenních receptorů ovlivňují tzv. E2 senzitivní geny. V experimentální studii autoimunitní encefalomyelitidy (EAE) bylo prokázáno ovlivnění exprese  $TNF\alpha$ , cytotoxického T lymfocytárního antigenu-4,  $TGF\beta$ , IL-18,  $IFN\gamma$ , chemokinů, adhezivních molekul a metalloproteináz estradiolem (Matejuk *et al.*, 2002). Estrogeny zvyšují také expresi genů, které ovlivňují aktivitu T-regulačních buněk (Offner H, 2004).

Je pravděpodobné, že u mužů se na spuštění autoimunitního procesu podílí větší počet účinnějších rizikových genů a mají pravděpodobně vyšší riziko přenosu onemocnění na své potomky. Tento fenomén je známý jako tzv. Carterův efekt (*Kantarci et al., 2006*).

Na základě provedených studií byly zjištěny rozdíly v imunitních reakcích mezi muži a ženami (*Whitacre et al., 1999*). Ženy mají tendenci k Th-1 typu imunitní odpovědi, pouze v těhotenství dochází k posunu ve prospěch Th-2. U mužů převažuje Th-2 typ imunitní odpovědi. Důležitou roli v tomto procesu hrají pravděpodobně pohlavní hormony, které mají pleiotropní efekt (*Ebers, 1998*). Závisí na jejich koncentraci, zejména u estrogenů, konverzi na jiné metabolity a interakcích s vnitřním prostředím na mnoha úrovních. Pohlavní hormony ovlivňují vývoj, proliferaci, apoptózu a aktivaci lymfohematopoetických buněk, produkci cytokinů a protilátek. Vlivem komplexních interakcí mezi pohlavními hormony a imunitním systémem dochází ke zvýšení nebo útlumu autoimunitní patologické reakce (*Nicot A, 2009*).

Do roku 1970 byla prevalence onemocnění u žen zhruba dvojnásobná ve srovnání s muži, avšak v posledních desetiletích dochází k dalšímu posunu tohoto nepoměru. Data kanadské studie čerpané z databáze Canadian Collaborative Project on Genetic Susceptibility to Multiple Sclerosis (CCPGSM) prokazují, že v současné době v souboru 27 074 kanadských pacientů vzrostl nepoměr žen ve srovnání s muži až na 3.2:1 (*Willer et al., 2003*). Příčina dosud zjištěna nebyla, avšak je pravděpodobné, že se na tomto posunu podílí spíše zevní faktory než genetická predispozice. Uvažuje se o možném vlivu hormonální antikoncepce, kouření (*Orton et al., 2006*) či mikrochimérismu. Tento jev je podmíněn přenosem cizích buněk z těla plodu do mateřského organismu v průběhu těhotenství a naopak. K výměně buněk v děloze dochází také mezi dvojčaty. Tato asociace s RS byla pozorována u monozygotních i dizygotních dvojčat ženského pohlaví. (*Willer et al., 2006*).

### **3.4 Vliv migrace na riziko rozvoje roztroušené sklerózy**

Byla provedena také řada klinických studií zaměřených na ovlivnění vnímavosti k RS migrací mezi různými geografickými oblastmi. Poprvé se touto otázkou ve 40. letech devatenáctého století zabýval Geofferey Dean a jeho spolupracovníci, kteří studovali vliv migrace z oblasti s vyšším rizikem onemocnění do regionu s nižším rizikem v Jižní Africe (*Dean G, 1967*). Prevalence v této oblasti je extrémně nízká, činila méně než 5/100 tis. ve smíšené populaci. V anglicky mluvící bělošské populaci přistěhovalců činila 15/100 tis. ve skupině nemocných, kteří imigrovali v dětství a 60/100 tis. u těch, kteří se přistěhovali do



Jižní Afriky v dospělosti. Tyto výsledky ukázaly, že prevalence závisí nejen na etniku, ale také na věku imigrace do Jižní Afriky. Také studie na Martiniku a Guadeloupe tento vliv migrace potvrzují (Cabre *et al.*, 2005). Prevalence onemocnění je v této oblasti velmi nízká, činí asi 20/100 tis. u původních obyvatel. V populaci přistěhovalců do Francie se prevalence zvýšila na 40/100 tis. a u imigrantů, kteří se přistěhovali před 15 rokem věku činí dokonce až 140/100 tis. Také ostatní studie dospěly k obdobným závěrům a prokazují vliv migrace v geneticky rozdílných populacích.

Ačkoli je prevalence RS velmi variabilní, byly nalezeny také tzv. klastry nemocných ve velmi ohraničené geografické oblasti. Nejznámějším příkladem je výskyt onemocnění na Faerských ostrovech, které se nachází mezi Norskem a Islandem v severním Atlantickém oceánu. Vzhledem k jejich umístění na severu lze předpokládat vysokou prevalenci RS, avšak do roku 1943 zde nebyl popsán žádný případ onemocnění. V roce 1943 studoval tuto oblast Kurtzke a popsal několik vln epidemií, jež začaly v roce 1943 (Kurtzke *et al.*, 2001). Jejich příčina není objasněna, předpokládá se, že by mohly být způsobeny infekcí přenesenou britskými vojáky, kteří ostrovy v průběhu II. světové války okupovali. Nabízí se však řada otázek, jež věrohodnost těchto údajů zpochybňují. Není jasné, jestli se RS skutečně v této oblasti před rokem 1943 nevyskytovala, neboť v oblasti nebyli přítomni dánští neurologové. Také spekulace, že ostrovy byly izolovány od okolí, není opodstatněná. Obyvatelé Faerských ostrovů se živilí hlavně rybolovem a byli v kontaktu s ostatními komunitami v oblasti Severního atlantického oceánu. Další klastry RS sice popsány byly, ale jejich věrohodnost není potvrzena.

## 4 Etiopatogeneze roztroušené sklerózy

Etiopatogeneze RS není dosud zcela uspokojivě objasněna. Předpokládá se, že u geneticky predisponovaného jedince je onemocnění spuštěno vlivem vnějších faktorů, důležitou roli hrají efekty epigenetické a stochastické (Akkad *et al.*, 2015; Ebers, 1995; Ebers, 2007; Sadovnic *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2016).

### 4.1 Environmentální faktory

Prevalenci RS mohou ovlivnit výše uvedené migrační faktory, geografická distribuce a environmentální faktory, které se uplatňují pravděpodobně zejména v průběhu dětství nebo časně adolescence. Mezi nejvýznamnější zevní faktory řadíme:

- Virové infekce.
- Sluneční záření a nedostatek vitamínu D3.
- Stres.
- Sociální a kulturní faktory.

#### 4.1.1 Virové infekce

Za nejdůležitější jsou považovány virové infekce, které často předcházejí rozvoji nebo další atace nemoci. Hypotéza, že infekční agens spustí onemocnění u disponovaných jedinců, je jednou z nejstarších teorií, kterou popsala již v roce 1884 Pierre Marie. Opírá se o imunopatologické nálezy z mozku, krve a mozkomíšního moku, které jsou pro RS proces charakteristické. Nálezy zvýšených titrů protivirových protilátek prokazují, že infekční agens může onemocnění navodit. Zásadní slabinou této teorie je však skutečnost, že dosud nebylo nalezeno žádné příčinné infekční agens v CNS nemocných. Infekce může tedy spustit onemocnění, ale při vzniku prvních symptomů již není v CNS přítomna. Je také možné, že infekční agens dosud nebylo nalezeno, nebo že se na spuštění RS u vnímavých jedinců může podílet více infekcí současně. Vzájemnou interakcí dvou či více faktorů mohou být navozeny patofyziologické procesy, které následně vedou k rozvoji nemoci (Tab. 1).

Mezi potenciální mikroorganismy, které se podílejí na riziku rozvoje RS, řadíme také retroviry (Nexø *et al.*, 2015) a paramyxoviry. Paramyxoviry jsou obalené živočišné viry, které obsahují jednovláknovou ribonukleovou kyselinu (RNA). Patří k nim viry vyvolávající spalničky, zarděnky nebo infekci virem Epstein-Barr (EBV). Infekce virem spalniček nebo virem EBV může vyvolat akutní diseminovanou encefalomyelitidu, způsobit

demyelinizaci a poškození nervů (*Ebers, 1998*). Tato teorie je podporována též pozitivitou tzv. MRZ (M-morbili, R-rubella, Z-varicella zoster) reakce v nálezech mozkomíšního moku. Jedná se o syntézu specifických antivirových protilátek proti neurotropním virům spalniček, zarděnek a neštovic.

Tyto viry se však v populaci vyskytují běžně, v aktivaci choroby virovými infekcemi se tedy pravděpodobně uplatňuje několik mechanismů (*Ebers, 1998*).

**Tab. 1** Infekční etiologie RS - možné kandidátní mikroorganismy

Chlamydia pneumoniae
Herpetické viry
Human herpesvirus type 6 (HHV-6)
Herpes simplex virus (HSV)
Cytomegalovirus (CMV)
Epstein-Barr virus (EBV), HHV-4
Varicela zoster virus (VZV)
Canine distemper virus
Measles virus
Mumps virus
Rubella virus
Human T-cell leukaemia virus type 1 (HTLV-1)
Human endogenous retrovirus (HERV)
Corona virus
Bordetella pertussis
Papovaviruses

### **Byly popsány tyto hypotézy:**

- Aktivace superantigenem, kterým mohou virové a bakteriální produkty navodit aktivaci T-lymfocytů.
- Zkřížená reaktivita mezi infekčním antigenem a vlastní tkání-hypotéza molekulárních mimiker. Byla nalezena zkřížená reaktivita mezi fragmenty viru hepatitis B, chřipkových antigenů a myelinovým bazickým proteinem (MBP), dále antigenů EBV a proteolipoproteinem (PLP).
- Latentní infekce stimuluje imunitní odpověď, která navodí zkříženou reaktivitu-hypotéza perzistentní infekce molekulárních mimiker.
- Latentní infekce oligodendrocytů vede k lokálnímu zánětu v CNS bez potřeby lymfocytární infiltrace nebo fagocytózy myelinu - přímá infekční hypotéza.
- Infekce způsobí dysregulaci imunitního systému, který vede k orgánově specifickému autoimunitnímu onemocnění. Hypotéza imunitní deregulace.
- Aktivace T-lymfocytů vlastními antigeny, vzniklými zánětlivým procesem nebo štěpením, které nejsou za normálních okolností vystaveny imunitní kontrole – tzv. bystander aktivaci. Bylo prokázáno, že alfa B-crystallin, který vzniká štěpením myelinu a není za normálních okolností dostupný rozpoznání imunitnímu systému, navozuje výraznou aktivaci T-lymfocytů.
- Infekce mohou mít i protektivní vliv, např. expozice v dětství může chránit jedince proti rozvoji nemoci v pozdějším životě, což je základem hygienické hypotézy.

### **Virus Epstein-Barr a riziko rozvoje roztroušené sklerózy**

Jedná se o neurotropní virus, který se reaktivuje stresem. Vyskytuje se s vysokou prevalencí v běžné populaci. Byla provedena řada studií prokazující možný vliv EBV v etiologii RS (Ascherio *et al.*, 2000; Lang *et al.*, 2002; Levin *et al.*, 2003; Levin *et al.*, 2005; Levin *et al.*, 2010; Sundstrom *et al.*, 2004). Metaanalýzou osmi publikovaných studií byla prokázána přítomnost anti-EBV protilátek u více než 99 % RS pacientů ve srovnání s kontrolním souborem, v němž byla nalezena pouze u 90 % osob (Ascherio *et al.*, 2000). Přestože byla u pacientů s RS prokázána vyšší serologická prevalence, zvýšené titry anti-EBV

protilátka by měly být přítomny již před začátkem onemocnění, abychom mohli prokázat kauzální souvislost. Jejich přítomnost by mohla také svědčit o systémové imunitní dysregulaci. Výsledky několika studií podporují tento příčinný vztah. Ve studii v souboru 3 miliónů vojáků v USA byly hodnoceny sérové hladiny anti-EBV protilátek před vstupem do armády a následně byly měřeny každé dva roky. U 83 vojáků, kteří onemocněli RS byl vzestup jejich hladin nejvýznamnějším prediktorem rozvoje nemoci (*Levin et al., 2003; Levin et al., 2005*). Pozitivní asociace byla zjištěna již 5 let před rozvojem onemocnění, kdy došlo ke zvýšení titru protilátek na dvojnásobek až trojnásobek ve srovnání s kontrolním souborem. Jejich dynamika tedy prokazuje časovou závislost mezi prodělanou infekcí EBV a rozvojem RS (*Levin et al., 2003; Levin et al., 2005*).

Metaanalýzou 14 studií bylo také zjištěno nízké riziko rozvoje RS u lidí, kteří nikdy neprodělali infekci EBV, naopak zvýšené riziko rozvoje RS u jedinců, kteří byli infikováni v adolescenci či později (*Thacker et al., 2006*). Důležitou roli by mohla hrát zejména symptomatická infekce EBV-infekční mononukleóza. Epidemiologie infekční mononukleózy a RS je velmi podobná. Obě onemocnění se vyskytují zejména u mladých jedinců, kopírují zeměpisnou šířku a vyskytují se vzácně u lidí, kteří prodělali EBV virózu v časném dětství. Skutečnost, že lidé s infekční mononukleózou v anamnéze mají vyšší riziko RS vede k předpokladu, že zejména pozdní EBV infekce je možným příčinným faktorem (*Thacker et al., 2006*). Další informace o dlouhodobém vlivu pozdní EBV infekce jsou získané z dánské studie, do které bylo zařazeno 25 234 pacientů s infekční mononukleózou. RS se vyvinula u 104 pacientů a riziko rozvoje nemoci zůstalo trvale zvýšené po dobu 30 let (*Nielsen et al., 2007*). Tato studie však nepotvrdila, že hlavním a jediným rizikovým faktorem rozvoje RS bylo časové okno po prodělané infekci. Z těchto nálezů lze vyvodit, že v prevenci RS by se mohla uplatnit buď expozice malých dětí v časném období života EBV, nebo ochrana starších lidí před touto infekcí.

Dále byly prokázány protilátky proti antigenu EBV v mozkomíšním moku nemocných s RS (*Bray et al., 1992; Cepok et al., 2005*) a vyšší počet autoimunitních T-buňek u nemocných RS schopných rozpoznat EBV ve srovnání s kontrolními jedinci (*Ascherio et al., 2001; Lang et al., 2002*).

Možný mechanismus ovlivnění rozvoje RS virem EBV není dosud objasněn. Předpokládá se mechanismus molekulárních mimiker, tj. zkřížená reaktivita mezi antigeny EBV a PLP (*Christensen T, 2006, Lang et al., 2002; van Sechel et al., 1999*) a bystander aktivace (*Pender et al., 2003*).

## Herpetické viry

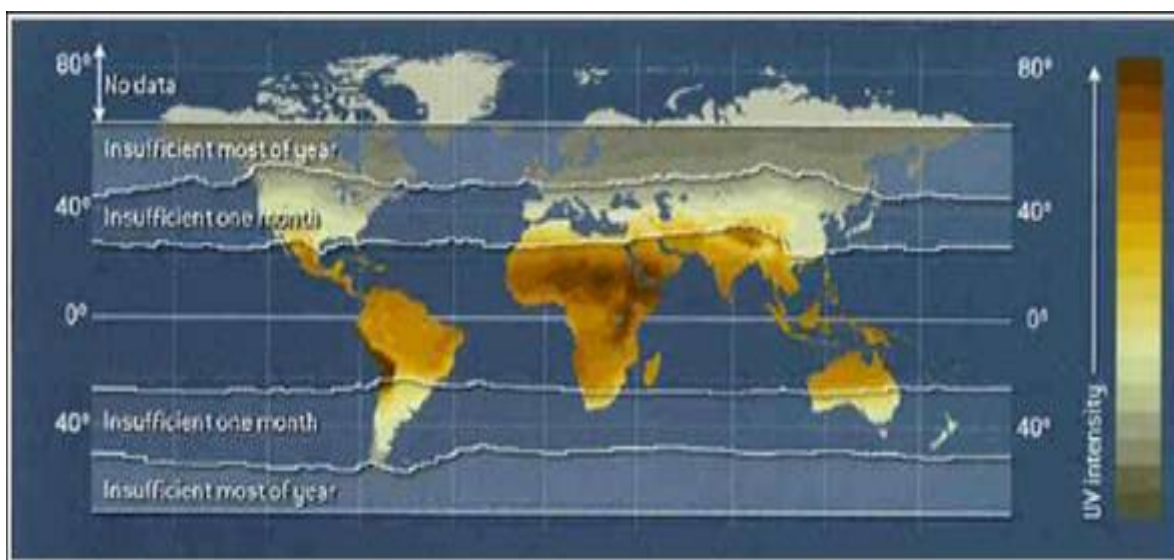
### Human herpesvirus type 6 (HHV 6) a riziko rozvoje roztroušené sklerózy:

Jedná se o ubikvitární virus, který se vyskytuje až s 90 % prevalencí v populaci. Jako ostatní neurotropní viry může vyvolat akutní encefalomyelitidu, navodit demyelinizaci a poškození axonů. Integruje se do hostitelského genomu a reaktivuje se za určitých okolností, např. stresem.

Byl prokázán nejen v oligodendrocytech v plakách RS, ale též v CNS lézích jiné etiologie, např. ischemických. Jeho úloha v etiopatogeneze RS není dosud objasněna. Byly prokázány zvýšené titry HHV-6 protilátek u RS, výsledky asociačních studií jsou však nejednoznačné (*Ablaschi et al., 2000; Sanders et al., 1996; Soldan et al., 1997*). Pozitivní asociace byla nalezena u 50 % RS studií a u 78 % studií, pokud byl testován zvlášť aktivní a latentní virus (*Ablaschi et al., 2000*).

#### 4.1.2 Sluneční záření a nedostatek vitamínu D<sub>3</sub>

Hypotéza o souvislosti nedostatku vitamínu D<sub>3</sub> s rizikem rozvoje RS v určité geografické oblasti je podložena narůstající prevalencí onemocnění se zvyšující se vzdáleností od rovníku. Dochází k nedostatečné produkci vitamínu D<sub>3</sub> vzhledem k nízké intenzitě slunečního záření, zejména v zimních měsících (*Jablonski and Chaplin, 2000*) (Obr. 4). V přímořských oblastech, kde je zajištěn vyšší příjem vitamínu D<sub>3</sub> potravou, se prevalence onemocnění snižuje (*Presthus, 1960*) (Obr.5).



Obr. 4 Počet měsíců v roce, během kterých není produkován dostatek vitamínu D<sub>3</sub> vzhledem k nízké intenzitě slunečního záření.

Zdroj: Multiple Sclerosis: Epidemiology, Genetics and Environmental Factors: www.msforum.net)

- a) Nedostatek vitamínu D > než 6 měsíců/rok.
- b) Nedostatek vitamínu D > 1-6 měsíců/rok.
- c) Dostatek vitamínu D celý rok.
- d) Nedostatek vitamínu D > 1-6 měsíců/rok.
- e) Nedostatek vitamínu D > než 6 měsíců/rok.



<i>A - Finnmark (2003)</i>	<i>&gt;83</i>
<i>B - Troms (2003)</i>	<i>&gt;104</i>
<i>C - Nordland (1999)</i>	<i>106</i>
<i>D - Nord Trøndelag (1999)</i>	<i>164</i>
<i>E - Oppland (2002)</i>	<i>190</i>
<i>F - Hordaland (2003)</i>	<i>151</i>
<i>G - Oslo (2005)</i>	<i>154</i>

**Obr. 5 Prevalence RS onemocnění v jednotlivých oblastech Norska (/105). Prevalence RS v Norsku nevzrůstá se zvyšující se zeměpisnou šířkou jako v ostatních zemích Evropy a USA**

Zdroj: Kampman MT et al. J Neurol 2007; 254: 471–477)

## Sluneční záření, syntéza vitamínu D<sub>3</sub> a prevalence roztroušené sklerózy

Zvýšené riziko rozvoje RS je spojeno se zvyšující se zeměpisnou šířkou a s tím korelující sníženou expozicí slunečnímu (zejména ultrafialovému B, UVB) záření na severní i jižní polokouli zrcadlově. Sluneční záření hraje zásadní roli při syntéze vitamínu D<sub>3</sub> v kůži. Vitamin D<sub>3</sub> (cholecalciferol) je produkován v kůži po aktivaci cholesterolu. Po vstupu do krve je metabolizován v játrech hydroxylací na 25 (OH) D<sub>3</sub> a poté v ledvinách transformován na aktivní formu 1,25- dihydroxycholecalciferol (1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>), známý jako kalcitrol. Vazbou na receptor vitamínu D je ovlivněna transkripce mnoha genů, což má prolongovaný imunologický efekt. Cirkulující hladina 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> je závislá na expozici UVB a příjmu vitamínu D potravou.

Vitamin D<sub>3</sub> je vlastně hormon-steroid, jehož aktivní forma se podílí na metabolismu kalcia, fosforu, ovlivňuje vývoj a zachování správné stavby kostí, zubů a je také důležitým imunomodulátorem (*Munger et al., 2006*). Receptor vitamínu D (VDR) je členem steroidní receptorové nadrodiny, který funguje jako aktivační transkripční faktor. Je exprimován v mnoha tkáních lidského těla včetně imunitního systému. Je přítomný v tenkém střevě, tračníku, osteoblastech, aktivovaných T a B lymfocytech, pankreatických beta buňkách Langerhansových ostrůvků, mozku, srdci, kůži, pohlavních orgánech, prostatě, buňkách mléčné žlázy (*Holick et al., 2004*). Aktivace VDR navozuje silné antiproliferativní, prodiferenční a imunomodulační účinky (*Tab. 2*). Je ovlivňován řadou dalších faktorů a zvyšuje/snižuje transkripci určitých genů. Aktivní metabolit vitamínu D<sub>3</sub>, 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> a VDR se vzájemně ovlivňují. Po navázání 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> na VDR se vytvoří heterodimer s retinoidním X receptorem (RXR). Tento heterodimer se následně váže na VDRE, což jsou specifické DNA sekvence v promotorové oblasti 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> responzivních genů. Komplex VDR/RXR po vazbě na VDRE moduluje transkripci velkého množství 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> responzivních genů a tímto mechanismem může kalcitrol přímo regulovat genovou expresi v 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> odpovídajících buňkách. Současné pokroky v genomové technologii, např. mikroarray analýzy nebo genome-wide studie umožňují výzkum genetických a biochemických změn, které jsou asociovány s fyziologickým účinkem 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> (*Dusso et al., 2005*). Detailní analýza molekulárních účinků 1,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> a VDR umožní nalézt řadu dalších responzivních genů a objasnit komplexní účinky vitamínu D (*Wang et al., 2005*).



**Tab. 2 Biologické a imunomodulační účinky vitamínu D<sub>3</sub>**

Podporuje immunosupresi, zvyšuje apoptózu dendritických buněk a fagocytózu makrofágů, zvyšuje aktivitu natural killer buněk, indukuje expresi IL-10 a antimikrobiálních peptidů.
Inhibuje diferenciaci a maturaci dendritických buněk, funkci IL-1 (prozánětlivý), inhibuje produkci Th1 indukovaných cytokinů, produkci interleukinu-2, transkripci IFN $\gamma$ vazebných genů a genů kódujících neutrofilní chemotaktický faktor IL-8.
Má neuroprotektivní efekt, indukuje expresi nervového růstového faktoru a chrání proti oxidačním radikálům.
Má anti-tumorózní aktivitu.
Reguluje homeostázi kalcia, hladiny kalcia a fosforu, jejich absorpci z potravy a reabsorpce kalcia v ledvinách, podporuje mineralizaci kostí.

### **Fyziologické funkce vitamínu D**

Vzhledem k expresi VDR v mnoha tkáních lidského těla a velkému množství tzv. D<sub>3</sub> responzivních genů je zřejmé, že vitamin D<sub>3</sub>-cholecalciferol ovlivňuje široké spektrum fyziologických funkcí, např. kalciovou homeostázu, uplatňuje se v prevenci některých druhů rakoviny, neuroprotekcii a systémové imunitní regulaci.

### **Neuroprotektivní účinky vitamínu D**

Předpokládá se, že 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ovlivňuje funkci nervového systému a má řadu neuroprotektivních účinků (*Garcion et al., 2002; Nakagawa et al., 2006*) (Tab. 2), neboť VDR byl nalezen také v neuronech a gliových buňkách. Mozkové buňky produkují také enzymy, které se podílí na metabolismu 1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>. Jsou potřebné další studie k objasnění potenciálního využití těchto nálezů v klinické praxi.

### **Regulace imunitního systému**

1.25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> je silný imunomodulátor, neboť VDR je přítomný v aktivovaných T i B lymfocytech. V mnoha experimentálních zvířecích modelech autoimunitních chorob podání

1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> buďto snižuje, nebo vede k úplnému zastavení rozvoje nemoci. Ve studii experimentální alergické encefalomyelitidy (EAE) na myších bylo zjištěno, že kalcitrol je silným inhibítozem EAE. Jeho podání těžce postiženým myším vedlo ke zlepšení tíže postižení (*Cantorna et al., 1996; Spach et al., 2006*). 1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> zvyšuje protizánětlivou aktivitu IL-10, který ovlivňuje mozkové parenchymální buňky (*Spach et al., 2006*).

Dalším zajímavým nálezem je aktivace receptoru PD-L1 vitaminem 1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>. Tento receptor je exprimován na antigen-prezentujících buňkách (APC), aktivovaných T buňkách a v různých tkáních (*Latchman et al., 2004*). V první fázi imunitní reakce se PD-L1 podílí na stimulaci proliferace T lymfocytů, v pozdějších fázích však zvýšená exprese PD-L1 vede k inhibici T buněk a apoptóze. V experimentálním modelu u myší, u nichž byl receptor PD-L1 odstraněn, byla potvrzena vyšší vnímavost k rozvoji EAE (*Latchman et al., 2004*).

Tato molekula hraje tedy pravděpodobně klíčovou roli v T-buněčné toleranci. Úloha 1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> v procesu apoptózy může vést k dalšímu možnému objasnění mechanismu účinku, kterým by mohla dostatečná hladina vitamínu D chránit před rozvojem autoimunitních onemocnění včetně RS (*Munger et al., 2006*).

Kalcitrol je také důležitým induktorem vlastní imunity, což umožňuje rychlou obranu proti mikrobiálním patogenům. Byla prokázána přítomnost VDREs v promotorech genů pro antimikrobiální peptidy cathelicidin a defensin β 2 a 1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> navozuje jejich přímou expresi v keratinocytes, monocytech i neutrofilech. Kultury buněčných linií inkubované s 1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> vykazují antimikrobiální aktivitu proti E-coli a *Pseudomonas aeruginosa*, avšak bez přítomnosti vitamínu D<sub>3</sub> není antimikrobiální efekt přítomen (*Wang et al., 2004*). Bylo také prokázáno, že se aktivní metabolit vitamínu D podílí na aktivaci toll-like receptorů, která navozuje přímou antimikrobiální odpověď v monocytech a makrofázích proti buněčným bakteriím, například *Mycobacterium tuberculosis* (*Liu et al., 2006*).

Tyto nálezy ukazují, že navození exprese antimikrobiálních genů prostřednictvím 1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> hraje významnou roli v UVB indukované individuální vlastní imunitě. Vitamin D může být tedy účinný v léčbě oportunních infekcí, naproti tomu jeho deficit může zvýšit vnímavost k některým mikrobiálním infekcím, např. k již zmíněnému *Mycobacterium tuberculosis*. Nedostatek vitamínu D v zimních měsících by mohl také vysvětlit výskyt některých sezónních infekcí, např. chřipky nebo běžného nachlazení (*Cannel et al., 2006*). Imunomodulační efekt kalcitrolu musí být ještě podrobněji studován a objasněn.

## Vliv vitamínu D u roztroušené sklerózy

Vitamin D se může významně podílet na spuštění autoimunitního procesu u RS a podstatně ovlivnit další vývoj choroby vzhledem ke svému komplexnímu imunomodulačnímu, imunosupresivnímu, neuroprotektivnímu účinku i podílu na inhibici oportunních infekcí, které mohou aktivovat imunitní systém a navodit autoimunitu v pozdějším životě.

### Souhrn

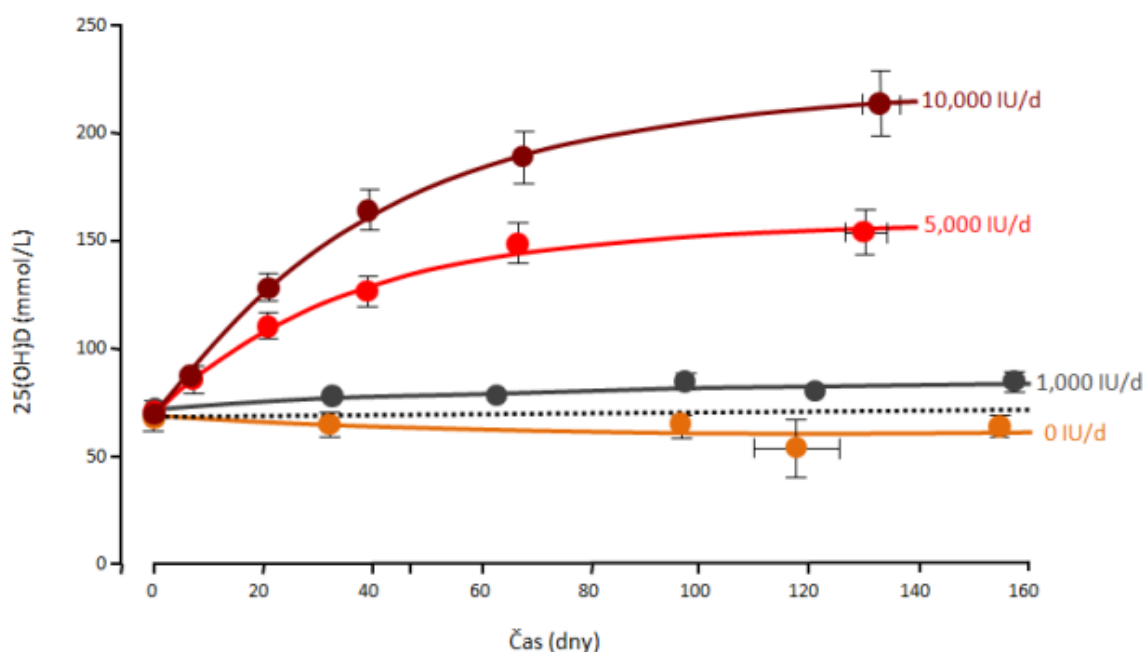
Je dlouhodobě známo, že vitamin D hraje klíčovou roli v homeostáze kalcia. V poslední době bylo zjištěno, že má také mnoho dalších neuroprotektivních a imunomodulačních účinků. Podílí se např. na buněčné proliferaci a diferenciaci a řada dalších účinků ještě není pravděpodobně objasněna. Významné biologické účinky zprostředkované vitaminem D jsou umožněny prostřednictvím tkáňově specifické exprese VDR. Výsledky současných epidemiologických studií prokazují, že chronický nedostatek vitamínu D<sub>3</sub> v potravě a nedostatek slunečního záření, zejména v zimních měsících, může zvýšit riziko rozvoje některých chronických nemocí, zejména autoimunitních onemocnění, jako RS, revmatoidní arthritidy, diabetes mellitus typu I, dále rakoviny, afektivních onemocnění, hypertenze či snížené obraně proti mikrobiálním infekcím (*Holick, 2004*).

Uvažuje se také o možném vlivu slunečního záření v průběhu těhotenství na vnímavost k RS. V souboru pacientů z Kanady, Británie, Dánska a Švédska bylo u jedinců narozených v květnu prokázáno zvýšené riziko rozvoje nemoci o 19 % ve srovnání s lidmi narozenými listopadu. Zvýšené riziko u lidí narozených v květnu by mohlo být zapříčiněno sníženou expozicí matky slunečnímu záření v zimních měsících v průběhu gravidity, vedoucí k deficitu vitamínu D (*Willer et al., 2006*).

Proto je velmi důležité věnovat dostatečnou pozornost optimální suplementaci vitaminem D<sub>3</sub>. V současné době probíhá řada studií k objasnění této problematiky. Hlavním zdrojem vitamínu D je syntéza v kůži, důležitou roli hraje také přívod potravou. Významný nedostatek vitamínu D způsobuje křivici a osteomalacii. Dosud však není objasněno, jaká dávka tohoto vitamínu je potřebná k optimálnímu zajištění ostatních výše uvedených fyziologických procesů.

Bylo zjištěno, že současná doporučená denní dávka 400 IU vitamínu D<sub>3</sub> pro dospělé je velmi nízká a nedostatečná pro zachování cirkulujících hladin 25(OH)D<sub>3</sub> v krvi a zajištění biologických funkcí vitamínu D. Bylo rovněž prokázáno, že v zimních měsících při nedostatečné expozici slunečnímu záření je potřeba suplementovat dávkou vitamínu D<sub>3</sub> až 1000 IU/den, aby byla zachována optimální hladina 25(OH)D<sub>3</sub> v krvi (Heaney *et al.*, 2003) (Obr. 6).

Vzhledem k tomu, že rozsáhlá část světové populace je vystavena velmi nízkému UVB záření v průběhu roku, mohl by deficit vitamínu D představovat významné zdravotní riziko. Proto by měla být tato problematika podrobně zkoumána.



**Obr. 6** Cirkulující hladiny 25(OH)D<sub>3</sub> ve vztahu k perorálnímu příjmu vitamínu D<sub>3</sub>

Zdroj: Heaney RP *et al.* Am J Clin Nutr 2003; 77: 204–210.

### 4.1.3 Stres

Stres je dalším rizikovým faktorem rozvoje a progresu RS. Je prokázáno, že nervový, imunitní a endokrinní systém se navzájem ovlivňují (Ebers, 1998). Stresovou reakcí může vyvolat nadměrná psychická nebo fyzická zátěž. Krátkodobý stres, jehož podstatou je vyvolání obranné či únikové reakce na aktuální nebezpečí a dochází k potlačení imunitní reakce může mít pozitivní vliv. Po jeho odeznění dochází během několika týdnů k normalizaci stavu a následně mezi 4-6 týdnem k sekundární aktivaci imunitního systému. V tomto období dochází také k nejčastějšímu rozvoji atak u nemocných s RS (Ebers 1998). Také chronický, dlouhodobý stresující faktor hraje významnou roli v aktivaci imunitního systému a může přispět k rozvoji řady onemocnění, včetně RS. Stres negativně působí na nervový i hormonální systém organismu. Vědci z University California v Los Angeles shrnuli poznatky z molekulárních a experimentálních výzkumů na zvířatech, z klinických i epidemiologických studií (Gold *et al.*, 2005). Nálezů ukazují, že stres může navodit aktivaci RS a rozvoj ataky prostřednictvím dysregulace hypotalamo-hypofyzární osy (HPA) a autonomního nervového systému. V počátečních stádiích onemocnění dochází pravděpodobně ke snížení aktivity HPA systému, která spolu se sníženou senzitivitou leukocytů ke glukokortikoidům vede k aktivaci zánětlivého procesu. Naopak při progresi choroby se aktivita HPA zvyšuje, dochází ke snížené senzitivě leukocytů k beta adrenergní stimulaci a dochází k progresi neurodegenerativního procesu (Gold *et al.*, 2005). Důležitou roli v aktivaci imunitního systému stresujícím faktorem může hrát také cirkadiální rytmus. V experimentálních studiích na krysách bylo prokázáno, že stres v průběhu dne vede k aktivaci zánětlivého procesu a produkci prozánětlivých cytokinů v hippocampu a mikroglii. Pokud byl stresující faktor aplikován v noci, k elevaci prozánětlivých cytokinů nedošlo (Fonken *et al.*, 2015). Vliv stresu na imunitní systém potvrdila také studie na 14 zdravých studentech (Lalive *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že před stresující událostí, v tomto případě státní závěrečnou zkouškou, došlo ke snížení hladiny prozánětlivého tumor nekrotizujícího faktoru a následující den k jejímu opětovnému zvýšení. Zvýšení hladiny TNF-a u pacientů s RS může navodit aktivaci autoimunitního procesu a ataku onemocnění (Lalive *et al.*, 2002).

#### 4.1.4 Vliv výživy, sociální a kulturní faktory

##### Možný vliv mikrobiomu na riziko rozvoje roztroušené sklerózy

V posledních letech bylo také zjištěno, že důležitou roli v lidském vývoji a patofyziologii hraje střevní mikrobiom. Tvoří střevní biologickou bariéru proti patogenům a hraje významnou úlohu v udržení střevní rovnováhy, vývoji, výživě i imunitě člověka (*Hooper et al., 2015*). Bakterie střevního mikrobiomu obsahují okolo 3 miliónů genů a asi 100krát převyšují počet genů lidského genomu (*Brüls et al., 2012*). Weisntock et al. v genetickém výzkumu vyšetřil genomy u 101 druhů střevních bakterií, které se běžně nacházejí v lidském střevě. Bylo zjištěno, že genomy vybraných bakteriálních druhů obsahují okolo 10 miliónů polymorfizmů, které se navíc lišily mezi hostiteli četnými insercemi a delecemi (*Weisntock et al., 2012*). Bylo také prokázáno, že střevní mikrobiom jednotlivých lidí je z genetického hlediska velmi stabilní. Dědičná informace střevního mikrobiomu je tedy pro jednotlivce jedinečná podobně jako jeho vlastní DNA; hovoří se o tzv. druhém genomu (*Brüls et al., 2012*). Individuální reakce na léky nebo rozdíly v metabolismu jsou do značné míry ovlivněny nejen individuálními rysy lidského genomu, ale také specifickými variantami genů střevního mikrobiomu a jejich vzájemnou interakcí. Změny složení střevní mikroflóry v důsledku změny životního stylu, nadbytku sladidel, lepku, geneticky modifikovaných potravin, konzumaci alkoholu, nadužívání antibiotik a další narušuje střevní ekosystém a vzniká střevní dysbióza, která může vyvolat řadu onemocnění; kromě gastrointestinálních také diabetes, autoimunitní choroby, alergická či neuropsychiatrická onemocnění (*Wekerle H., 2012*). Udržení zdravé mikroflóry může být proto slibnou léčbou některých výše uvedených onemocnění, včetně RS (*Wekerle H., 2012; Xu et al., 2015*).

##### Vyšetření metabolického profilu

Další slibnou, neinvazivní metodou je vyšetření metabolického profilu (metabolomu) nemocných s RS pomocí H-NMR spektroskopie. Její velkou výhodou je vysoká reprodukovatelnost a možnost kvantifikace, avšak tato metoda má nízkou senzitivitu. Pomocí H-NMR spektroskopie byla vyšetřena plazma 73 RS pacientů a 88 zdravých kontrol (*Cocco et al., 2016*). Bylo zjištěno snížení glukozy, 5-OH-tryptofanu a tryptofanu a naopak zvýšení 3-OH-butyátu, acetoacetátu, acetonu, alaninu a cholinu u nemocných s RS ve srovnání se

zdravými jedinci. Jedná se o metabolický řetězec glukózy a tryptofanu. Tryptofan hraje důležitou roli v metabolismu neurotransmiterů a serotoninu, které se účastní imunitních dějů a má zejména neuroprotektivní a neurotoxické vlastnosti (Lim et al., 2010). Reinke et al. také prokázal u RS pacientů zvýšení cholinu v mozkomíšním moku, který je spojován s demyelinizací (Reinke et al., 2014). V některých dalších studiích bylo u pacientů s RS a NMO též nalezeno zvýšení acetátu, který je tvořen metabolismem astrocytů (Moussallieh et al., 2014). Mohlo by se jednat o slibné biomarkery, které by mohly být využity v diagnostice i léčbě pacientů s RS.

### **Další faktory**

Byla vyslovena řada dalších teorií o souvislosti RS s přítomností chemikálií či vlivu hygienických podmínek. Je dlouhodobě známá např. asociace s vyšší sociálně-ekonomickou úrovní, sanací zdraví, chladným a vlhkým počasím a urbanizací. Žádná z těchto teorií však nebyla potvrzena.

## 4.2 Genetické faktory

První genetické výzkumy vycházely z epidemiologických poznatků o familiárním výskytu RS (Tab. 3). Studie dvojčat a sourozenců umožňují jedinečný výzkum komplexního působení genetických a environmentálních faktorů na riziko rozvoje a průběhu RS. Většina výsledků studií u dvojčat se shoduje; jednovaječná dvojčata mají až 30 % pravděpodobnost onemocnění, dvouvaječná 5 % (*Cree B, 2008*) (Tab. 4). V kanadské CCPGSMS studii, do které bylo zahrnuto 370 párů dvojčat, bylo prokázáno 25.3 % riziko u jednovaječných a 5.4 % u dvouvaječných dvojčat. U jednovaječných dvojčat ženského pohlaví byla prokázána vyšší 34 % shoda, u dvouvaječných pak 3.8 % (*Willer et al., 2003*). Kolísá však v jednotlivých zemích, rozdíly jsou dány také prevalencí nemoci v určité geografické oblasti. Např. na Sardinii, kde je prevalence onemocnění vysoká (147/100 tis. obyvatel), činí shoda 22.2 %. Naproti tomu v kontinentální Itálii, kde je prevalence nízká (61/100 tis obyvatel), pouze 14.5 % (*Ristori et al., 2006*).

Srovnávací studie jednovaječných, dvouvaječných dvojčat a sourozenců umožňují hodnocení podílu genetického vlivu, gestačních podmínek a environmentálních faktorů na počátek a průběh onemocnění. Monozygotní dvojčata mají nejvyšší riziko, dvouvaječná dvojčata mají vyšší riziko než sourozenci, neboť se uplatňují společné gestační a zevní vlivy. Přínosné jsou také studie nevlastních sourozenců, kteří sdílejí pouze 25 % společných genů buď matčina nebo otcova genotypu (*Ebers et al., 2004*).

Nejedná se o klasickou monogenní, ale multifaktoriální dědičnost. Na spuštění autoimunitního procesu se pravděpodobně podílí velké množství tzv. malých genů, pravděpodobně okolo 80, které podmiňují vysokou interindividuální variabilitu choroby (*Ebers G, 1995, Dyment et al., 2004*).

Primární roli v patogenezi RS hraje pravděpodobně geneticky determinovaná imunitní odpověď. Proto se nejvíce studií se zaměřilo na asociaci této choroby s geny pro lidské leukocytární antigeny (HLA).



**Tab. 3 Zvýšení rizika onemocnění RS u příbuzných z důvodu sdílení společných genů**

<b>Příbuzenský vztah</b>	<b>Riziko onemocnění RS</b>
Výchozí pravděpodobnost výskytu v populaci	1/1000
Bratranec/sestřenice s RS	7/1000
Nevlastní sourozenec z otcovy strany	13/1000
Nevlastní sourozenec z matčiny strany	24/1000
Vlastní sourozenec	31/1000
Dvoujaječná dvojčata	55/1000
HLA-identický sourozenec	80/1000
Jednojaječná dvojčata	270/1000

*Zdroj: Ebers G, MS Forum 2007; Modern Management Workshop, Wiesbaden*

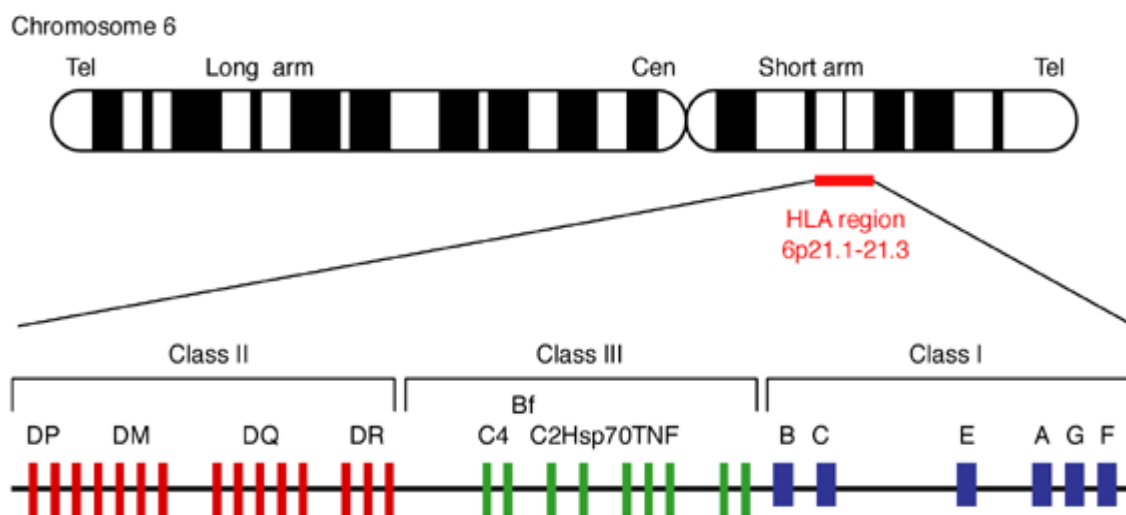
**Tab. 4 Pravděpodobnost onemocnění u jednovaječných a dvoujaječných dvojčat**

<b>Země</b>	<b>Pravděpodobnost onemocnění RS</b>
Kanada, Dánsko, Finsko, VB, USA	MZ = 25–30 % DZ = 3–5 %
Francie	MZ = 5.9 % DZ = 3 %
Itálie	MZ = 14.5 % DZ = 4 %

*Zdroj: Willer CJ et al. PNAS 2003; 100: 12877-82; Ristori G et al. Ann Neurol 2006; 59: 27-34.*

#### 4.2.1 Hlavní histokompatibilní komplex (MHC)

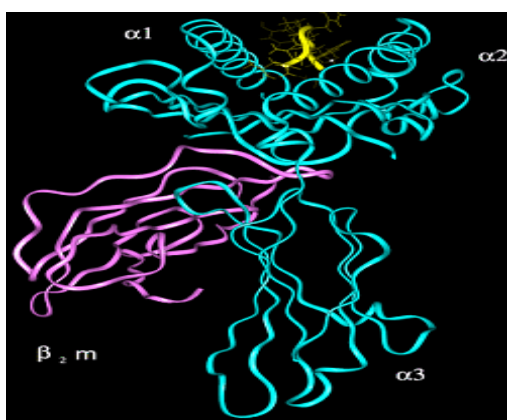
RS je T-buněčné, autoimunitní, demyelinizační onemocnění. Cílovým antigenem je myelin CNS, který je napadán autoagresivními T-buňkami a je ničen. Rozpoznání antigenu hraje klíčovou roli pro navození autoimunitního procesu a interakce mezi T-buňkami a antigen prezentujícími buňkami (APCs) je jedním z prvních kroků v patogenním procesu. APCs zpracovávají cizí antigeny vazbou s vlastním antigenem-molekulou major histocompatibility komplexu (MHC), známou jako lidský leukocytární antigen (HLA) a prezentují je T-buněčným receptorům. Exprese HLA molekul na APCs tedy umožňuje interakci lidského imunitního systému s antigeny ze zevního prostředí. Prezentace různých HLA molekul na povrchu APCs může ovlivnit individuální odpověď na cizí a vlastní antigeny a tímto způsobem může být modifikována vnímavost k RS. Základní složkou této specifické, získané imunitní odpovědi jsou T-buňky exprimující TCRs na svých membránách a APCs. T-lymfocyty rozpoznají antigen po navázání na molekuly HLA I. nebo HLA II. třídy, které mají rozdílné funkce. Geny HLA I. a II. třídy jsou umístěny na krátkém raménku 6. chromozómu (Obr. 7). Kódují buněčné povrchové proteiny, které hrají zásadní roli v iniciaci imunitní odpovědi a zejména v prezentaci antigenů CD4+ a CD8+ T-lymfocytům.



**Obr. 7** Geny HLA I., II. a III. třídy jsou umístěny na krátkém raménku 6. chromozómu.

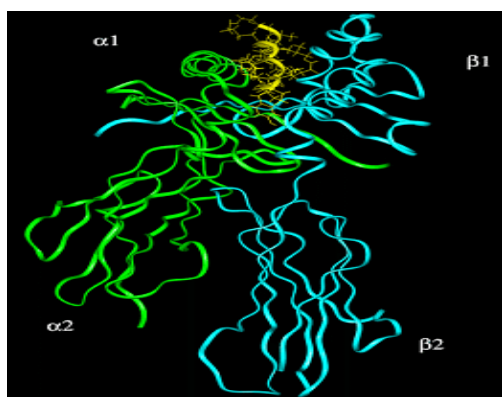
Zdroj: Gene map of the human leucocyte antigen (HLA) region. Expert Reviews in Molecular Medicine 2003 Cambridge University Press, 2003

Geny HLA I. třídy-(HLA-A, HLA-B, HLA-C) kódují antigeny, které jsou integrální součástí plasmatické membrány všech jaderných buněk a prezentují peptidové antigeny cytotoxickým CD8+ buňkám. Nejsou exprimovány na erytrocytech, v buňkách CNS nejsou exprimovány vůbec nebo jen v nepatrné míře. Antigeny I. třídy se skládají ze dvou polypeptidových jednotek, variabilního těžkého řetězce kódovaného v MHC a nepolymorfního polypeptidu,  $\beta$  2- mikroglobulinu (Obr. 8). Tento polypeptid je kódován genem lokalizovaným mimo MHC, na 15. chromozomu. HLA-I prezentuje vnitřní antigeny, které se nacházejí přímo v buňkách. Může se jednat např. o proteiny kódované virovými geny nebo proteiny kódované mutovanými geny v nádorově změněných buňkách.



**Obr. 8 HLA molekuly I. třídy se skládají ze dvou polypeptidových jednotek, variabilního těžkého řetězce kódovaného v MHC a nepolymorfního polypeptidu,  $\beta$  2 - mikroglobulinu.**

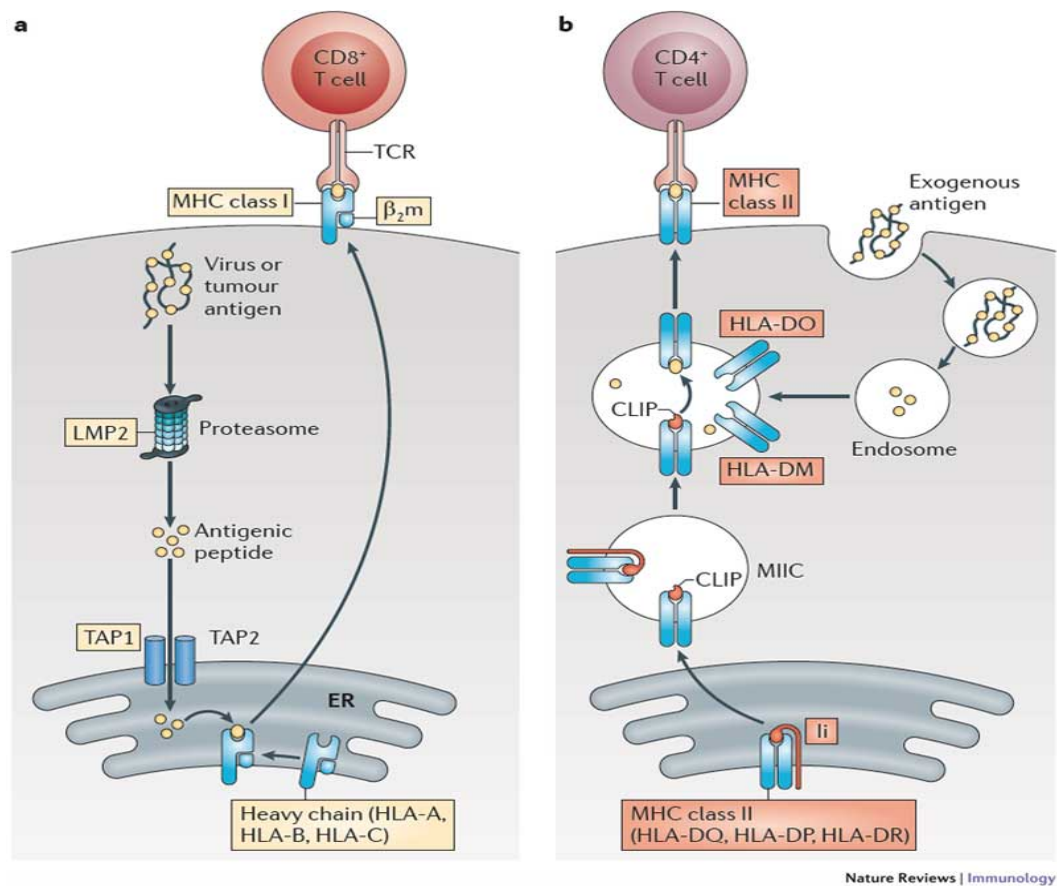
Zdroj: Ester Šmídová. Systém HLA a prezentace antigenu Ústav imunologie UK 2. LF a FN Motol.



**Obr. 9 HLA molekuly II. třídy se skládají ze dvou transmembránových glykoproteinů, nazývaných  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec, oba dva řetězce jsou polymorfní.**

Zdroj: Ester Šmídová. Systém HLA a prezentace antigenu Ústav imunologie UK 2. LF a FN Motol.

Geny HLA II. třídy (HLA-DP, HLA-DQ, HLA-DR) kódují heterodimérové receptory exprimované na buněčném povrchu B-lymfocytů, makrofágů, aktivovaných T-lymfocytů a dendritických buňkách. HLA molekuly II. třídy se skládají ze dvou transmembránových glykoproteinů, nazývaných  $\alpha$  a  $\beta$  řetězec, oba dva řetězce jsou polymorfní (Obr. 9). Prezентují fragmenty antigenů získané z mimobuněčných zdrojů CD4<sup>+</sup> lymfocytům (Obr. 10). Antigeny pocházející z vnějšího prostředí se do organismu dostávají přes gastrointestinální trakt, respirační trakt, kůži nebo arteficiálně např. injekčně. Mezi HLA III. třídy patří složky komplementu, TNF, heat shock proteinů (HSP) a další.

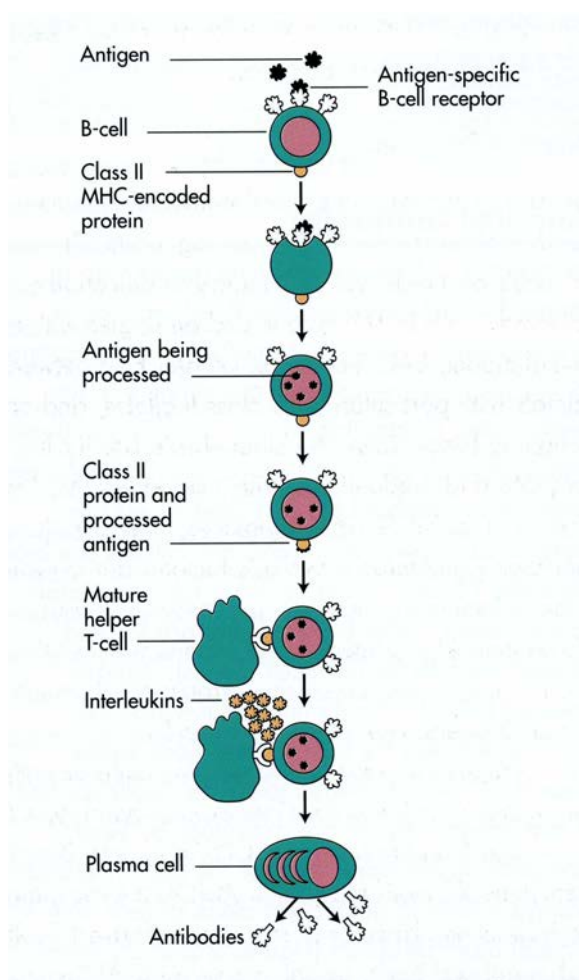


**Obr. 10 HLA (MHC) molekuly I. třídy prezentují intracelulární antigeny CD8<sup>+</sup> lymfocytům, HLA (MHC) molekuly II. třídy prezentují antigeny získané z mimobuněčných zdrojů CD4<sup>+</sup> lymfocytům.** Zdroj: Nature Reviews Immunology. ISSN: 1474-1733 EISSN: 1474-1741

Heavy chain-těžký řetězec; Antigenic peptide-antigenní peptid; Virus-virus; Tumour antigen-nádorový antigen; Exogenous antigen-exogenní antigen.

Pro výslednou imunitní reakci je podstatné, že T-lymfocyty „vidí“ cizí antigeny pouze ve spojitosti s molekulami vlastního HLA systému. Normální imunitní systém brání T-lymfocytům napadat vlastní antigeny, které nejsou obvykle T-buňkami rozpoznány. K selekci nezralých T-lymfocytů dochází v thymu podle jejich schopnosti rozeznávat HLA vlastního těla. Nereagující, nebo příliš agresivní buňky jsou asi z 95 % zničeny, ostatní vstupují do krve a sekundárních lymfatických orgánů (Šterzl I, 2005).

B lymfocyty zpracovávají antigen exogenní cestou také ve spojení s HLA molekulami II. třídy. CD4+ buňka následně sekretuje cytokiny, tím je B lymfocyt aktivován a produkuje odpovídající protilátky (Obr. 11).



**Obr. 11 B lymfocyty zpracovávají antigen exogenní cestou také ve spojení s HLA molekulami II. třídy**

Zdroj: (Jeanne Kelly, 1996)

Antigen-antigen; Antigen-specific B cell receptor-antigenně specifický receptor B-lymfocytů; B-cell-B-lymfocyty; Class II MHC encoded protein-povrchový protein kódovaný geny HLA II třídy; Antigen being processed-zpracování antigenu; Class II protein and processed antigen-povrchový protein HLA II třídy a zpracovaný antigen; Mature helper T cell-zralý pomocný T-lymfocyt; Interleukins-interleukiny; Plasma cell-plazmatická buňka; Antibodies-protilátky.

MHC systém je složen ze skupin nejpolymorfnějších genů v genomu. Lokusy HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA DP, HLA DQ a HLA-DR jsou extrémně variabilní a mohou mít až desítky alelických variant, tzv. polymorfismů. Polymorfismy se liší v sekvencích jednotlivých nukleotidů, může dojít např. k záměně pouze jednoho nukleotidu. Obrovský počet těchto polymorfismů vede ke kódování velkého množství různých antigenních variant buněčných povrchových proteinů, které se významnou měrou účastní imunologických reakcí. Z těchto variant každý dědí v každém typu 2 alely, což dohromady tvoří tisíce možných kombinací. Diverzita je patrná na příkladu studie HLA typizace 1000 dárců krve, provedené v USA. Typizace byla provedena pouze pro HLA A a B. U více než poloviny vyšetřených byl nalezen unikátní HLA haplotyp; 111 dárců mělo haplotyp, který sdíleli pouze s 1 osobou v celé skupině. Nejčastější haplotyp (HLA-A1, HLA-A3, HLA-B7, and HLA-B8) byl v celé skupině nalezen u 11 dárců. Lokusy A, B, C, D, DR, DP, DQ jsou tedy přítomny v populaci v různých alelách. Přítomnost jednotlivých alel a lokusů může vést k přiměřené, slabé, nebo naopak nadměrné imunitní reakci na určitý antigen (Shoenfeld et al., 2007).

V populaci je tedy zachováno velké množství HLA alel ([www.allelefrequencies.net/test/default1.asp](http://www.allelefrequencies.net/test/default1.asp), *Robinson et al., 2003*), přičemž mezi různými populacemi existují značné rozdíly ve frekvenci jednotlivých HLA variant. Zůstává zachován velký počet alel nízké frekvence, které jsou pro své hostitele přínosné zejména z evolučního hlediska. HLA alely jsou na určitém chromozomu ve velmi těsné vazbě a jsou přenášeny společně jako tzv. haplotypy (*Robinson et al., 2003*). Běžné viry a jiné patogeny jsou typicky prezentovány imunitnímu systému frekventními HLA alelami, které jsou přenášeny na další generace. Za určitých okolností se však mohou viry adaptovat na zevní prostředí a může dojít k selektivní změně jejich struktury. Tyto modifikované virové antigeny nejsou prezentovány imunitnímu systému cestou běžných HLA molekul, avšak méně frekventní alely mohou mít tuto schopnost zachovanou. Jedinci, kteří mají méně frekventní alely, mohou být zvýhodněni v možném přežití v průběhu epidemií. Tento mechanismus byl potvrzen ve studii potomků 367 Holanďanů, kteří emigrovali v roce 1845 do Surinamu v Jižní Americe. V průběhu dvou týdnů po příjezdu zemřelo 180 lidí na břišní tyfus a o dva roky později zemřelo dalších 37 lidí na žlutou zimnici. Většina přeživších obyvatel zůstala v Surinamu. V roce 1978 byla provedena srovnávací studie frekvence určitých genetických polymorfismů mezi touto skupinou a holandskými kontrolami. Byla nalezen vyšší výskyt málo frekventní alely HLA Bw38 v populaci přeživší epidemii ve srovnání s kontrolami.

Na tomto příkladu emigrantů do Surinamu bylo demonstrováno, že běžná HLA alela vyskytující se u Holanďanů nedostatečně zabránila smrtelné infekci tyfu nebo žluté zimnice.

Málo frekventní alela HLA u přeživších, která je schopna prezentovat antigeny těchto patogenů a ochránit svoje nositele proti výše uvedeným onemocněním, pak byla přenesena na další generace díky selekčnímu tlaku (*de Vries et al., 1979*).

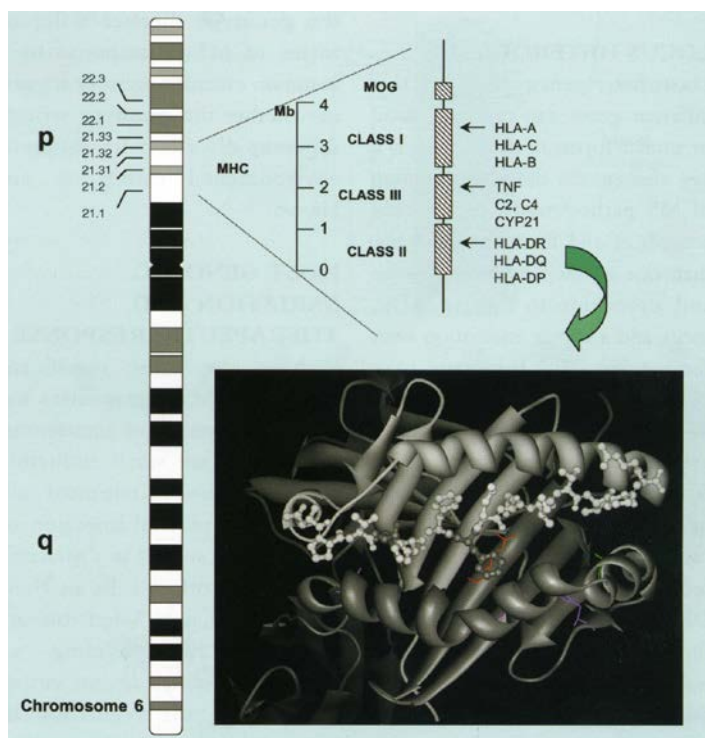
Byla nalezena asociace alel HLA II třídy s některými autoimunitními chorobami (*Miyadera et al., 2015; Tomer Y, 2010; van Heemst et al., 2015*) Předpokládá se, že dochází k odchylce imunitní reakce následkem polymorfismu imunokompetentních genů, vazebnou nerovnováhou mezi určitými HLA alelami a mutacemi či rozdíly v kapacitě těchto polymorfních proteinů interagovat s antigenem a TCR v iniciaci imunitní odpovědi. Řada autoimunitních onemocnění, např. RS, diabetes mellitus I. typu či revmatoidní arthritida, je asociována s expresí určitých alel HLA II. třídy a haplotypů. Žádná z těchto chorob však nevykazuje 100 % asociaci s určitým haplotypem, navíc mnoho jedinců s haplotytem asociovanými s nemocí nikdy ne onemocní (*Nussbaum et al., 2001*).

#### **4.2.2 Asociace HLA s roztroušenou sklerózou**

Etiopatogeneze RS není dosud zcela uspokojivě objasněna, předpokládá se vliv genetických a environmentálních faktorů (*Ebers G, 1995*). V současné době je plausibilní teorie genetického nastavení organismu a onemocnění je spuštěno vlivem určitých vnějších faktorů (*Ebers G, 2007*), nelze opomenout také vlivy epigenetické a stochastické (*Sadovnic et al., 2012*).

Mezi vysoce polymorfními HLA alelami je zřejmá vazba, tzv. linkage disequilibrium. Vzhledem k silné vazbě v HLA oblasti je velmi obtížné identifikovat specifickou rizikovou alelu odpovědnou pro RS. Současné studie prokazují, že haplotyp HLA DR2 asociovaný se zvýšeným rizikem rozvoje RS má vyšší vazbu ve srovnání s jinými bělošskými HLA haplotypy v oblasti DR. Linkage disequilibrium bylo pravděpodobně zachováno jako výsledek pozitivní selekce (*Gregersen et al., 2006*).

V rozsáhlých, tzv. genome-wide asocičních studiích (GWAS), provedených v evropské populaci byla prokázána asociace RS s DR2 haplotypem (*Ligers et al., 2001*), který se skládá z HLA-DRA1\*0101- DRB5\*0101- DRB1\*1501- DQA1\*0102- DQB1\*0602, zejména s alelou HLA-DRB1\*1501 (*Lincoln et al., 2005; Prat et al., 2005; Sadovnic 2012; Schmidt et al., 2007; Jersild et al., 1972*) (Obr.12). Nosiči tohoto haplotypu mají trojnásobně zvýšené riziko rozvoje onemocnění, u homozygotů dokonce šestinásobné.



**Obr. 12 Asociace RS s DR2 haplotypem, zejména s alelou HLA-DRB1\*1501**

Zdroj: The International MS Journal, ISSN 1352-8963, Volume 9, Number 3, 2002

Metaanalýzou asociačních studií (GWAS) v souboru 9 772 nemocných a 17 376 kontrolních jedinců v evropské populaci, ve které bylo vyšetřeno 465 434 polymorfizmů, byla potvrzena asociace RS s alelou HLA-DRB1\*1501 se shodnou frekvencí v různých populacích ( $p=1 \times 10^{-320}$ , OR=3.1) (Sawcer *et al.*, 2011). Například Masterman popsal ve švédské populaci její přítomnost v 61 % u RS ve srovnání s 31 % v kontrolním souboru ( $p = 0.0001$ , OR = 3.5). Shodné nálezy byly popsány také ve studiích u jiných etnických skupin, např. v Japonsku nebo v populaci středního východu (Schmidt *et al.*, 2007). Současně byl prokázán protektivní efekt alely HLA-A\*02 ve třídě HLA I. Bylo zjištěno také 29 dalších suspektních genetických polymorfizmů.

Analýzou HLA-DRB1\*15 negativních rodin byla zjištěna alela HLA-A\*0301 v oblasti HLA I třídy asociovaná s rizikem RS. Bylo prokázáno, že zvyšuje riziko RS nezávisle na HLA DRB1\*1501, DQB1\*06 haplotypu ve švédské populaci (Fogdell-Hahn *et al.*, 2000).



V modelu EAE byla zjištěna interakce mezi alelami HLA-DRB1\*1501 a DRB5\*0101 u humanizované myši. Jeví se, že alela DR2b incidenci EAE zvyšuje, zatímco alela DR2a její incidenci snižuje, opoždí nástup a redukuje tíži onemocnění. Koexprese těchto molekul vede k méně těžkému průběhu EAE, což by mohlo být podmíněno linkage disequilibriem mezi těmito dvěma alelami HLA II. třídy. Ačkoli by se mohlo jevit, že pro jedince není výhodné zachování autodestruktivní molekuly DR2b, tyto na druhé straně plní velmi důležitou ochrannou funkci proti infekčním patogenům. Koexprese DR2a a DR2b molekul je pravděpodobně přítomna také u lidí a tyto genetické interakce by mohly ovlivnit riziko rozvoje RS. Výsledky však musí být interpretovány velmi opatrně, neboť pokusy na myších nerepresentují skutečné patofyziologické děje v lidském organismu (Gregersen et al., 2006).

Alely DRB1\*1501, DRB5\*0101 a DQB1\*0602 přispívají k rozvoji RS zvýšením prezentace peptidů myelinu T-lymfocytům. Bylo prokázáno, že TCR pacientů s RS rozpozná rezidua 85–99 myelinového bazického proteinu kódovaného DRB1\*1501 a peptidu viru EBV kódovaného DRB5\*0101, což podporuje teorii molekulárních mimiker (Lang et al., 2002).

Asociace mezi RS a určitými HLA alelami není mezi populacemi shodná. U neevropské populace byla nalezena asociace s odlišnými alelami HLA-DRB1, například ve studii na Sardinii byla zjištěna asociace s alelami HLA-DRB1\*1501, DRB1\*0301 a DRB1\*0405 (Marrosu et al., 1997).

Bylo rovněž nalezeno několik kandidátních genetických polymorfismů v oblasti HLA II-rs3135388, rs2395182, rs2239802, rs2227139, rs2213584 (Sombekke et al., 2009). Genetický polymorfismus rs3135388 je markerem alely HLA-DRB1\*1501, senzitivita činí 96.4 %, specifita 99 % (de Bakker et al., 2006).

Zásadní roli v iniciaci imunitní odpovědi mají lidské leukocytární antigeny (HLA). Jejich význam byl prokázán (Akkad et al., 2015; Lincoln et al., 2005; Prat et al., 2005; Sadovnic 2012; Sawcer et al., 2011; Schmidt et al., 2007), avšak není ještě dostatečně objasněn mechanismus vzájemných interakcí mezi geny HLA a environmentálními faktory, zejména EBV virozou, *herpetickými viry*, retroviry či vitamínem D, které mohou navodit zvýšenou expresi HLA (Burrell et al., 2011; Cree BA, 2014; Handunnetthi et al., 2010; Xiao et al., 2015; De Jager et al., 2008; Sadovnic et al., 2012). HLA geny ovlivňují prezentaci antigenů zmíněných virů a jeví se, že vzájemná interakce může ovlivnit vnímavost jedince k RS. Zvýšená virová zátěž nebo změna prezentace EBV, které zkříženě reagují s buněčnými antigeny, mohou spustit patologický proces prostřednictvím molekulárních mimiker (Niller et al., 2011; Sundström et al., 2009).

Geny mimo oblast HLA se také podílí na rozvoji a progresi onemocnění. Mezi kandidátní geny řadíme geny kódující cytokiny a chemokiny a jejich receptory; kostimulační molekuly-CD37, CD40, CD58, CD80, CD86, CLECL1 a signální molekuly-CBLB, GPR65, MALT1, TYK2.

V současné době jsou známy výsledky několika mezinárodních asociačních studií. Vyšetřením celého genomu u 931 rodin byla prokázána asociace s polymorfizmy genů  $\alpha$  řetězce receptoru pro IL-2 (IL2RA) a  $\alpha$  řetězce receptoru pro IL-7 (IL7RA); IL-2R alfa a IL-7R alfa; kódujících povrchové znaky CD25 a CD127 (*Hafler et al., 2007*), cytokiny a jejich receptory, které mohou ovlivnit zánětlivý proces v RS plakách. Ovlivňují regulaci a přežívání T-lymfocytů a významnou měrou se podílí v patogenezi onemocnění (*Gregory et al., 2007*).

Mezi další rizikové geny řadíme gen CCR5 pro chemokinový receptor, který je lokalizovaný na chromosomu 3p21-24. Jeho mutace 32CCR5, která je přítomna asi u 7 % bělochů, může zpomalit progresi a tíži onemocnění. Gen pro APOE4 je umístěn na chromosomu 3p21-24. Některé mutace mohou navodit agresivnější destrukci tkáně a rychlou progresi postižení. Gen pro osteopontin, který je umístěn na chromosomu 4q21-q25, má funkci chemotaktickou a protizánětlivou. Některé jeho varianty jsou spojeny s vyšším rizikem přechodu do sekundární progresse. Také variabilita genu pro IFN $\gamma$ , lokalizovaného na chromosomu 12q14, je asociována se zvýšeným rizikem rozvoje RS u mužů (*Oksenberg et al., 2005*).

#### **4.2.3 Molekulární mimikry u roztroušené sklerózy**

Většina lidských proteinů je prezentována vyzrávajícím T-buňkám v thymu. Proteiny, které prezentovány nejsou, např. myelinový oligodendrocytární glykoprotein (MOG), se mohou stát autoreaktivními. T-buňky mohou také neadekvátně reagovat s vlastními antigeny, které jsou velmi podobné cizím antigenům-znamé jako zkřížená reaktivita. Autoreaktivní T-buňky nejsou v thymu eliminovány a mohou být dlouhou dobu tolerovány jako buňky prezentující vlastní antigen. Pokud jsou tyto T-buňky aktivované v průběhu infekce nějakým patogenem, který nese antigen podobný antigenu vlastnímu, autoreaktivní T-buňky mohou začít reagovat také s buňkami prezentujícími vlastní antigen. Teorie molekulárních mimikrů byla potvrzena v lidských i zvířecích modelech RS u několika kandidátních molekul - např. viru EBV či HHV 6 (*Tejada-Simon et al., 2003*).

#### 4.2.4 Terapie založená na ovlivnění HLA

Potenciálním cílem budoucí terapie RS je ovlivnění receptorů HLA II třídy v antigen prezentujících buňkách (APCs). Terapie protilátkami blokuujícími HLA receptory a TCR ligandy může zabránit prezentaci antigenu. V klinické praxi se již osvědčila léčba např. glatiramer acetátem, který se váže na HLA molekulu kompetičně s myelinovými antigeny pro prezentaci T-buňkám. Léčba vede k navození tolerance k auto-antigenní iniciaci specifické autoreaktivní T-buněčné delecce.

#### 4.2.5 Souhrn

HLA je komplex molekul, které hrají důležitou roli v prezentaci antigenu. Exprese HLA molekul na APCs umožňuje interakci mezi lidským imunitním systémem a zevním prostředím. Alely HLA II. třídy na chromozomu 6 mají velmi vysoký stupeň polymorfismu, umožňující vytvářet obrovské množství jedinečných HLA receptorů pro prezentaci specifických antigenů. Diversita alel je pravděpodobně pomíněna selekcí navozenou hlavně patogeny. Tento selekční tlak se také uplatnil v zachování určitých haplotypů, kterými jsou určité HLA alely většinou děděné společně – linkage disequilibrium. Důsledkem může být rozvoj autoimunity. Jeví se, že environmentální faktory, zejména infekce, selektují haplotypy, které vedou k rozvoji autoimunitních onemocnění. Interakce mezi T-buňkami a APCs je zásadní v patogeneze RS. Tyto znalosti by mohly být využity pro novou strategii v prevenci a léčbě RS. Porozumění tomuto procesu je v současné době limitované širší znalostí komplexních imunologických interakcí, které se podílí na spuštění autoimunitního procesu a destrukci myelinu. Mohlo by také napomoci nalézt další cílové molekuly pro terapii RS v budoucnosti.

#### 4.2.6 Funkční studie a epigenetické faktory u roztroušené sklerózy

Funkční genetické studie navazují na výsledky rozsáhlých genomových asociačních studií a zabývají se funkcí DNA, RNA transkripty, proteinovými produkty a jejich vzájemnými interakcemi. Hlavními epigenetickými mechanismy jsou acetylace a metylace DNA, metylace histonů a mikroRNA. Transkripce je podporována acylací histonů, jejich deacetylace naopak transkripci tlumí (*Griffiths et al., 2000*), významnými regulátory

transkripce jsou také transkripční faktory. Důležitou roli hrají epigenetické vlivy (*Bos et al., 2016*).

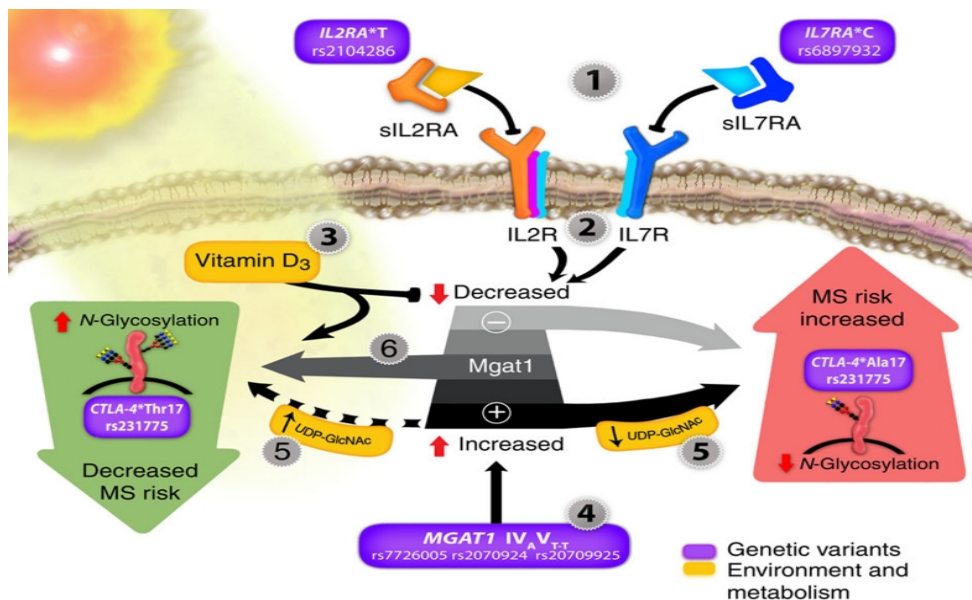
Epigenetické mechanismy vedou k regulaci exprese genů beze změny sekvence příslušné DNA. Tyto změny mohou být dědičné (*Bos et al., 2016*). Mezi nejčastěji popisované abnormality v epigenetických faktorech u autoimunitních onemocnění jsou změny metylace DNA nebo modifikace histonů, které vedou k časoprostorovým změnám regulace genů (*Dang et al., 2001*). Methylace DNA hraje roli v replikaci, rekombinaci a opravě DNA i supresi transponovatelných elementů či retrovirové DNA (*Hashimoto et al., 2010*). Informací, týkajících se epigenetických modifikací u RS zatím není mnoho (*Kaliszewska et al., 2013*). Graves et al. našel signifikantní změny DNA metylace v HLA oblasti u CD4+ T lymfocytů (*Graves et al., 2013*), Bos et al. prokázal nízký stupeň hypermethylace v CD8<sup>+</sup> T lymfocytech (*Bos et al., 2015*). V dosud provedených studiích byl však vyšetřen pouze malý počet pacientů s RS. Měly by být provedeny další, rozsáhlejší studie ve větším souboru nemocných k objasnění významu úlohy metylace u komplexních onemocnění včetně RS.

Jsou studovány také další epigenetické mechanismy, např. vliv mikroRNA. Jejich funkce spočívá v regulaci genové exprese. Molekuly miRNA jsou komplementární k části jedné nebo několika konkrétních mRNA a inhibují translaci nebo navozují degradaci dané mRNA. Při srovnání exprese 365 miRNA v T a B lymfocytech mezi pacienty s RR RS a zdravými kontrolami byla zjištěna zvýšená exprese miR-17-5p v CD4+ lymfocytech u RS pacientů. MiR-17-5p se podílí na progresi autoimunitního procesu ovlivněním vývoje T buněk (*Lindberg et al., 2010*). V longitudinální studii RS pacientů léčených interferonem beta Hecker et al. prokázal v periferních mononukleárech snížení exprese u 29 z 65-ti hodnocených miRNA. Ovlivnění exprese miRNAs by mohlo být využito jako biomarkeru sledování účinnosti terapie interferony u pacientů s RS (*Hecker et al., 2013*).

Další výzkumné práce se zabývají studiem genové exprese s využitím DNA či RNA microarray technologie. Slibnou metodou je RNA či DNA sekvenace. Lossius et al. vyšetřil T cell receptor  $\beta$  CD8+ T lymfocytů z mozkomíšního moku a krve RS pacientů metodou RNA sekvenace. Pomocí této metody byl schopen vytvořit mapu expanse klonů a určit kompartment, kde klony expandují (*Lossius et al., 2014*). Předpokládá se, že využití DNA a RNA sekvenace by mohlo být v budoucnosti přínosné ve studiu patogeneze RS.

V posttranslační modifikaci bílkovin hraje důležitou roli N-glykosylace (Obr.13). Jedná se o enzymatický proces, který probíhá v Golgiho aparátu. Narušení N-glykosylace vede ke zvýšení rizika demyelinizace navozením dysfunkce nejen T-lymfocytů a antigen prezentujících buněk, ale také oligodendrocytů a neuronů (*Mkhikian et al., 2011*). Narušení

tohoto procesu v animálním modelu vedlo k hyperaktivaci T-buněk, aktivaci cytotoxických T-lymfocytů se ztrátou tolerance vůči vlastním antigenům s následným vznikem spontánní zánětlivé demyelinizace (Grigorian *et al.*, 2012). Do regulace N-glykosylace je zapojeno asi 30 genů a jejich variant včetně IL7RA, IL2RA, MGAT1 a CTLA-4, které jsou asociovány se zvýšeným rizikem RS. U nosičů haplotypu (rs7726005, rs2070924 a rs2070925) MGAT1 dochází až k 20% redukci N-glykosylace (Mkhikian *et al.*, 2011). Důležitou roli hraje interakce těchto genů se zevními faktory, zejména vitaminem D. Bylo zjištěno, že deficit vitamínu D v součinnosti s genetickými variantami IL-7RA, IL-2RA, MGAT1 a CTLA-4 může vést k významné dysregulaci procesu N-glykosylace v Golgiho aparátě (Mkhikian *et al.*, 2011).



**Obr. 13 Model environmentální a genetické dysregulace N-glykosylace u roztroušené sklerózy.**  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0/> Copyright © 2011, Nature Publishing Group, a division of Macmillan Publishers Limited. All Rights Reserved.

Genetic variants-genetická variabilita; Enviromnet and metabolism-zevní prostředí a metabolismus; Decreased MS risk-snížení rizika RS; MS risk increased-zvýšení rizika RS; Decreased-snížení; Increased-zvýšení.

### 4.3 Závěr

Etiologie RS je multifaktoriální, zahrnující komplexní interakce mezi geny, epigenetickými a environmentálními faktory. Je velmi pravděpodobné, že riziko spuštění onemocnění je ovlivněno současným působením dvou nebo více zevních faktorů a jejich vzájemnou interakcí.

Data získaná studiem této nemoci v Evropě, USA i Austrálii potvrzují, že prevalence nemoci vzrůstá se zvyšující se zeměpisnou šířkou na severní i jižní polokouli. V současné době je plausibilní hypotéza, že u geneticky predisponovaných jedinců je nemoc spuštěna vlivem environmentálních a epigenetických faktorů. Mezi nejvýznamnější zevní rizikové vlivy řadíme zejména nedostatečnou koncentraci vitamínu D v séru navozenou sníženou expozicí slunečnímu záření; dále herpetické, zejména EBV infekce a kouření.

Úloha vitamínu D je komplexní, neboť Vitamin D3 je významný imunomodulátor. Prostřednictvím VDR navozuje silné antiproliferativní, prodiferenciační a imunomodulační účinky (Munger et al., 2016; Simon et al., 2012). Stimuluje produkci protizánětlivých, tlumí produkci prozánětlivých cytokinů a zvyšuje aktivitu a počet T-regulačních lymfocytů, odpovídajících za navození periferní imunologické tolerance (Cantorna et al., 2015; Joseph et al., 2012; Smolders et al., 2016). Podílí se také na regulaci makrofágů, dendritických buněk či B lymfocytů (Lin et al., 2016). Funkční studie prokázaly, že prostřednictvím VDRE moduluje genovou expresi, čímž může být též vysvětlen vliv kalcitrolu na riziko rozvoje RS (Ramogapalan et al., 2009). Dosud není zcela objasněno, jakým způsobem může EBV navodit rozvoj RS, neboť onemocnění se vyvine pouze u malého procenta infikovaných lidí. Možným mechanismem by mohla být zkřížená reaktivita mezi antigenem EBV a PLP či latentní perzistentní infekce, která stimuluje imunitní odpověď. Byl také prokázán vztah mezi EBV a vitamínem D. Holmøy dokladoval, že buňky napadené EBV exprimují VDR, prostřednictvím kterého může být navozena autoimunita. Touto hypotézou by mohlo být vysvětleno, proč má izolovaný nedostatek vitamínu D či prodělaná viróza EBV pouze malý vliv na rozvoj RS (Holmøy T, 2008).

Současné znalosti o podílu jednotlivých faktorů však nejsou dostatečné. Jsou nutné další studie k získání informací potřebných k objasnění příčinného faktoru, který se na zvýšení rizika RS uplatňuje nejvýznamněji.

## 5 Patofyziologie roztroušené sklerózy

RS je komplexní onemocnění, v jehož patofyziologii se podílí několik procesů, které však nejsou univerzálně zastoupeny u jednotlivých pacientů, proto je klinický obraz a prognóza onemocnění rozdílná (*Hartung et al., 2004*). Zánětlivé postižení CNS je považováno za klíčové pro aktivitu onemocnění a formaci akutních lézí. V těchto aktivních lézích nacházíme aktivované T-lymfocyty, především cytotoxické, aktivovanou mikroglia, makrofágy a plazmatické buňky.

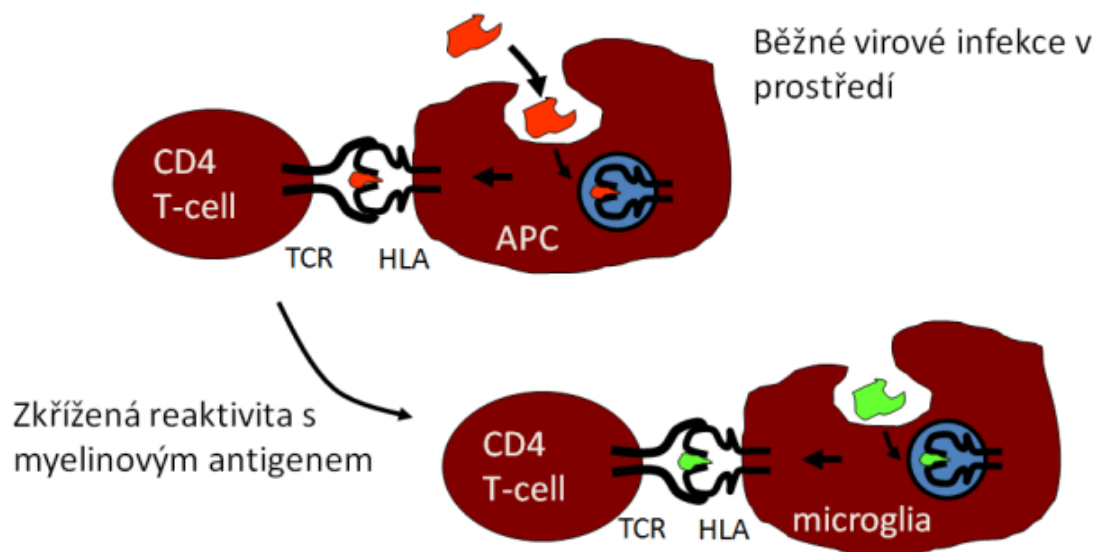
Nositelem imunologické specifity jsou lymfocyty, které jsou schopné svými antigen-specifickými receptory rozpoznat příslušný antigen a zahájit specifickou imunitní reakci. Pokud T-lymfocyt antigen rozpozná, dojde k jeho aktivaci a další diferenciaci s následnou klonální proliferací.

Podle povrchového znaku se T-lymfocyty dělí na CD4+ a CD8+ T lymfocyty. Oba tyto typy se mohou po proběhnutí primární imunitní odpovědi dlouhodobě uchovávat v organismu jako paměťové T-lymfocyty, které zajišťují imunologickou paměť pro specifické patogeny (*Hořejší V, 2009*). Dále rozlišujeme T-regulační lymfocyty, NK-T-lymfocyty a gd T-lymfocyty (<http://www.tcells.org/scientific/gdtcells>).

Lymfocyty nesoucí povrchový znak CD4+ rozdělujeme podle spektra cytokinů, které produkují, na subpopulaci Th-1, Th-2 a Th-17. Th2 buňky produkují protizánětlivé cytokiny (IL-4, IL-10, IL-13, TGF $\beta$ , IL-5, IL-35) a tlumí zánětlivou reakci, naopak Th-1 cytokiny (IL-2, IL-12, IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$ ) a Th17 (IL-17, IL-6, IL-21, IL-22, IL-23, TNF $\alpha$ ) jsou prozánětlivé a jsou považovány za rozhodující v iniciaci a udržování imunopatologické zánětlivé buněčné reakce. Cytokin IL-12 je produkován makrofágy a dendritickými buňkami, které jsou stimulované některými mikroorganismy. Naproti tomu cytokin IL-4 je produkován bazofily a mastocyty. Pokud je proces zahájen na úrovni makrofágů, které produkují IL-12, dojde ke stimulaci Th-1 imunitní odpovědi. Začne-li proces probíhat na úrovni bazofilů nebo mastocytů, které produkují hlavně IL-4, dojde ke stimulaci a další produkci TH2 cytokinů. Aktivace CD4+ lymfocytů vede také k rozvoji T-regulačních buněk produkujících imunopresivní cytokiny, které silně potlačují autoreaktivní imunitní odpověď (*Hořejší V, 2009*). CD8+ T lymfocyty rozpoznávají antigeny prezentované molekulami HLA I. třídy. Aktivované CD8+ lymfocyty vyvíjejí cytotoxické T buňky, které jsou schopné ničit buňky infikované virem nebo jinými intracelulárními mikroby a dysfunkční nebo zničené buňky.

T-lymfocyty svou aktivací zahájí spolupráci také s B-lymfocyty, které se transformují v plazmatické buňky, jež se také významně podílí na destrukci myelinu.

K aktivaci a klonální proliferaci autoagresivních CD4+ T-lymfocytů a cytotoxických CD8+ T-lymfocytů dochází na periférii. Jedná se o autoimunitní odpověď přímo proti CNS antigenům, zejména MBP, myelinovému asociovanému glykoproteinu (MAG), MOG, PLP a sekundárním autoantigenům, u kterých nacházíme podobnou sekvenci aminokyselin jako u některých virů, např. herpetických (Obr. 14).



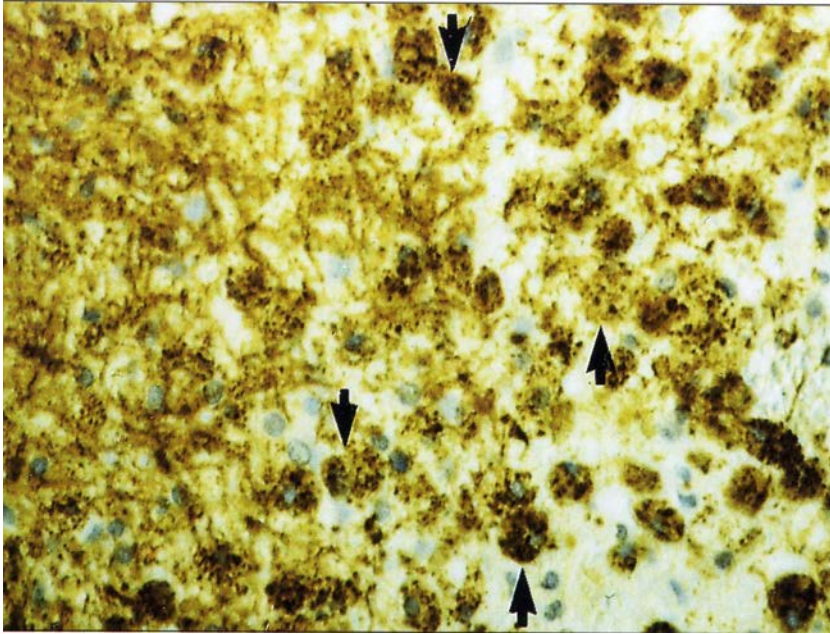
**Obr. 14 Molekulární mimikry u RS**

Zdroj: Multiple Sclerosis: Epidemiology, Genetics and Environmental Factors: [www.msforum.net](http://www.msforum.net).

Tyto T a B-lymfocyty migrují přes HEB do CNS, kde dochází k jejich další klonální proliferaci, atrahují makrofágy, dochází k aktivaci mikroglie, B-lymfocytů, produkci protilátek, zánětlivých mediátorů, chemokinů a cytokinů (Martin *et al.*, 2000) (Obr. 15, 16). V ložisku zánětu dochází k rozpadu myelinu a poškození axonů. Demyelinizované vlákno ztrácí schopnost vedení elektrického vzruchu. Dochází však také k primární axonální degeneraci nezávisle na stupni zánětlivého poškození, jejíž etiopatogeneza není dosud uspokojivě objasněna. (Brück, 2005; Brück, 2007).

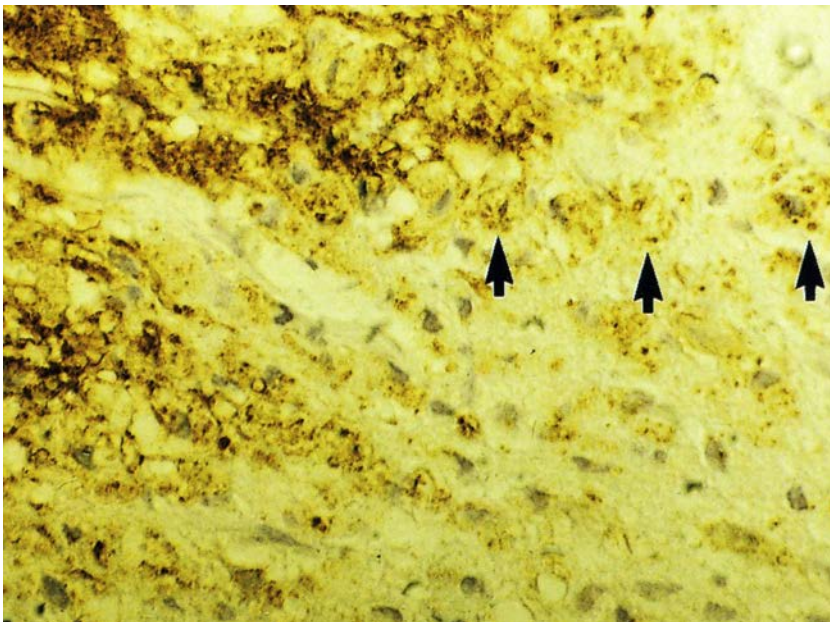
Migrace autoagresivních zánětlivých buněk do CNS přes HEB, která není za normálních okolností propustná pro lymfocyty a další buňky imunitního systému, má zásadní význam pro formování zánětlivých RS lézí (Hartung *et al.*, 2004). Důležitou roli v tomto procesu mají adhezivní molekuly, chemokiny a matrix metalloproteinázy (MMPs) (Bar-Or *et al.*, 2003).





**Obr. 15** Aktivní demyelinizační RS plaka s makrofágy obsahující degradační produkty myelinového oligodendrocytárního glykoproteinu ve své cytoplasmě.

Zdroj: Dr.Wolfgang Brück, Germany



**Obr. 16** Aktivní demyelinizační RS plaka s makrofágy obsahující degradační produkty myelinového bazického proteinu ve své cytoplasmě.

Zdroj: Dr.Wolfgang Brück, Germany

## 6 Matrix metalloproteinázy

### 6.1 Definice

MMPs jsou enzymy, které jsou schopné degradovat většinu proteinových složek základní mezibuněčné hmoty-extracelulární matrix (ECM) (Chandler et al., 1995, Bar-Or et al., 2003). Je známo nejméně 23 MMPs; všechny mají katalytické jádro, které obsahuje na aktivním místě molekulu zinku (*Brinckerhoff and Matrisian, 2002*).

Uplatňují se v remodelaci tkání, účastní se celé řady proteolytických procesů za normálních i patologických stavů. Slouží jako efektor buněčné migrace, cytotoxicity a spolupodílí se téměř na všech procesech ontogeneze (*Bar-Or et al., 2003; Brinckerhoff and Matrisian, 2002*).

V dospělosti je exprese MMPs většinou nízká a jen lokálně zvýšená, např. při tkáňové regeneraci a remodelaci. U různých patologických stavů, např. u zánětlivých procesů, lupusu erythematodes, revmatoidní artritidy, kardiovaskulárních, plicních onemocnění, kožních, systémové sklerózy pak dochází jejich zvýšené produkci (Ram et al., 2006). U nádorových procesů hraje významnou roli porušení bazální membrány a intersticiální ECM, vedoucí k růstu tumorů a metastázám (*Egeblad and Werb, 2002*).

### 6.2 Rozdělení MMPs

MMPs dělíme podle struktury a substrátové specifity do pěti základních skupin (*Tab. 5*). Poprvé byla popsána intersticiální kolagenaza (MMP-1) v roce 1962, která se podílí na resorpci kolagenu. MMPs štěpí většinu komponent ECM (fibronektin, myelinový protein, vitronektin, laminin, tenascin, agrekan a jiné) a také kolagen typu I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XIV. Kromě vazivové tkáně a složek ECM selektivně štěpí také inhibitory proteináz, např.  $\alpha$ 1-inhibitor proteináz,  $\alpha$ 2-makroglobulin a antitrombin III a růstové faktory, např. IL-1alfa a TNF-alfa. Jednotlivé MMPs jsou vůči těmto substrátům různě aktivní (*Emdbiosciences.com*).

Aktivita MMPs je regulována na několika úrovních a kontrolována endogenními inhibitory-tkáňovými inhibitory metalloproteináz (TIMPs). Jsou známy čtyři různé tkáňové inhibitory-TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 a TIMP-4. Tyto proteiny se váží nekovalentně k aktivovaným MMPs a blokují jejich aktivitu (*Birkedal-Hansen et al., 1993*).

**Tab. 5 Rozdělení MMPs podle struktury a substrátové specifity do skupin**

<b>Kolagenázy</b>	MMP-1, MMP-8, MMP-13 a MMP-18, štěpí intersticiální-fibrilární kolagen a kolagen typu I, II, III, VI, X.
<b>Gelatinázy</b>	gelatináza A (MMP-2) a gelatináza B (MMP-9). Štěpí bazální nefibrilární membránu, kolagen typu IV, laminin a fibronectin, které jsou hlavními složkami bazální membrány mozkových cév.
<b>Stromelysin</b>	MMP-3, MMP-10 a MMP-11 štěpí celou řadu makromolekul, např. fibronectin, laminin, kolagen typu IV, V, alfa-1 inhibitor proteázy.
<b>Membránový typ MMPs</b>	MMP-14, MMP-15, MMP-16, MMP-17, MMP-24 a MMP-25. Obsahují transmembránovou a furinovou vazebnou doménu a aktivují MMP-2.
<b>Matrilysin</b>	MMP-7 a MMP-26. Je složen pouze z propeptidové oblasti a katalytické domény, degraduje většinu složek ECM. Štěpí fibronectin, laminin, vitronectin, kolagen typu IV, fibrinogen a aktivuje MMP-9.

### 6.2.1 Matrix metalloproteináza-9 a matrix metalloproteináza-2

Řadíme je mezi gelatinázy, neboť štěpí gelatin a kolagen typu IV. Je exprimována různými typy buněk-lymfocyty, monocyty, makrofágy, polymorfonukleárními leukocyty, endoteliálními buňkami, keratinocyty, mnoha maligními a transformovanými buňkami (*Salo et al., 1991, Birkedal-Hansen et al., 1993*). Její exprese a aktivita je regulována na různých úrovních: genové transkripce, translace, syntéze, sekrece, aktivace, inhibice a glykosylace (*Ram et al., 2006*). Je stimulována působením cytokinů, chemokinů a růstovými faktory (*Salo et al., 1991*). MMP-9 je secernována jako proenzym, který je následně aktivován proteázami, aktivovanými neutrofily a MMP-2. Její aktivita je inhibována nejen specifickým tkáňovým inhibitorem TIMP-1, ale též nespecifickými inhibitory, například alfa-2 makroglobulinem (*Ram et al., 2006*).

Degraduje kolagen typu IV, který je hlavní součástí bazální membrány (*Seltzer et al., 1989*). Tím je umožněn průnik T-lymfocytů a dalších imunitních buněk do poškozených nebo

okolních tkání. Je pravděpodobné, že v důsledku štěpení může dojít ke vzniku neo-epitopů, které navozují další imunitní odpověď a progresi onemocnění (Ram et al., 2006).

MMP-9 ovlivňuje řadu patologických procesů u autoimunitních onemocnění - např. roztroušené sklerózy, systémového lupusu, revmatoidní artritidy, Sjögrenov syndromu, systémové skleróze, polymyositidě a arterioskleróze.

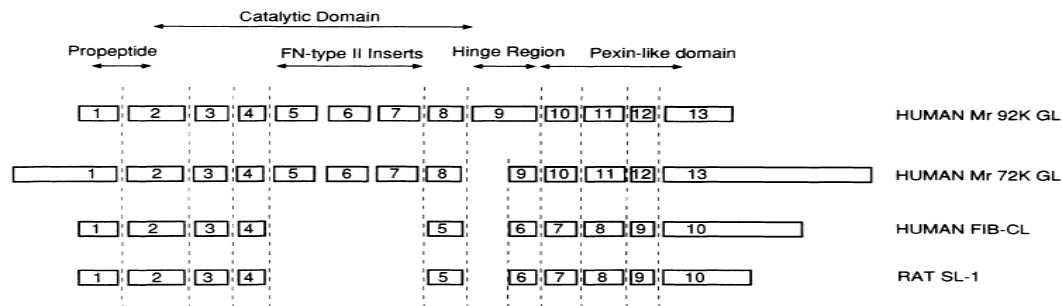
Byla nalezena ve fibroblastech kůže, keratinocytech, chondrocytech, endoteliálních buňkách, monocytech, lymfocytech, osteoblastech a v mnoha dalších normálních i transformovaných buňkách (Seltzer et al., 1981; Salo et al., 1991). Obě gelatinázy mají podobné vlastnosti, zejména vysokou afinitu ke gelatinu a účastní se také biologické degradace bazálních membrán (Seltzer et al., 1989). Exprese MMP-2 je často spojena s růstem invazivních a metastazujících tumorů (Liotta et al., 1979). Gelatinázy se liší vazbou proenzymů na tkáňové inhibitory. Proenzym MMP-9 se váže na TIMP-1, zatímco proenzym MMP-2 na tkáňový inhibitor metalloproteinázy-2 (TIMP-2) (Goldberg et al., 1989).

### 6.3 Struktura genů pro MMPs

Gen pro MMP-9 o velikosti (26-27 kbp) je lokalizován na dlouhém raménku 20. chromozomu (20q11.2-13.1). Obsahuje tři exony s 13 kódujícími oblastmi, jejichž transkripcí vzniká 92kDa protein MMP-9, označovaný jako gelatináza B (Huhtala et al., 1990 a; Huhtala et al., 1991). Transkripce genu pro MMP-9 je regulována růstovými faktory a cytokiny.

Gen pro MMP-2 je lokalizován na dlouhém raménku 16. chromozomu (16q13) a čítá 17 kb s 12- ti introny a 13 kódujícími oblastmi, jejichž transkripcí vzniká 72kDa protein MMP-2, označovaný jako gelatináza A (Huhtala et al., 1990 b). Transkripce genu pro MMP-2. Transkripce genů pro MMPs vzniká messenger-ribonukleová kyselina (mRNA), která je v buněčném prostředí relativně stabilní, poločas rozpadu se pohybuje v rozmezí 12 až 150 hodin (Brinckerhoff et al., 1986).

Gen pro TIMP-1 se nachází na chromozomu X11p11.23- p11.4. Jeho exprese je stimulována celou řadou mediátorů, např. TNF- $\alpha$ , interleukinem-1 (IL-1), estery formolu, retinoidy a glukokortikoidy (Clark et al., 1987). Gen pro TIMP-2 je lokalizovaný na 17q23-q25 chromozomu (Huebner et al., 1986), jeho transkripce je snížena působením TGF (Stetler-Stevenson et al., 1990). Struktura genů pro MMPs je zobrazena na Obr. 17.



**Obr. 17** Struktura exonu lidské 92K GL (MMP-9), 72K GL (MMP-2), FIB-CL (fibroblast-type kolagenázy) a rat SL-1 (stromelysinu-1)

Zdroj: Převzato od Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K: J Biol Chem 1991; 266:16485-90.  
Human-Lidský; Rat-Krysa

## 6.4 MMPs u roztroušené sklerózy

Nízká nebo nedetekovatelná hladina MMPs je přítomna v CNS i za normálních okolností, ke zvýšení její hladiny dochází při různém postižení CNS (*Bar-Or et al., 2003*). U RS se podílí na rozrušení HEB a tím umožňují migraci aktivovaných T-lymfocytů, zánětlivých buněk, plazmatických proteinů, autoprotilátek a komplementu do CNS a infiltraci lézí (*Martin et al., 2000*). V CNS ničí MBP (*Proost et al., 1993; Chandler et al., 1995; Leppert et al., 1998; Ram et al., 2006*). Bylo prokázáno, že MMP-9, MMP-2, SL-1, intersticiální kolagenáza a matrilysin štěpí MBP in vitro (*Proost et al., 1993; Chandler et al., 1995*). Navíc uvnitř CNS tumor necrosis factor alfa konvertující enzym (TACE), membránově vázaná disintegrin metalloproteináza (ADAM-17) je schopna transformovat membránově vázaný prekursor TNF-alfa do jeho vyvrálé, biologicky aktivní formy (*Black et al., 1997; Moss et al., 1997*). Tento zánětlivý cytokin je toxický pro oligodendrocyty (*Hartung 1996; Soliven and Szuchet, 1995; Yuschenko et al., 2003; Ram et al., 2006*).

Dosud není jasné, které MMPs hrají hlavní roli v imunopatogeneze RS (*Bar-Or et al., 2003*). V mozkové tkáni, mozkomíšním moku a séru nemocných s RS bylo popsáno zvýšení MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-9 a MMP-12 (*Anthony et al., 1997; Vos et al., 2003; Kurzepa et al., 2005*). MMPs jsou produkovány širokým spektrem buněk (*Chandler et al., 1995; Bar-Or et al., 2003*). Klíčovou roli hrají pravděpodobně MMPs exprimované v T-lymfocytech a monocytech. Bylo prokázáno, že T-lymfocyty a makrofágy produkují gelatinázy, MMP-2 a MMP-9 (*Welgus et al., 1990; Leppert et al., 1995*). Bylo zjištěno, že migrační kapacita Th buněk izolovaných z periferní krve je závislá na přítomnosti gelatináz.

Th1 buňky, které mají vyšší migrační schopnost než Th2 buňky, produkují větší množství gelatinázy B (MMP-9) a gelatinázy A (MMP-2) (*Abraham et al., 2005*) než Th2 buňky. Monocyty migrují rychleji přes HEB než T a B lymfocyty. V CNS se transformují na makrofágy a mikroglie, které tvoří hlavní skupinu zánětlivých buněk v aktivních demyelinizačních plakách a jejich počet převažuje až 10x nad lymfocyty (*Bar-Or et al., 2003*). Byla nalezena zvýšená exprese MMP-2, MMP-14 a TIMP-2 monocyty u pacientů s RS ve srovnání se zdravými jedinci (*Bar-Or et al., 2003*). Astrocyty a mikroglie mohou být též stimulovány k produkci gelatináz, stejně jako jiných MMPs, například stromelysinu (*Leppert et al., 1998*).

Řada současných studií se zabývá vztahem mezi hladinami MMPs v séru a mozkomíšním moku u RS a také průběhem a aktivitou onemocnění. Byla prokázána zvýšená hladina MMP-9 v séru nemocných s RS ve srovnání se zdravými jedinci (*Abraham et al., 2005; Goodin et al., 2002; Lindberg et al., 2001; Leppert et al., 1998; Waubant et al., 2003*). Bylo zjištěno, že aktivita některých MMPs koreluje s průběhem onemocnění (*Bar-Or et al., 2003; Lindberg et al., 2001*). U RR RS byla prokázána zvýšená hladina MMP-9 a MMP-9/TIMP-1 ratio v séru (*Avolio et al., 2003*). Bylo zjištěno, že hladina MMP-9 v séru koreluje s počtem gadolinium-enhancement lézí (*Lee et al., 1999; Goodin et al., 2002*) a předpokládá se, že je prediktivním ukazatelem aktivity nemoci (*Waubant et al., 2003*). Zvýšená hladina MMP-9 v mozkomíšním moku byla nalezena u všech pacientů s RRRS, ale pouze u 57 % pacientů s PPRS (*Leppert et al., 1998*).

Nálezy týkající se MMP-2 jako potenciálního biologického markeru aktivity a průběhu onemocnění jsou rozporné. Byla nalezena zvýšená hladina MMP-2 v séru u PPRS a zvýšení poměru MMP-2/TIMP-2 u SP RS a PP RS v souboru 42 nemocných (*Avolio et al., 2003*). Galboiz však popsal zvýšenou expresi MMP-2 mRNA u RRRS v souboru 16 nemocných ve srovnání s nálezem u 12 nemocných s SP RS (*Galboiz et al., 2001*). Studie, které by se zabývaly vztahem mezi hladinami MMP-9, MMP-2 a jejich inhibitorů v séru, stupněm postižení a tíží onemocnění, dosud nebyly provedeny.

Expese a aktivita MMPs je regulována na různých úrovních (*Yuschenko et al., 2003*): genové expese, aktivace proenzymu, sekrece enzymu, je inhibována specificky tkáňovými inhibitory a nespecificky alfa-2 makroglobulinem. Dochází ke zvýšené expresi genů kódujících tyto proteiny. Mutace těchto genů pravděpodobně ovlivňuje stupeň expese, stabilitu mRNA a vlastnosti daných proteinů, což může ovlivnit etiopatogenezi procesu.

Mezi kandidátní geny, u kterých předpokládáme účast v patofyziologii RS, řadíme geny pro MMP-9, MMP-2, TIMP-1 a TIMP-2. Dosud bylo provedeno pouze několik

asociačních studií, zabývajících se vztahem genetických polymorfismů lokalizovaných v genu pro MMP-9 s RS (*Fiotti et al., 2004; Nelissen et al., 2000; Nelissen et al., 2002; Živkovič et al., 2007*). Polymorfismy -1562 C/T a R279Q v genu pro MMP-9 mají v populaci frekvenci vyšší než 5 % a bylo zjištěno, že polymorfismus -1562 C/T v promotorové oblasti genu MMP-9 je asociován se zvýšenou expresí MMP-9 (*Zhang et al., 1999*). U MMP2 bylo popsáno několik polymorfismů v promotorové oblasti genu (*Vašků et al., 2004, Zhang et al., 1999*). Jedná se o polymorfismy MMP-2 (-168 G/T, -735 C/T, -1306 C/T, -1575 G/A). Polymorfismus -1306 C/T je asociován se změnou promotorové aktivity, kterou silně snižuje alela T následkem přerušení Sp1-vazebného místa (*Zhou et al., 2004*). Polymorfismy TIMP-2 (+853 G/A a -418 G/C) jsou kódovány genem lokalizovaným na chromozomu X 17q23-q25. První se nachází na 3. exonu, druhý G/C nukleotid na pozici -418 promotorové oblasti. Byla zjištěna asociace polymorfismu (+853 G/A) s těžkou chronickou obstrukční chorobou bronchopulmonální a s výskytem aneurysmat břišní aorty (*Hirano et al., 2001; Wang et al., 1999*). Asociační studie zabývající se vztahem genetických polymorfismů lokalizovaných v genu pro MMP-2 a TIMP-2 s RS nebyly dosud provedeny.

## 7 Klinická manifestace roztroušené sklerózy

Onemocnění se nejčastěji klinicky manifestuje akutně vzniklými neurologickými příznaky, které jsou podmíněny vzplanutím zánětu v CNS. Jde se o tzv. ataku, neboli relaps. Ataka je definována vznikem nových nebo zhoršením stávajících symptomů, které trvají 24 hodin a více, bez současné koincidence s infekčním onemocněním či teploty. Po několika týdnech následně dochází ke zlepšení klinického postižení. Může být úplné, většinou však přetrvává určitý stupeň neurologického deficitu. Po proběhlé atace následuje různě dlouhé období remise bez nových klinických příznaků, které může trvat i několik let (*McDonald et al., 2001*). První ataku onemocnění je nazývána klinicky izolovaný syndrom (CIS). Při rozvoji další ataky dojde ke konverzi do klinicky jisté RS (CDMS). Mc Donaldova kritéria definují další podmínky, které umožňují stanovení diagnózy RS již po první atace klinických příznaků v případě, že jsou splněna kritéria paraklinická (abnormity specifické pro RS na MR či výsledky analýzy mozkomíšního moku). Onemocnění asi u 85 % nemocných probíhá jako relaps-remitentní RS (**RR RS**) (*Achiron A, 2004*), která je charakterizována střídáním klinických atak, po kterých následuje různě dlouhé období remise. V období remise neurologický deficit nenarůstá. V ložisku zánětu však postupně během let dochází k

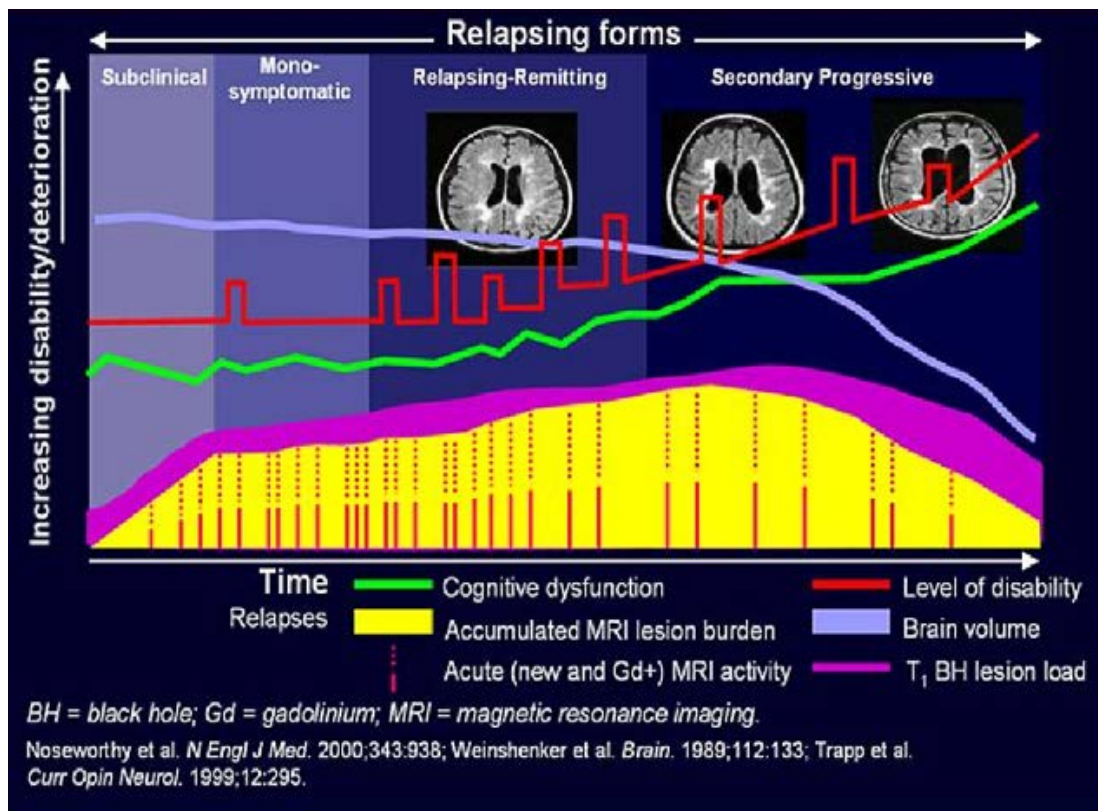
demyelinizaci a v různé míře i k postižení axonů. Ve chvíli, kdy dojde k vyčerpání rezervní kapacity CNS, dochází k ireverzibilnímu neurologickému postižení. Onemocnění proto u velké části RR RS pacientů (8 z 10-ti) přechází během 10–15 let do sekundárně chronicko-progresivní formy (**SP RS**) s inkompletní úzdravou po každé atace a pozvolna narůstá tíže klinického postižení a stupeň invalidity (Obr. 18).

Mezi velmi časté první příznaky onemocnění řadíme optickou neuritidu, motorické parézy a senzitivní příznaky. Dochází také k postižení ostatních hlavových nervů, setkáváme se s periferní parézou lícního nervu, internukleární oftalmoplegií či neuralgií trigeminu. Mezi další frekventní symptomy, se kterými se u nemocných s RS setkáváme je postižení mozečku. Pokud je plaka lokalizovaná v podkorové oblasti, může navodit také epileptický paroxysmus. Velmi obtěžující jsou poruchy sfinkterových funkcí charakteru – imperativní mikce, retence či inkontinence a jejich kombinacemi. Asi 60 % mužů trpí v průběhu RS erektilní dysfunkcí. Dalším příznakem, který velmi limituje práceschopnost a později i schopnost sebeobsluhy nemocných je patologická únava, která je přítomna asi u 85 % pacientů. K těmto projevům se přidávají psychické problémy, zejména deprese, rozmrzelost, emoční labilita, méně často euforie, poruchy paměti a soustředění (*Hartung et al., 2004*).

Asi u 10 % pacientů dochází od počátku choroby k pozvolnému, kumulativnímu zhoršování klinického stavu bez přítomnosti atak. Jedná se o primárně progresivní RS (**PP RS**) (*Achiron A, 2004*). Asi u 3 % pacientů může mít onemocnění velmi agresivní průběh s těžkými relapsy s nedostatečnou úpravou a rychlým rozvojem neurologického deficitu, jde o relabující progresivní RS. Zřídka může nemoc probíhat benigně a nedochází k rozvoji atak či nárůstu invalidity ani po mnoha letech. V současné době však bohužel neexistují žádné biomarkery, které by umožnily tento průběh prospektivně stanovit.

Nejvíce používanou škálou objektivního hodnocení klinického stavu je Kurtzkeho stupnice postižení (Expanded Disability Status Scale), známá též jako EDSS či Kurtzkeho škála (*Kurtzke JF, 1983*). Kvantifikuje tíži postižení těchto funkčních systémů: zraku, motoriky, kmenových, mozečkových, senzitivních funkcí, sfinkterů a zahrnuje také orientační hodnocení kognitivního postižení a únavy.





**Obr. 18** Klinický průběh roztroušené sklerózy

Zdroj: *Curr Opin Neurol.* 1999; 12:295.

Time-čas; Relapses-ataky; Cognitive dysfunction-kognitivní dysfunkce; Accumulated MRI lesion Burden-kumulace MR lézí; Acute (new and GD+) MRI activity-akutní (nová a GD+MRI aktivita); Level of Disability-stupeň postižení; Brain volume-mozkový objem; T<sub>1</sub>, BH lesion load- T<sub>1</sub> objem lézí, BH (Black hole)-černá díra; GD-gadolinium; MRI-zobrazení magnetickou rezonancí.

## 8 Diagnostická kritéria roztroušené sklerózy

Do roku 2001 byla používána v diagnostice RS Poserova a pozdější Schumacherova kritéria. Po zavedení magnetické rezonance (MR) do klinické praxe byla definována kritéria McDonaldova (*McDonald et al., 2001*). Byla vytvořena v roce 2001 na základě doporučení mezinárodního konsenzu ve spolupráci s americkou National Multiple Sclerosis Society (NMSS). Tato kritéria ulehčují diagnostiku využitím pokroku v technikách MR (Obr. 17). McDonaldova kritéria byla revidována v roce 2005, 2010 (*Polman et al., 2005; Polman et al., 2011*). Poslední revize byla provedena v roce 2017 (*Thompson et al., 2018*) (Tab. 6). Pomocí MR je možné hodnotit diseminaci onemocnění v prostoru a čase. Longitudinální sledování MR nálezů umožňuje průkaz nových, subklinických lézí i při absenci klinické ataky a tím naplnění diagnostických kritérií diseminace v prostoru či čase (Tab. 7). Význam MR vyšetření ale nelze nadhodnotit, diagnostika onemocnění musí být komplexní a založena zejména na hodnocení klinického stavu, historie onemocnění, zobrazovacím vyšetření, vyšetření mozkomíšního moku, evokovaných potenciálů a dalších. Pozitivní nález demyelinizačních změn na MR může být totiž v některých případech prokázán i bez přítomnosti klinických známek choroby, tj. přítomnosti relapsů nebo progresivního neurologického postižení. Další pomocná vyšetření, např. Již zmíněné evokované potenciály nebo vyšetření likvoru poskytují podrobnější informace o probíhajícím zánětlivém procesu v CNS. Stávající kritéria bohužel neumožňují stanovit diagnózu v případě, že se jedná o pravděpodobné onemocnění. Longitudinální studie, které by sledovaly vývoj nemoci u tohoto typu pacientů nebyly dosud provedeny.

**Tab. 6 Diagnostická kritéria roztroušené sklerózy: revidovaná McDonaldova diagnostická kritéria z roku 2017.**

<b>Klinická kritéria (ataky)</b>	<b>Objektivní (léze)</b>	<b>Další údaje potřebné ke stanovení DG</b>
2 nebo více	Objektivní klinický průkaz $\geq 2$ lézí	Žádné. Klinická symptomatika stačí; další doklady jsou žádoucí, musí být v souladu s RS
2 nebo více	Objektivní klinický průkaz 1 léze s jasným anamnestickým průkazem předchozí ataky v rozdílné anatomické lokalizaci	Žádné. Klinická symptomatika stačí; další doklady jsou žádoucí, musí být v souladu s RS
2 nebo více	Objektivní klinický průkaz 1 léze	Diseminace v prostoru (další klinická ataka v jiné lokalizaci CNS nebo aktivita na MR)
1	Objektivní klinický průkaz $\geq 2$ lézí	Diseminace v čase (další klinická ataka nebo aktivita na MR nebo přítomnost specifických OP pásů v mozkomíšním moku)
1	Objektivní klinický průkaz 1 léze	Diseminace v prostoru (další klinická ataka v jiné lokalizaci CNS nebo aktivita na MR) a diseminace v čase (další klinická ataka nebo aktivita na MR nebo přítomnost specifických OP pásů v mozkomíšním moku)
0 (progrese od počátku)	Rok progrese nemoci nezávisle na klinické atace (retrospektivně nebo prospektivně)	A nejméně dvě následující kritéria. -Jedna nebo více T2-hyperintenzních lézí charakteristických pro roztroušenou sklerózu v jedné nebo více oblastí mozku: periventrikulárně, kortikálně nebo juxtakortikálně, nebo infratentoriálně -Dvě nebo více hyperintenzních lézí v míše -Přítomnost oligoklonálních pásů v mozkomíšním moku

### Tab. 7 Revidovaná McDonaldova diagnostická kritéria (2017)

#### MR kritéria diseminace v prostoru a čase

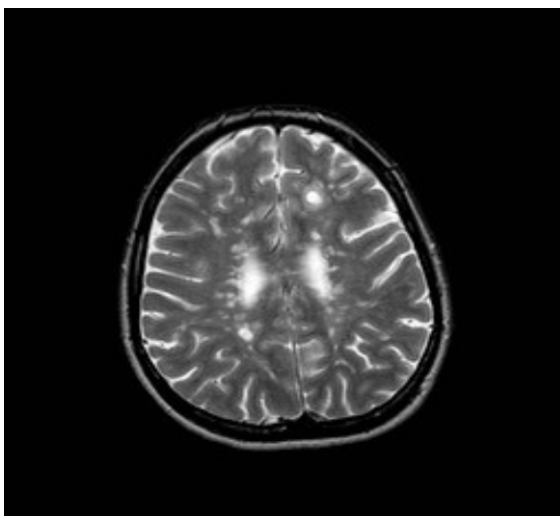
Průkaz diseminace lézí v prostoru (DIS)

$\geq 1$  T2 hyperintenzní léze charakteristické pro roztroušenou sklerózu nejméně ve dvou ze čtyř oblastí CNS; periventrikulární, kortikální či juxtakortikální, infratenoriální nebo míšní.

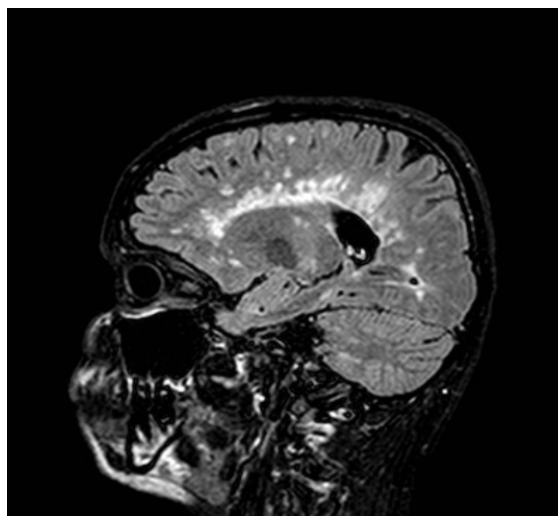
Průkaz diseminace lézí v čase (DIT)

Současná přítomnost lézí sytících se gadoliniem a nesytících se lézí v jakoukoli dobu nebo nová T2-hyperintenzní či léze sytící se gadoliniem na následné MR ve srovnání s předchozím vyšetřením nezávisle na načasování prvního skenu.

Na rozdíl od McDonaldových kritérií z roku 2010 nejsou rozlišovány symptomatické a asymptomatické MR léze.



a)



b)

**Obr. 19 Pacientka s pokročilým demyelinizačním postižením s typickým obrazem mnohočetných periventrikulárních ložisek. a) T2 obraz, b) Flair-Dawsonovy prsty.**

Zdroj: Snímky magnetické rezonance poskytl MUDr. Miloš Keřkovský, Ph.D., Radiologická klinika FN Brno.

## Výzkumné práce

### 1 Cíle práce

#### 1.1 Genetická studie

1. Analýza genetických polymorfismů v kandidátních genech, stanovení frekvence alel a genotypové distribuce ve studovaném souboru.
  - a) Polymorfismu rs3135388 v genu pro HLA-DRB1\*1501
  - b) Polymorfismů (-1562C/T, R+279Q) lokalizovaných v kandidátním genu pro MMP-9
  - c) Polymorfismů (-1306C/T, -1575G/A, -168G/T, -735C/T) lokalizovaných v kandidátním genu pro MMP-2
  - d) Polymorfismu +853G/A v genu pro TIMP-2
  - e) Polymorfismu rs6897932 v genu pro IL7RA
  - f) Polymorfismů rs4516035, rs2228570, rs731236, rs7975232, rs1544410 v genu pro VDR
  - g) Polymorfismů (-6) A/G a M235T v genu pro ATG a ACE I/D
2. Určit asociační vztah genetických polymorfismů lokalizovaných v kandidátních genech s vnímavostí k RS.
3. Nalézt možné rozdíly mezi pohlavími ve vnímavosti k RS.
4. Zjistit, zda tyto kandidátní genetické polymorfismy ovlivňují tíži a průběh onemocnění a stupeň postižení.
5. Zjistit potenciální interakci mezi genetickými polymorfismy rs4516035 a rs3135388

#### 1.2 Studie hladin enzymů

Stanovení hladin enzymů MMP-9, MMP-2 a jejich tkáňových inhibitorů-TIMP-1 a TIMP-2 v séru a zhodnotit jejich vztah ke klinickému průběhu, stupni postižení a tíži onemocnění.

### 1.3 HYPOTÉZA

V současnosti nejsou k dispozici dostatečně spolehlivé biomarkery, které by umožňovaly zjistit vnímavost daného jedince k rozvoji RS, diagnostické a prediktivní markery další progrese onemocnění ani individuální odpovědosti na terapii. Nejsou také dostatečně objasněny faktory, které podmiňují zvýšenou vnímavost žen k onemocnění. Zjištění rizikových genetických polymorfismů může poskytnout důležité informace o patogeneze onemocnění a nalézt jednotlivce se zvýšeným rizikem. Slibnými kandidáty jsou geny a jejich varianty, tzv. polymorfismy, které se významně podílí v imunopatogenezi onemocnění a podstatně přispívají k interindividuálním rozdílům. Jedná se zejména o variabilitu genů, které kódují proteiny autoimunitního zánětlivého procesu; enzymů, které se podílí na zvýšení propustnosti HEB pro zánětlivé buňky a variabilitu genu pro vitamin D. V naší práci jsme vyšetřili genetické polymorfismy těchto kandidátních genů: HLA-RB1\*1501, VDR, IL7RA, MMP-9, MMP-2, TIMP-2 a ATG.

Zásadní roli v iniciaci imunitní odpovědi má HLA (Akkad et al., 2015; *Lincoln et al., 2005; Prat et al., 2005; Sadovnic 2012; Sawcer et al., 2011; Schmidt et al., 2007*). Zaměřili jsme se na vyšetření variability funkčního genetického polymorfismu rs3135388, který vysoce koreluje s alelou HLA DRB1\*1501 (korelační koeficient  $r(2) > 0.94$ ) (*Goris et al., 2008*). Tato alela se spolu s alelami DRB5\*0101 a DQB1\*0602 významně podílí na zvýšení predispozice rozvoje nemoci zvýšením prezentace peptidů myelinu T-lymfocytům a antigenů některých herpetických virů, zejména EBV (*Alcina et al., 2012; Smith et al., 1998*). Důležitou roli hraje také vzájemná interakce alely HLA DRB1\*1501 s vitaminem D.

Vitamin D je velmi důležitým environmentálním faktorem, který prostřednictvím VDR navozuje silné antiproliferativní, prodiferenciační a imunomodulační účinky (*Munger et al., 2006; Munger et al., 2014; Simon et al., 2012*). Je exprimovaný T- buňkami a APCs a je tak zapojený do regulace imunitního systému (*Cantorna et al., 2015; Correale et al., 2009; Joseph et al., 2012; Mahon et al., 2003; Royal et al., 2009; Smolders et al. 2009*). VDR po své aktivaci slouží také jako transkripční faktor regulující expresi více než devíti set 1.25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub> responzivních genů (*Kongsbak et al., 2013; Wang et al., 2005*) včetně HLA-DRB1\*15 (*Agliardi et al., 2011, Ramagopalan et al., 2009*). Zaměřili jsme se proto na vyšetření funkčního promotorového genetického polymorfismu rs4516035 v genu pro VDR, který nebyl dosud v souvislosti s RS studován. Snažili jsme se zjistit, jestli existuje vzájemná vazba mezi alelami rs3135388 a rs4516035 ve vztahu k RS.

Dalším důležitým patofyziologickým procesem, který podmiňuje rozvoj a progresi onemocnění je porušení HEB, umožňující přestup zánětlivých buněk do CNS. Zde se významně uplatňují MMPs (*Bar-Or et al., 2003; Larochelle et al., 2011; Mirshafiey et al., 2014*). Jedná se zejména o MMP-9 a MMP-2, jejichž exprese byla prokázána v T-lymfocytech, B-lymfocytech a monocytech, které jsou hlavní populací zánětlivých buněk v aktivních demyelinizačních plakách, v chronických lézích pak převažuje aktivovaná mikroglie a B-lymfocytární subpiální folikulární infiltrace, která podmiňuje chronický zánět a progresi onemocnění (*Aung et al., 2015; Bar-Or et al., 2003; Kurzepa et al., 2005; Könncke et al., 2013; Magliozzi et al.*). Jejich exprese v CNS, hladina v séru a mozkomíšním moku kolísá v závislosti na aktivitě, průběhu onemocnění a je ovlivněna léčbou (*Goodin et al., 2002; Mirshafiey et al., 2014; Shimizu et al., 2014; Waubant et al., 2003*). Vyšetřili jsme proto jednak hladiny MMPs v séru a genetické polymorfismy -1562 C/T, R+279Q lokalizované v kandidátním genu pro MMP-9; jako první polymorfismy -1306C/T, -1575G/A, -168G/T, -735C/T lokalizované v kandidátním genu pro MMP-2; a jako jediní také polymorfismus +853G/A v genu pro TIMP-2.

Důležitou roli v procesu regulace propustnosti cévní a HEB, aktivace infiltrujících imunokompetentních buněk, exprese prozánětlivých a prooxidačních genů, zesílení fagocytární aktivity u makrofágů hraje také angioenzinogen (ATG) a angiotensin konvertující enzym (ACE) (*Hammack et al., 2004; Stoop et al., 2009; Wosik et al., 2007*). Proto jsme se zabývali genetickým aspektem dané problematiky a vyšetřili jsme jako první dva funkční polymorfismy v genu pro ATG; (-6) A/G v promotorové oblasti genu a M235T v exonu a ACE I/D. ATG může ovlivnit onemocnění pravděpodobně aktivací zánětlivého procesu (*Platten et al., 2009*).

Na progresi vlastního zánětlivého procesu se významnou měrou podílí prozánětlivé cytokiny, mezi které patří IL-7 (*Šterzl et al., 2005; Hořejší et al., 2009*). Vyšetřili jsme funkční genetický polymorfismus rs6897932 v genu IL7RA, který kóduje povrchový znak CD127 receptoru IL-7 (*Gregory et al., 2007*). Ovlivňuje regulaci a vývoj lymfocytů, podporuje proliferaci, diferenciaci a přežívání naivních T buněk, včetně regulačních a B buněk. IL7RA je spolu s některými dalšími geny zapojen také do procesu enzymatického procesu N-glykosylace, jehož narušení vede k aktivaci cytotoxických T-lymfocytů se ztrátou tolerance pro vlastní antigeny. Významnou měrou se tak podílí v patogenezi onemocnění a progresi zánětlivého procesu v RS plakách (*Gregory et al., 2007; Mjkikian et al., 2011; Jäger et al., 2013*).

Předpokládáme, že bychom mohli nalézt asociační vztah výše uvedených kandidátních genetických polymorfismů s RS a prokázat možné rozdíly mezi pohlavími ve vnímavosti k rozvoji nemoci, neboť RS jako všechna ostatní autoimunitní onemocnění se častěji vyskytuje u žen. Věříme, že se nám podaří nalézt parametry umožňující posoudit nejen míru individuálního rizika vnímavosti k RS, ale také posoudit podíl genetické predispozice na rozvoj a průběh tohoto onemocnění v české homogenní populaci. Očekáváme, že se nám podaří nalézt vztah hladin MMP-9, MMP-2 a jejich inhibitorů v séru ke klinickému průběhu, tíži onemocnění a stupni postižení.

Získané nálezy by mohly napomoci lepšímu porozumění úlohy HLA, metalloproteináz, IL-7, vitamínu D a ATG v patofyziologii choroby. Zjištění rizikových alel pro dané onemocnění může napomoci ve vývoji specifické terapie a přispět ke zjištění individuální odpovědi pacientů na léčbu.



## **2. Materiál a metodika**

### **2.1 Genetická studie**

#### **2.1.1 Soubor**

Jedná se o studie typu case-control a genotypově fenotypové studie. Bylo do ní zařazeno celkem 306 nemocných s RS, diagnostikovanou dle Mc Donaldových kritérií (McDonald et al., 2001), kontrolní soubor byl tvořen 135 zdravými jedinci. Nemocní byli rozděleni podle pohlaví a podle formy onemocnění do skupin na RR RS, SP RS a PP RS. Klinický stav byl hodnocen pomocí Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke 1983). Stupeň postižení byl spočítán podle Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (Roxburgh et al., 2005).

Všichni pacienti byli vyšetřeni ve specializovaném centru pro RS stejným lékařem (YB). Studie byla schválena etickou komisí FN Brno a všichni jedinci podepsali informovaný souhlas před vstupem do studie.

#### **2.1.2 Genetická analýza**

Genotypizace byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a restrikční analýzou. DNA byla izolována z leukocytů periferní krve pomocí metody s využitím proteinázy K. Izolace DNA spočívala v lýze buněk v roztoku, který obsahuje 10 mM tris- HCl (pH=8.5), 0,1% SDS, 0.1 mg/ml proteinázy K. Proteináza K byla odstraněna extrakcí fenolem a po etanolové precipitaci a vysušení byl vzorek DNA rozpuštěn v TE pufru (10 mM Tris-Cl pH=8.1 mM EDTA pH=8). Detekce polymorfismů byla provedena pomocí PCR se specifickými primery a následné restrikční analýzy specifickými endonukleázami. Popis metodiky je uveden v Tab. 8 a 9.

**Tab. 8** Sekvence primerů, teplota pro připojení primerů

<b>Polymorfismus</b>	<b>Sekvence primerů (sense/antisense)</b>	<b>PCR (teplota °C, čas)</b>
<b>HLA- DRBI*1501 rs3135388</b>	5' GTA GAG ATC TCC CAA CAA ATCGA- 5' GAG TCG GTC CTG GGG AAT A-	95 /5' 95/50'' - 59/30'' -72/45'' (30x) 72/10' 10/10'
<b>MMP-9 -1562 C/T</b>	5' ATGCTCATGCCCGTAATCCT 3' 5' TGGGAAAAACCTGCTAACAACCT 3'	95/3' 94/30"- 65/20"- 72/40"(34x) 72/7' 10/10'
<b>MMP-9 R+279Q</b>	5' CTCGCCCCAGGACTCTACAC 3' 5' GTGCAGGCGGAGTAGGATT 3'	95/3' 94/20"-59,5/10"-72/10"(35x) 72/7' 10/10'
<b>MMP-2 -1575 G/A</b>	5' ACTGACTCTGGAAAGTCAGAGCA 3' 5' GGCACAGGGTGAGGGGATGG 3'	95/3' 94/50"-60/40"-72/50"(30x) 72/7' 10/10'
<b>MMP-2 -1306 C/T</b>	5' CTTCTAGGCTGGTCCTTACTGA 3' 5' CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGAGCT 3'	95/4' 95/45"- 48,6/35"- 72/45"(35x) 72/5' 10/10'
<b>MMP-2 -735 C/T</b>	5'-ATAGGGTAAACCTCCCCACATT-3' 5'- GATAAATGAGGCTGAGACCTG-3'	95/5' 95/45"-59,2/45"-72/45"(35x) 72/7' 10/10'
<b>MMP-2 -168 G/T</b>	5'-CTGACCATTTCCTTCCCGTTC-3' 5'-CGCCTGAGGAAGTCTGGAT-3'	95/5' 95/50"- 51/45"- 72/50"(35x) 72/7" 10/10'
<b>TIMP-2 +853 G/A</b>	5'-GCCCAGGGTGTTCTGGATGG-3' 5'- CTCCGGCTGATGGCCCCACT- 3'	96/ 3' 95/40"- 63,5 / 30"-72/40"(30x) 72 / 7' 10/ 10'
<b>IL7RA rs6897932</b>	F 5'-GGG AGA TGG ATC CTA TCT TAC TGA- R 5' -TGT GGA AAT TCG CTG AGG AT-	95 /5' 95/45'' 54,3oC /30'' 72oC /35'' [30x] 72 /10' 10 /10'
<b>ATG M235T</b>	5'CAGGGTGCTGTCCACACTGGACCCC -3' 5'CCGTTTGTGCAGGGCCTGGCTCTCT-3'	94/3' 94/30"-69/1' (34x) 94/30"-69/7' 10/10'
<b>ATG A (-6) G</b>	5'AATAAGGCATCGTGACCC-3' 5'ACCTTCTGCTGTAGTACC-3'	95 /5' 95/30"-56/15"-72/15" (30x) 72/3' 10/10'

**Tab. 9** Sekvence primerů, teplota pro připojení primerů

<b>Polymorfismus</b>	<b>Sekvence primerů (sense/antisense)</b>	<b>PCR (teplota °C, čas)</b>
<b>FokI rs2228570</b>	5'AGCTGGCCCTGGCACTGACTCTGGCTCT-3' 5'ATGGAACACCTTGCTTCTTCCCTC-3'	95 /10' 95 /20''- 69/30''1° /1 - 72/30''(14x) 95/30'' -50 / 30'' 72 / 30''(20 x) 72/ 5' 10/10'
<b>TaqI rs731236</b>	5'CAGAGCATGGACAGGGAGCAA-3' 5'GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC-3'	95 /10' 95 /20''- 69/30''1° /1 - 72/30''(14x) 95/30'' -50 / 30'' 72 / 30''(20 x) 72/ 5' 10/10'
<b>Apal rs7975232</b>	5'CAGAGCATGGACAGGGAGCAA3' 5'GCAACTCCTCATGGCTGAGGTCTC3'	95 /10' 95 /20''- 69/30''1° /1 - 72/30''(14x) 95/30'' -50 / 30'' 72 / 30''(20 x) 72/ 5' 10/10'
<b>BsmI rs1544410</b>	5'CAACCAAGACTACAAGTACCGCGTCAGTGA3' 5'AACCAGCGGGAAGAGGTCAAGGG3'	95 /10' 95 /20''- 69/30''1° /1 - 72/30''(14x) 95/30'' -50 / 30'' 72 / 30''(20 x) 72/ 5' 10/10'
<b>EcoRV rs4516035 C/T</b>	5'CCTCCTCTGTAAGAGGCGAATAGCGAT- 3' 5'GGACAGGTGAAAAAGATGGGGTTC -3'	95 /10' 95 /20''- 69/30''1o /1 - 72/30''(14x) 95/30'' -50 / 30'' 72 / 30''(20 x) 72/ 5' 10/10'

**Tab. 10 Restriční enzymy, podmínky a délka PCR produktů pro analýzu genetických polymorfismů v genech pro HLA- DRB1\*1501, MMP-9, MMP-2, IL7RA, ATG a VDR**

Polymorfismus	Restriční enzym	Podmínky	Délka fragmentu (bp)
<b>HLA- DRB1*1501 rs3135388</b>	Cla I 5'AT↓CGAT	30°C 4h: PCR produkt 15,0µl, H2O 2,6u, pufr M 2ul, ClaI (10U/µl) 0,4 µl	CC 206 / 206bp TT 186, 20 / 186, 20bp CT 206 / 186, 20bp
<b>MMP-9 -1562C/T</b>	Pae I GCATG↓C	37°C 4h: PCR produkt 15ul, H2O 2,7ul, pufr B+BSA 2ul, Pae I 3U	CC 329/329 TT 144,185/ 144,185 CT 329/ 144,185
<b>MMP-9 R+279Q</b>	Sma I CCC↓GGG	30°C 4h: PCR produkt 15ul, H2O 2,7ul, pufr Y+/Tango 2ul, Sma I 3U	GG 22, 73 /22, 73 AA 95/ 95 GA 22, 73/ 95
<b>MMP-2 -1306C/T</b>	XspI C↓TAG	37°C 4h: PCR produkt 10ul, H2O 3,2ul, pufr K 15ul, XspI 3U	CC 188, 5/188, 5 TT 162, 26,5/162, 26, 5 CT 188, 5/162, 26, 5
<b>MMP-2 -1575G/A</b>	Tsp45I ↓GTG/CAC	65°C 4h: PCR produkt 15ul, H2O 2,7ul, pufr NEB 1 2ul, Tsp45I 1,2U	GG 113, 156/ 113, 156 AA 269/269 GA 113, 156/269
<b>MMP-2 -735C/ T</b>	Hinfl G↓ANTC	37°C 4h: PCR produkt 15ul, H2O 2,5ul, pufr R 2ul, Hinfl 5U	CC 300/300 TT 45,255/45,255 CT 300/45, 255
<b>MMP-2 -168G/ T</b>	BseD I C↓CNNGG	55°C 4h: PCR produkt 15ul, H2O 2,7ul, pufr Y/Tango 2ul, BseD I 3U	GG 26,194,205/ 26,194, 205 TT 26, 399/26,399 GT 26, 194, 205/26, 399
<b>TIMP-2 +853G/A</b>	Bsr I	65°C 4h: PCR produkt 15ul H2O, 2,5ul, pufr R 2ul, Bsr I 2,5U	GG 221/221 AA 61,160/ 61,160 GA 221/ 61,160
<b>IL7RA rs6897932</b>	Mbo I	37°C 4h: PCR produkt 15,0µl H2O, 2,7ul, pufr R 2,0 ul, MboI 10U	CC 115, 134 / 115,134 TT 24, 110, 115, / 24, 110, 115 CT 115, 134, / 24, 110, 115
<b>ATG M235T</b>	Asp I	37 °C po 4 hod: produkt 15 µl, H2O 2,5 µl, pufr B 2 µl, Asp 5 U	MM 165/165 TT 141, 24/141, 24 MT 141, 24/165
<b>ATG A (-6) G</b>	BstNI	60 °C po 4 hod: produkt 15 µl, H2O 2,5 µl, pufr NEB2 + BSA 2 µl, BstNI 5 U	AA 45, 20/45, 20 GG 65/65 AG 45, 20/65
<b>EcoRV rs4516035 C/T</b>	EcoRV	37 °C po 4 hod: produkt 15 µl, H2O 2,7 µl, pufr NEB2 + BSA 2 µl, EcoRV 0.3	CC 179/179 TT 152, 27/152, 27 C/T 179/152, 27
<b>FokI rs2228570</b>	FokI	37 °C po 4 hod: produkt 15 µl, H2O 2,7 µl, pufr NEB4 2 µl, FokI 0.3 µl,	GG 267/267 AA 193, 74/193, 74 G/A 267/193, 74
<b>TaqI rs731236</b>	TaqI	65 °C po 4 hod: produkt 15 µl, H2O 2,7 µl, pufr NEB4+BSA 2 µl, TaqI 0.3 µl,	AA 496, 249/496, 249 GG 295, 249, 201/ 295, 249, 201 A/G 496, 249/295, 249, 201
<b>Apal rs7975232</b>	Apal	37 °C po 4 hod: produkt 15 µl, H2O 2,7 µl, pufrB 2 µl, Apal 0.3 µl,	AA 745/745 CC 532, 213/532, 213 A/C 745/532, 213
<b>BsmI rs1544410</b>	BsmI	37 °C po 4 hod: produkt 15 µl, H2O 2,7 µl, pufrR 2 µl, Mva1269I 0.3 µl,	TT 813/813 CC 670, 143/670, 143 C/T 670, 143/813

## **2.2 Studie hladin enzymů**

### **2.2.1 Soubor**

Do studie byli zařazeno 87 nemocných s RS, diagnostikovanou dle Mc Donaldových kritérií, kontrolní skupinu tvořilo 50 zdravých jedinců. Nemocní byli rozděleni podle průběhu nemoci do skupin s RR RS, SP RS a PP RS formou onemocnění. Klinický stav byl hodnocen pomocí EDSS, stupeň postižení byl spočítán podle MSSS. V době krevního odběru byli všichni pacienti a kontrolní jedinci bez známek infekčního onemocnění a nemocní byli v klinicky stabilizovaném stavu. Všichni pacienti byli vyšetřeni ve specializovaném centru pro RS stejným lékařem (YB) Všichni jedinci podepsali informovaný souhlas před vstupem do studie.

### **2.2.2 Stanovení hladin enzymů**

Stanovení a kvantifikace hladin enzymů MMP-2, MMP-9, TIMP-2 a TIMP-1 bylo provedeno metodou ELISA (enzyme-linked immunoassay). Byly použity tyto kity: MMP-9, Human, Activity Assay RPN26; MMP-2, Human, Biotrak ELISA System RPN2617; TIMP-1, Human, Biotrak ELISA System RPN2611 a TIMP-2, Human, Biotrak ELISA RPN2618, podle instrukcí výrobce Amersham Biosciences UK (Buckinghamshire, UK). Jedná se o jednoduché, specifické kvantitativní stanovení lidské MMP-2, MMP-9, TIMP-1 a TIMP-2 ze séra. Pacientům bylo odebráno 10 ml srážlivé krve, následně byla krev zcentrifugována a sérum bylo zamrazeno při teplotě -80 st C. Před vlastním stanovením bylo sérum ředěno. Vzorky byly inkubovány v jamkách obsahujících anti-MMP-2, anti-MMP-9, anti-TIMP-2 a anti-TIMP-1 protilátky. MMP-2, MMP-9, TIMP-2 a TIMP-1 byla vázána v jamce na peroxidázově značenou protilátku, inkubována 2 hodiny při teplotě 20–27 °C a poté promyta. Reakce byla ukončena přidáním kyselého roztoku, po obarvení byla měřena 450 nm spektrofotometrií.

### 3. Komentovaný soubor vlastních prací

**Benešová Y, Vašků A, Štourač P, Hladíková M, Fiala A, Bednařík J.**

Association of HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 gene polymorphism with multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2013; 255(1-2): 92-96. **IF: 2.786**

#### Resumé

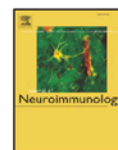
Významnou roli v etiopatogenezi RS hraje genetická predispozice. Byla prokázána asociace RS s DR2 haplotypem, zejména s alelou HLA-DRB1\*1501. Alely DRB1\*1501, DRB5\*0101 a DQB1\*0602 se významně podílí na zvýšení predispozice rozvoje RS zvýšením prezentace peptidů myelinu T-lymfocytům a antigenů některých herpetických virů, zejména EBV. Vzájemná interakce může spustit patogenní proces prostřednictvím molekulárních mimiker. Důležitou roli hraje také vzájemná interakce s VDR, neboť v proximální promotorové oblasti alely HLA DRB1\*1501 je lokalizován responzivní element pro vitamin D. Bylo prokázáno, že genetický polymorfismus rs3135388 je markerem alely HLA DRB1\*1501 ( $r^2 = 0.97$ ). Cílem naší práce bylo vyšetřit tento genetický polymorfismus a prokázat souvislost s vnímavostí k RS, zjistit případné rozdíly mezi pohlavími a ovlivnění tíže onemocnění a stupně postižení v české populaci. Do studie bylo zařazeno 306 pacientů s RS, kontrolní soubor byl tvořen 132 zdravými jedinci. Byla zkoumána distribuce genotypů a alel polymorfismu rs3135388.

Byl zjištěn signifikantní rozdíl v genové distribuci ( $P_g = 3.06 \times 10^{-9}$ ) a alelové frekvenci ( $P_a = 6.08 \times 10^{-10}$ ) mezi nemocnými RS a zdravými jedinci. Byla prokázána statisticky významně vyšší vnímavost k RS u homozygotů AA a heterozygotů GA (OR=4.27, 95% CI: 2.64-6.92). Po rozdělení souboru podle pohlaví byl prokázán signifikantní rozdíl pouze mezi nemocnými a zdravými ženami v genové distribuci ( $P_g = 1.3 \times 10^{-8}$ ) a alelové frekvenci ( $P_a = 2.82 \times 10^{-9}$ ); (OR=5.11, 95 % CI: 2.86-9.15). U mužů signifikantní rozdíl nalezen nebyl. Z našich výsledků tedy vyplývá, že distribuce polymorfismu rs3135388 může determinovat genetickou vnímavost k rozvoji RS v české populaci, zejména u žen.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Journal of Neuroimmunology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/jneuroim](http://www.elsevier.com/locate/jneuroim)

## Association of HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 gene polymorphism with multiple sclerosis

Yvonne Benešová<sup>a,\*</sup>, Anna Vašků<sup>b</sup>, Pavel Štourač<sup>a,c</sup>, Magdalena Hladíková<sup>a</sup>, Adam Fiala<sup>b</sup>, Josef Bednářik<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Central European Institute of Technology (CEITEC), Masaryk University, Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 4 July 2012

Received in revised form 28 October 2012

Accepted 30 October 2012

#### Keywords:

Gene

HLA-DRB1\*1501

Multiple sclerosis

Tagging polymorphism

### ABSTRACT

We investigated the HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 gene polymorphism and its association with multiple sclerosis (MS) susceptibility, disability and gender differences. The study group consisted of 306 MS patients and 137 healthy individuals. A significant difference in genotype distribution ( $P_g = 3.06 \times 10^{-9}$ ) and allele frequency ( $P_a = 6.08 \times 10^{-10}$ ) between MS patients and controls was demonstrated. The homozygotes AA and heterozygotes GA were more frequent in MS patients (OR = 4.27, 95% CI: 2.64–6.92).

A significant difference between female MS patients and female controls in genotype distribution ( $P_g = 1.3 \times 10^{-8}$ ) and allele frequency ( $P_a = 2.82 \times 10^{-9}$ ); (OR = 5.11, 95% CI: 2.86–9.15) was also proved. Our results indicate that the distribution of the rs3135388 gene polymorphism is a risk factor for MS susceptibility in the Czech female population.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) leading to demyelination, axonal damage, and progressive neurological disability (Hartung et al., 2004). Certain genetic and environmental factors contribute to susceptibility to the disease (Ebers, 1995); further, stochastic and epigenetic effects cannot be overlooked (Sadovnick, 2012).

The whole genome-wide association studies (GWAS) indicate that the human leukocyte antigen (HLA) class II region is the strongest MS susceptibility locus in northern Europeans. The HLA complex is a dense cluster of at least 150 genes (de Bakker et al., 2006) located on the short arm of chromosome 6 at p21.3. Genes within the class II subregion encode HLA class II molecules that function within the immune system (Schmidt et al., 2007). These molecules participate in the recognition and presentation of antigens to T cells and are primarily expressed by antigen-presenting cells such as macrophages, B cells, and dendritic cells. They have been associated with susceptibility to several autoimmune and immune-mediated disorders, such as narcolepsy, systemic lupus erythematosus and MS (Schmidt et al., 2007).

In particular, the HLA-DRB5\*0101-HLA-DRB1\*1501-HLA-DQA1\*0102-HLA-DQB1\*0602 haplotype (Lincoln et al., 2005; Prat et al., 2005; Sadovnick, 2012) and its individual alleles have been linked to MS

(Schmidt et al., 2007). This haplotype confers a relative risk of approximately 3 and homozygosity for this haplotype increases the risk more than six-fold. However, marked linkage disequilibrium (LD) among these loci makes identification of a specific locus difficult. Generally, the HLA-DRB1\*1501 and HLA-DQB1\*0602 are almost always transmitted together in northern Europeans (Lincoln et al., 2005).

In a collaborative GWAS that collected data from 9772 cases and 17,376 controls of European descent, 465,434 autosomal single polymorphisms (SNPs) were analysed. It was proved that HLA-DRB1\*1501 has the strongest association with MS, with a consistent influence within the cohort ( $P = 1 \times 10^{-320}$ , OR = 3.1) (Sawcer et al., 2011). For example, Masterman et al., 2000 reported its presence at a frequency of 61% in MS cases in a Swedish population, as compared with 31% in controls ( $P = 0.0001$ , OR = 3.5). Such findings have not only been seen in studies of primarily Caucasian populations but have also appeared in studies of other ethnic groups, such as Japanese and Middle Eastern populations (Schmidt et al., 2007).

Further, interactions between HLA-DRB1\*1501 and environmental factors, such as Epstein-Barr virus (EBV), human herpes virus and vitamin D, play an important role (De Jager et al., 2008; Lossius et al., 2011; Sadovnick, 2012). HLA genes are involved in the binding and presentation of antigens of these pathogens, and it is likely that an interaction between particular viruses and HLA may influence an individual's susceptibility to MS. An increased viral load or a changed presentation of EBV proteins that cross-react with cellular antigens may trigger pathogenic processes through molecular mimicry, resulting in MS (Niller et al., 2011; Sundström et al., 2009). HLA-DRB1\*15 also includes a vitamin D response element (VDRE) in the proximal promoter region. Functional assays have demonstrated that gene expression is

\* Corresponding author at: Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Jihlavská 20, Brno 625 00, Czech Republic. Tel.: +420 731 103 044; fax: +420 532 232 249.

E-mail address: [beneivo@seznam.cz](mailto:beneivo@seznam.cz) (Y. Benešová).



influenced by VDRE, thereby conferring 1,25-dihydroxyvitamin D3 sensitivity to HLA-DRB1\*15 (Ramagopalan et al., 2009). When examining the epistatic interaction between VDR SNP rs2228570 and DRB1\*1501 tagging SNP rs3135388, there appeared to be a trend of increasing risk of MS in the homozygous for the HLA-DRB1\*1501 allele in association with the VDR (Cox et al., 2012).

Within the HLA-DRB1 gene, the rs3135388 ( $P=8.94E^{-81}$ , OR=1.99), rs3129900 ( $P=2.63E^{-34}$ , OR=2.8), rs3129934 ( $P=2.60E^{-37}$ , OR=2.9), and rs9270986 ( $P=2.38E^{-36}$ , OR=3) gene SNPs have been demonstrated as the most strongly associated with MS (Alcina et al., 2012; Hafler et al., 2007).

It has been shown that the most significant surrogate marker for the HLA-DRB1\*1501 allele is rs3135388 gene polymorphism ( $r^2=0.97$ ) (de Bakker et al., 2006). Only a few genetic association studies have been published that address this gene polymorphism in relation to MS (Hafler et al., 2007; Živković et al., 2009). The carrier status of the A allele has been associated with MS susceptibility ( $P=1.18 \times 10^{-9}$ ), as well as significantly more frequent lesions and higher lesion volumes in the spinal cord (Sombekke et al., 2009).

In the present study, the HLA-DRB1\*1501 allele rs3135388 gene polymorphism was investigated in relation to MS susceptibility, disability and potential gender differences in the Czech population.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Subjects

The study was designed as a case-control study. A total of 443 unrelated Caucasian subjects were enrolled. The study group consisted of 306 patients fulfilling the McDonald criteria for MS (Polman et al., 2011), with a mean age of  $38 \pm 10.5$  years (mean  $\pm$  S.D.), 220 females, and 86 males with MS. The control group consisted of 137 healthy volunteers, with a mean age of  $37 \pm 11.6$  years (mean  $\pm$  S.D.), 87 females, and 50 males. Mean duration of the disease was  $7.2 \pm 6.2$  (mean  $\pm$  S.D.). Clinical status was evaluated according to the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983) and the disease severity was calculated using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (Roxburgh et al., 2005).

All patients and controls were recruited from the Department of Neurology of the University Hospital, Brno and were examined in a specialised MS centre by the same specialist neurologist (Y.B.). The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital, Brno, and all persons gave their informed consent prior to enrolment in the study.

### 2.2. HLA-DRB1\*1501 genotyping

Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from white blood cells by standard techniques using proteinase K. Genotyping in HLA-DRB1\*1501 gene was performed with polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis. DNA was isolated from 5 ml of EDTA-anticoagulated blood from leucocytes by the standard extraction method. Detection of rs3135388 gene polymorphism was performed by PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP).

Detailed descriptions of the methods used are summarised in Table 1.

### 2.3. Statistical analysis

The Kolmogorov-Smirnov test was used to check distribution. Normally distributed metric parameters are presented as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.). Hardy-Weinberg analysis was performed using the chi-square ( $\chi^2$ ) test and the two-tailed Fisher's exact test to examine differences in the distribution of alleles and genotypes between patients and controls. Odds ratios and confidence intervals (95%) were calculated by logistic regression. The Kruskal-Wallis

**Table 1**  
Primer sequences, annealing temperatures, restriction enzyme, conditions and product lengths for analysis of rs3135388 gene polymorphism.

Polymorphism	Primer sequence (sense/antisense)	Restriction enzyme
rs3135388	5' GTA GAG ATC TCC CAA CAA ATCGA-	Cla I
	5' GAG TCG GTC CTG GGG AAT A-	
Conditions		Fragment length (bp)
30°C for 4 h: PCR product 15.0 $\mu$ l, H2O		CC 206/206 bp
2.6 u, buffer M 2 ul, ClaI (10 U/ $\mu$ l) 0.4 $\mu$ l		TT 186, 20/186, 20 bp
PCR (temperature °C, time)		CT 206/186, 20 bp
95/5'		
95/50* – 59/30* – 72/45* (30x)		
72/10'		
10/10'		

PCR – polymerase chain reaction.

ANOVA test was used for comparison of genotypes with disability as expressed by EDSS and MSSS. Values of  $p \leq 0.05$  were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using the STATISTICA software package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), version 10.

## 3. Results

The basic characteristics of the study group are summarised in Table 2.

### 3.1. Genetic association study

Genotype and allele frequencies of HLA-DRB1\*1501 rs3135388 gene polymorphism in MS patients and controls are shown in Table 3. The genotype distribution of polymorphisms did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium in any group.

A significant difference in genotype distribution ( $P_g=3.06 \times 10^{-9}$ ) between MS patients and controls was demonstrated. The homozygotes AA and the heterozygotes GA were more frequent in MS patients (OR=4.27, 95% CI: 2.64–6.92); the sensitivity for MS was 0.5, the specificity 0.81 and the power test 0.999. A significantly higher frequency of the rs3135388 A allele carrier was found in MS patients compared to healthy controls ( $P_a=6.08 \times 10^{-10}$ ); (OR=3.69, 95% CI: 2.39–5.7); the sensitivity for MS was 0.287, the specificity 0.90 and the power test 1.0.

### 3.2. Genotype-phenotype study

#### 3.2.1. Genotypes and gender difference

Genotype and allele frequencies of HLA-DRB1\*1501 rs3135388 gene polymorphism in female patients and female controls and in male patients and male controls are shown in Table 3.

A significant difference was found between MS female patients and female controls in genotype distribution ( $P_g=1.3 \times 10^{-8}$ ) and allele frequency ( $P_a=2.82 \times 10^{-9}$ ); (OR=5.11, 95% CI: 2.86–9.15).

**Table 2**  
Demographic data.

Group	0	Mean age x (SD)	EDSS x (SD)	MSSS x (SD)	Male/female
MS	306	38 (10.5)	3.4 (1.7)	5.5 (2.3)	86/220
RRMS	236	35 (8.9)	2.7 (1.2)	4.8 (2.2)	66/170
SPMS	43	46 (10.1)	5.6 (1.2)	7.1 (1.8)	11/32
PPMS	27	48 (10.1)	6.1 (1.3)	7.8 (1.6)	9/18
Control	137	37 (11.6)	–	–	50/87

MS – multiple sclerosis; RRMS – relapsing-remitting multiple sclerosis; SPMS – secondary progressive multiple sclerosis; PPMS – primary progressive multiple sclerosis; EDSS – Expanded Disability Status Scale; MSSS – Multiple Sclerosis Severity Score.



**Table 3**

Comparisons of genotype and allele frequencies in rs3135388 gene polymorphism between MS and the control groups, female MS and female controls, and male MS and male controls.

Polymorphism	Genotype			Genotype			Pg	Allele			Pa
rs3135388	GG	GA	AA	GG	GA	AA	3.06 × 10 <sup>-9</sup>	G	A		6.08 × 10 <sup>-10</sup>
MS (N = 306)	153/306	130/306	23/306	46.8	42.5	7.5		436/612	176/612		28.8
Control (N = 137)	111/137	25/137	1/137	81.0	18.3	0.7		247/274	27/274		9.9
rs3135388	GG	GA	AA	GG	GA	AA	1.3 × 10 <sup>-8</sup>	G	A		2.82 × 10 <sup>-9</sup>
MS female (N = 220)	103/220	98/220	19/220	46.8	44.6	8.6		304/440	136/440		30.9
Control female (N = 87)	73/87	14/87	0/87	83.9	16.1	0		160/174	14/174		8
rs3135388	GG	GA	AA	GG	GA	AA	0.11	G	A		0.04
MS male (N = 86)	50/86	32/86	4/86	58.1	37.2	4.7		132/172	40/172		23.3
Control male (N = 50)	38/50	11/50	1/50	76	22	2		87/100	13/100		13

Pg – probability of differences in genotype distribution; Pa – probability of differences in allelic frequency; MS – multiple sclerosis group; Control – control group; N – number.

The sensitivity for MS was 0.309, the specificity 0.919 and the power test 1.0. The homozygotes AA and the heterozygotes GA were more frequent in MS patients (OR = 5.92, 95% CI: 3.15–11.12); the sensitivity for MS was 0.532, the specificity 0.839 and the power test 0.999.

No statistically significant differences between male MS patients and male controls were observed in rs3135388 gene polymorphism (Pg = 0.11, Pa = 0.04).

**3.2.2. Genotypes and disability**

A comparison of genotypes with disability and severity as expressed by EDSS and MSSS is shown in Tables 4 and 5.

The mean EDSS score over the whole MS group was 3.4 ± 1.7 (mean ± S.D.). No significant associations of genotypes with disability as expressed by EDSS were observed in the study group as a whole and when separated by gender. After stratification of the patient group with MS according to disease type, significant associations of genotypes with disability in female relapsing–remitting MS (RRMS) were found (p < 0.05). However, the difference did not remain significant after correction for multiple comparison. No associations of genotypes with severity described by MSSS score, according to Roxburgh et al., in the study group as a whole, when separated by gender, regardless of whether single event or relapsing–remitting disease was evaluated separately, were demonstrated. The MSSS score over the whole MS group was calculated as 5.5 ± 2.3 (mean ± S.D.).

**4. Discussion**

The association of MS with the HLA-DRB1\*1501 allele and with the DRB1\*1501-DQA1\*0102-DQB1\*0602 haplotype has been confirmed across 60 human case-control studies (Schmidt et al., 2007). By genotyping the HapMap CEU panel, it has been found that

polymorphism rs3135388 tags DRB1\*1501 (r<sup>2</sup> 0.97). This finding was evaluated in 1328 chromosomes, and rs3135388 typed DRB1\*1501 allele at a sensitivity of 96.4% and specificity of 99% (Hafler et al., 2007). This was confirmed by Goris, who genotyped rs3135388 in 444 MS trios and 1066 population-based birth cohort controls using Taqman-based allele-specific PCR followed by 5' exonucleases. The correlation coefficient between DRB1\*1501 and rs3135388 was 0.98 (Goris et al., 2008).

Our results appear to indicate that the distribution of the rs3135388 gene polymorphism investigated is a strong risk factor for MS susceptibility. A significant increase of the A allele in MS patients was proved. The A allele carriers were more frequent in patients with MS (OR = 3.69); the OR for GA heterozygotes and AA homozygotes was 4.27. Our study confirmed previous results indicating that rs3135388 A allele carriers are more frequent in patients with MS. An increased frequency of A allele in the Serbian MS population (OR = 4.37) has been described (Živković et al., 2009). Similarly, a case-control analysis of a population-based cohort from Olmsed Country, MN, USA, with a predominance of northern European ancestry, found a genetic association of allele A rs3135388 gene polymorphism (OR = 3.93) with MS (Matiello et al., 2010). Further, in genome-wide study analysis, including 928 MS individuals from the United Kingdom, 1394 MS individuals from the United States and 2987 control subjects from the United States, a genetic association between A allele and MS susceptibility (OR = 1.99) has been found (Hafler et al., 2007).

Inconsistent results have been obtained in examination of the association between gender and the DR15 haplotype. Some studies found no gender difference (Ballerini et al., 2004; Fernández et al., 2004), while others found some degree of over-representation of the DR15 haplotype in females (Hensiek et al., 2002; Luomala et al., 2001; Weatherby et al., 2001), and one found a slightly higher prevalence in males (McDonnell et al., 1999). In our study group, when the patients were divided according to gender, a significant difference

**Table 4**

Comparison of rs3135388 genotypes with disability as expressed by EDSS.

EDSS score x (SD)	Genotype GG	Genotype GA	Genotype AA	p
MS	3.5 (1.6)	3.4 (1.9)	3.6 (1.7)	0.59
Female	3.4 (1.6)	3.3 (1.8)	3.6 (1.8)	0.43
Male	3.5 (1.5)	3.7 (1.9)	3.3 (1.0)	0.99
RRMS	2.8 (1.0)	2.5 (1.0)	2.9 (0.9)	0.03
RRMS female	2.8 (1.0)	2.4 (1.0)	2.8 (0.9)	0.03
RRMS male	2.9 (0.9)	2.8 (1.1)	3.3 (0.8)	0.65
CIS	2.2 (0.5)	1.7 (0.6)	2.5 (0.0)	0.10
SPMS	5.6 (1.3)	5.5 (1.2)	7.0 (1.0)	0.18
PPMS	5.6 (1.3)	6.7 (1.0)	5.5 (0.0)	0.09

MS – multiple sclerosis; RRMS – relapsing–remitting multiple sclerosis; SPMS – secondary progressive multiple sclerosis; PPMS – primary progressive multiple sclerosis; CIS – clinical isolated syndrome; EDSS – Expanded Disability Status Scale; p – Kruskal–Wallis ANOVA test.

**Table 5**

Comparison of rs3135388 genotypes with disability as expressed by MSSS.

MSSS score x (SD)	Genotype GG	Genotype GA	Genotype AA	p
MS	5.7 (2.2)	5.4 (2.3)	5.6 (2.2)	0.59
Female	5.6 (2.3)	5.2 (2.3)	5.6 (2.3)	0.45
Male	5.9 (2.1)	5.7 (2.4)	5.0 (1.9)	0.56
RRMS	5.1 (2.0)	4.7 (2.2)	5.2 (2.2)	0.43
CIS	5.7 (1.9)	4.4 (1.9)	6.5 (0.0)	0.18
SPMS	7.4 (1.6)	6.8 (2.0)	7.8 (1.0)	0.62
PPMS	8.5 (0.9)	7.5 (1.7)	4.6 (0.0)	0.09

MS – multiple sclerosis; RRMS – relapsing–remitting multiple sclerosis; SPMS – secondary progressive multiple sclerosis; PPMS – primary progressive multiple sclerosis; CIS – clinical isolated syndrome; MSSS – Multiple Sclerosis Severity Score; p – Kruskal–Wallis ANOVA test.

between female patients and healthy females in rs3135388 gene polymorphism was proved. Allele A frequency in our female patients with MS was 30.9% compared with 8% in female controls; the OR for GA heterozygotes and AA homozygotes was 5.92. We demonstrated that the A allele carriers were more frequent in female patients with MS.

The differences in male and female susceptibility to MS and other autoimmune disorders may be explained in terms of sex chromosome effects and the effects of sex steroid hormones on the immune system, the blood–brain barrier and parenchymal CNS cells. Low levels of estrogens favour a proinflammatory Th1 response, whereas progesterone and high doses of estrogens favour a Th2 response (Nicot, 2009).

The biological actions of estrogen are mediated through intranuclear estrogen receptors (ERs), which bind to specific estrogen response elements located in the promoters of genes involved in the immune response, which control their expression. ERs can also regulate gene expression via protein–protein interactions with DNA-binding transcription factors in the nucleus (Nicot, 2009). It has been reported that, in a Japanese female population, PvuII polymorphism in the estrogen receptor gene (ERG) contributed to susceptibility to MS due to interaction with HLA-DRB1\*1501 (OR = 16) (Kikuchi et al., 2002). This polymorphism may modulate antigen presentation between T cells and antigen-presenting cells (APC) co-operating with the DRB1\*1501 allele. A significant ERG polymorphism contribution to the development of MS among females with the DR2 allele in a Finnish population (Mattila et al., 2001) has also been demonstrated.

The association with allele A carriage supports the hypothesis that an increased overall risk of the disease is linked to alterations in immune function and might relate to allele A-linked differences in the regulation of autoreactive immune cells, which precipitate inflammatory disease activity. It has been shown that the rs3135388 A allele correlates with high expression of DRB1, DRB5 and DQB1 genes in a Caucasian population. The homozygotic carrier for rs3135388 risk AA allele has shown 15.7-, 5.2-, and 8.3-fold higher expression with respect to the GG carrier, and 1.6-, 1.5- and 1.8-fold higher expression with respect to the AG carrier for the DQB1, DRB5 and DRB1 genes, respectively (Alicina et al., 2012).

Alleles DRB1\*1501, DRB5\*0101, and DQB1\*0602 contribute to MS through an enhanced ability to present encephalitogenic myelin peptides to pathogenic T cells. The association of MS with HLA-DRB1\*1501 and DRB5\*0101 polymorphisms by determining an antigen-recognition profile has been examined by Lang et al., 2002. It was demonstrated that a T-cell receptor (TCR) from an MS patient recognised DRB1\*1501-restricted myelin basic protein residues 85 to 99 and DRB5\*0101-restricted Epstein-Barr virus DNA polymerase peptide. These similarities support the concept of molecular mimicry involving HLA molecules and suggest that such structural details may explain the preponderance of MHC class II associations in HLA-associated diseases.

However, it has also been revealed that association of HLA class II polymorphisms with MS may be related to levels of gene expression to the same or a greater extent than restriction of antigen response. It has been shown that the immunological synapse strength in the interaction between the APC and the T cell determines the differentiation into Th1 or Th2 type T cell. The stronger TCR signal favours Th1 differentiation (Corse et al., 2011).

Like other studies (Hensiek et al., 2002; Weinschenker et al., 1998), ours did not reveal any significant association of genotypes with disability and disease severity in the whole study group and when separated by gender. After stratification of the patient group with MS according to disease type, only marginally significant associations of genotypes with disability in female RRMS were found. However there is some evidence that HLA DRB1\*1501 might also be associated with a more severe course of the disease (Schmidt et al., 2007; Sombekke et al., 2009; Vasconcelos et al., 2009).

We employed a candidate gene approach to investigate the association between rs3135388 gene polymorphism and MS. We enrolled 443 Czech subjects in this direct, association, case-control study (Cordell and Clayton, 2005). Our results revealed association with MS only in females carrying this polymorphism, which implies that rs3135388 is a risk factor limited to females. Considering the results of these independent association studies, further work with larger, homogeneous populations should be done to examine the results presented. The factors contributing to the gender difference should also be more widely investigated. Follow-up functional studies are also needed to clarify the position of HLA-DRB1\*1501 in the pathophysiology of MS.

## 5. Conclusion

This study confirmed that the distribution of tag nucleotide polymorphism for HLA-DRB1\*1501, rs3135388 is a risk factor for MS susceptibility in female patients in the Czech population. Since there is a strong correlation between rs3135388 and HLA-DRB1\*1501, this marker would be a highly useful and cost-effective means of screening for the HLA-DRB1\*1501 allele.

## Acknowledgements

The study was supported by the project (Ministry of Health, Czech Republic) for conceptual development of research organisation 65269705 (University Hospital Brno, Brno, Czech Republic) and by the project "CEITEC – Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) from European Regional Development Fund.

Ethical approval for the study was granted by the institutional ethical committee.

## References

- Alicina, A., Abad-Grau Mdel, M., Fedetz, M., Izquierdo, G., Lucas, M., Fernández, O., Ndagire, D., Catalá-Rabasa, A., Ruiz, A., Gayán, J., Delgado, C., Arnal, C., Matesanz, F., 2012. Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1\*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations. *PLoS One* 7, e29819.
- Ballerini, C., Guerini, F.R., Rombolà, G., Rosati, E., Massacesi, L., Ferrante, P., Caputo, D., Talamanca, L.F., Naldi, P., Liguori, M., Alizadeh, M., Momigliano-Richiardi, P., D'Alfonso, S., 2004. HLA-multiple sclerosis association in continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe. *J. Neuroimmunol.* 150, 178–185.
- Cordell, H.J., Clayton, D.G., 2005. Genetic association studies. *Lancet* 366, 1121–1131.
- Corse, E., Gottschalk, R.A., Allison, J.P., 2011. Strength of TCR-peptide/MHC interactions and in vivo T cell responses. *J. Immunol.* 186, 5039–5045.
- Cox, M.B., Ban, M., Bowden, N.A., Baker, A., Scott, R.J., Lechner-Scott, J., 2012. Potential association of vitamin D receptor polymorphism Taq1 with multiple sclerosis. *Mult. Scler.* 18, 16–22.
- de Bakker, P.I., McVean, G., Sabeti, P.C., Miretti, M.M., Green, T., Marchini, J., Ke, X., Monsuur, A.J., Whittaker, P., Delgado, M., Morrison, J., Richardson, A., Walsh, E.C., Gao, X., Galver, L., Hart, J., Halfer, D.A., Pericak-Vance, M., Todd, J.A., Daly, M.J., Trowsdale, J., Wijmenga, C., Vyse, T.J., Beck, S., Murray, S.S., Carrington, M., Gregory, S., Deloukas, P., Rioux, J.D., 2006. A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC. *Nat. Genet.* 38, 1166–1172.
- De Jager, P.L., Simon, K.C., Munger, K.L., Rioux, J.D., Halfer, D.A., Ascherio, A., 2008. Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis. *Neurology* 70, 1113–1118.
- Ebers, G., 1995. Genetic factors in multiple sclerosis. MS Forum; Modern Management Workshop, Boston.
- Fernández, O., Fernández, V., Alonso, A., Caballero, A., Luque, G., Bravo, M., León, A., Mayorga, C., Leyva, L., de Ramón, E., 2004. DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain. *J. Neurol.* 251, 440–444.
- Goris, A., Walton, A., Ban, M., Dubois, B., Compston, A., Sawcer, S., 2008. A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1\*1501 allele. *Tissue Antigens* 72, 401–403.
- Halfer, D.A., Compston, A., Sawcer, S., Lander, E.S., Daly, M.J., De Jager, P.L., de Bakker, P.I., Gabriel, S.B., Mirel, D.B., Ivinson, A.J., Pericak-Vance, M.A., Gregory, S.G., Rioux, J.D., McCauley, J.L., Haines, J.L., Barcellos, L.F., Cree, B., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., 2007. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* 357, 851–862.
- Hartung, H.P., Bar-Or, A., Zoukos, Y., 2004. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J. Neurol.* 251, 12–29.
- Hensiek, A.E., Sawcer, S.J., Feakes, R., Deans, J., Mander, A., Akesson, E., Roxburgh, R., Corradu, F., Smith, S., Compston, D.A., 2002. HLA-DR 15 is associated with female



- sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 72, 184–187.
- Kikuchi, S., Fukazawa, T., Niino, M., Yabe, I., Miyagishi, R., Hamada, T., Tashiro, K., 2002. Estrogen receptor gene polymorphism and multiple sclerosis in Japanese patients: interaction with HLA-DRB1\*1501 and disease modulation. *J. Neuroimmunol.* 128, 77–81.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452.
- Lang, H.L., Jacobsen, H., Ikemizu, S., Andersson, C., Harlos, K., Madsen, L., Hjorth, P., Sondergaard, L., Svejgaard, A., Wucherpfennig, K., Stuart, D.I., Bell, J.L., Jones, E.Y., Fugger, L., 2002. A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* 3, 940–943.
- Lincoln, M.R., Montpetit, A., Cader, M.Z., Saarela, J., Dymont, D.A., Tiislar, M., Ferretti, V., Tienari, P.J., Sadovnick, A.D., Peltonen, L., Ebers, G.C., Hudson, T.J., 2005. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat. Genet.* 37, 1108–1112.
- Lossius, A., Vartdal, F., Holmøy, T., 2011. Vitamin D sensitive EBNA-1 specific T cells in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 240–241, 87–96.
- Luomala, M., Elovaara, I., Ukkonen, M., Koivula, T., Lehtimäki, T., 2001. The combination of HLA-DR1 and HLA-DR53 protects against MS. *Neurology* 56, 383–385.
- Masterman, T., Ligers, A., Olsson, T., Andersson, M., Olerup, O., Hillert, J., 2000. HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 48, 211–219.
- Matiello, M., Schaefer-Klein, J., Brum, D.G., Atkinson, E.J., Kantarci, O.H., Kantarci, O.H., Weinschenker, B.G., NMO genetics collaborators, 2010. HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 polymorphism is not associated with neuromyelitis optica. *Mult. Scler.* 16, 981–984.
- Mattila, K.M., Luomala, M., Lehtimäki, T., Laippala, P., Koivula, T., Elovaara, I., 2001. Interaction between ESR1 and HLA-DR2 may contribute to the development of MS in women. *Neurology* 56, 1246–1247.
- McDonnell, G.V., Mawhinney, H., Graham, C.A., Hawkins, S.A., Middleton, D., 1999. A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis. *J. Neurol. Sci.* 165, 77–83.
- Nicot, A., 2009. Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy. *Front. Biosci.* 14, 4477–4515.
- Niller, H.H., Wolf, H., Ay, E., Minarovits, J., 2011. Epigenetic dysregulation of Epstein-Barr virus latency and development of autoimmune disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 711, 82–102.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F.D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A.J., Waubant, E., Weinschenker, B., Wolinsky, J.S., 2011. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann. Neurol.* 69, 292–302.
- Prat, E., Tomaru, U., Sabater, L., Park, D.M., Granger, R., Kruse, N., Ohayon, J.M., Bettinotti, M.P., Martin, R., 2005. HLA-DRB5\*0101 and -DRB1\*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype. *J. Neuroimmunol.* 167, 108–119.
- Ramagopalan, S.V., Maugeri, N.J., Handunnetthi, L., Lincoln, M.R., Orton, S.M., Dymont, D.A., Deluca, G.C., Herrera, B.M., Chao, M.J., Sadovnick, A.D., Ebers, G.C., Knight, J.C., 2009. Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D. *PLoS Genet.* 5, e1000369.
- Roxburgh, R.H., Seaman, S.R., Masterman, T., Hensiek, A.E., Sawcer, S.J., Vukusic, S., Achiti, I., Confavreux, C., Coustans, M., le Page, E., Edan, G., McDonnell, G.V., Hawkins, S., Trojano, M., Liguori, M., Cocco, E., Marrosu, M.G., Tesser, F., Leone, M.A., Weber, A., Zipp, F., Mityerski, B., Epplen, J.T., Oturai, A., Sörensen, P.S., Celius, E.G., Lara, N.T., Montalban, X., Villoslada, P., Silva, A.M., Marta, M., Leite, I., Dubois, B., Rubio, J., Butzkueven, H., Kilpatrick, T., Mycko, M.P., Selmaj, K.W., Rio, M.E., Sá, M., Salemi, G., Savettieri, G., Hillert, J., Compston, D.A., 2005. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 64, 1144–1151.
- Sadovnick, A.D., 2012. Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmun. Rev.* 11, 163–166.
- Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., et al., 2011. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2. 2011. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214–219.
- Schmidt, H., Williamson, D., Ashley-Koch, A., 2007. HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review. *Am. J. Epidemiol.* 165, 1097–1109.
- Sombekke, M.H., Lukas, C., Crusius, J.B., Tejedor, D., Killestein, J., Arteta, D., Martínez, A., Uitehaag, B.M., Knol, D.L., Peña, A.S., Geurts, J.J., De Jager, P.L., Barkhof, F., Vrenken, H., Polman, C.H., 2009. HLA-DRB1\*1501 and spinal cord magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 2009 (66), 1531–1536.
- Sundström, P., Nyström, M., Ruuth, K., Lundgren, E., 2009. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1\*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 30 (215), 102–107.
- Vasconcelos, C.C., Fernández, O., Leyva, L., Thuler, L.C., Alvarenga, R.M., 2009. Does the DRB1\*1501 allele confer more severe and faster progression in primary progressive multiple sclerosis patients? HLA in primary progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 29 (214), 101–103.
- Weatherby, S.J., Thomson, W., Pepper, L., Donn, R., Worthington, J., Mann, C.L., Davies, M.B., Fryer, A.A., Boggild, M.D., Young, C.A., Jones, P.W., Strange, R.C., Ollier, W.E., Hawkins, C.P., 2001. HLA-DRB1 and disease outcome in multiple sclerosis. *J. Neurol.* 248, 304–310.
- Weinschenker, B.G., Santrach, P., Bissonet, A.S., McDonnell, S.K., Schaid, D., Moore, S.B., Rodriguez, M., 1998. Major histocompatibility complex class II alleles and the course and outcome of MS: a population-based study. *Neurology* 51, 742–747.
- Živković, M., Stanković, A., Dinčić, E., Popović, M., Popović, S., Raicević, R., Alavantić, D., 2009. The tag SNP for HLA-DRB1\*1501, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: cost-effective high-throughput detection by real-time PCR. *Clin. Chim. Acta* 406, 27–30.

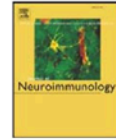
**Benešová Y, Vašků A, Štourač P, Hladíková M, Beránek M, Kadaňka Z, Novotná H, Bednařík J.**

Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; 205 (1-2): 105-109. **IF: 3.158**

### **Resumé**

Matrix metalloproteinázy hrají důležitou roli imunopatogenezi RS. Významně se podílí na progresi zánětlivého procesu, porušení hemato-encefalické bariéry, formování zánětlivých RS lézí a demyelinizaci. Cílem této studie bylo určit asociační vztah genetických polymorfismů (-1562 C/T, R+279Q) lokalizovaných v genu pro matrix metalloproteinázu-9 (MMP-9) a polymorfismů (-1306 C/T, -1575 G/A) v genu pro matrix metalloproteinázu-2 (MMP-2) s rizikem rozvoje RS; nalézt možné rozdíly mezi pohlavími a zjistit, zda ovlivňují tíži onemocnění a stupeň postižení. Do studie bylo zařazeno 244 pacientů s RS, diagnostikovanou dle Mc Donaldových kritérií, kontrolní soubor byl tvořen 132 zdravými jedinci. Genotypizace byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce a restriční analýzou. Klinický stav byl hodnocen pomocí Expanded Disability Status Scale, stupeň postižení byl spočítán podle Multiple Sclerosis Severity Score. Byl zjištěn signifikantní rozdíl alelové frekvence ( $P_a=0.01$ ,  $P_{acorr}=0.05$ ) mezi skupinou pacientů s RS a zdravými jedinci v distribuci -1562 C/T polymorfismu v genu pro MMP-9. Alela T se vyskytovala méně frekventně u pacientů s RS (OR-0.58, 95 % CI: 0.38-0.89). Signifikantní rozdíl byl také prokázán mezi nemocnými a zdravými ženami ( $P_a=0.01$ ,  $P_{acorr}=0.05$ ), (OR-0.53, 95 % CI: 0.32-0.86). Naše výsledky prokazují také frekventnější zastoupení homozygotů GG a heterozygotů GA v MMP-2 -1575G/A genetickém polymorfismu ve skupině RS pacientů. Tato data nasvědčují tomu, že nosičství alely -1575G by mohlo vést ke zvýšení produkce MMP-2 a tím ovlivnění etiopatogenetického procesu. V distribuci ostatních polymorfismů nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi RS skupinou a kontrolami.

Hlavním přínosem práce je průkaz signifikantní asociace polymorfismu (-1562 C/T) v genu pro MMP-9 s vyšším rizikem rozvoje RS, zejména u žen. Nebyla nalezena asociace vyšetřených genetických polymorfismů s tíží onemocnění ani stupněm postižení. Genetické varianty MMP-9 a MMP-2 se mohou podílet na zvýšené vnímavosti k RS v české populaci, což potvrzuje význam MMPs v imunopatogenezi RS a jejich možné využití jako biomarkeru v klinické praxi.



## Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis

Yvonne Benešová<sup>a,\*</sup>, Anna Vašků<sup>b</sup>, Pavel Štourač<sup>a</sup>, Magdalena Hladíková<sup>a</sup>, Michal Beránek<sup>b</sup>, Zdeněk Kadaňka<sup>a</sup>, Hana Novotná<sup>c</sup>, Josef Bednařík<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Pathological physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>c</sup> Department of Clinical Biochemistry and Hematology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 24 April 2008

Received in revised form 26 July 2008

Accepted 19 August 2008

#### Keywords:

Gene

Polymorphism

Matrix metalloproteinases

Multiple sclerosis

### ABSTRACT

We investigated the association of matrix metalloproteinase-9 (-1562C/T, +279R/Q) and matrix metalloproteinase-2 (-1575G/A, -1306C/T) gene polymorphisms with multiple sclerosis (MS) susceptibility, gender differences and disability in 244 patients and 132 healthy subjects. A significant decrease of the -1562T allele carriers in MS patients compared to controls ( $P=0.01$ ,  $P_{\text{corr}}=0.05$ ) in -1562C/T MMP-9 gene polymorphism was found, (odds ratio (OR) = 0.58, 95% confidence interval (CI): 0.38–0.89). Significant differences were also demonstrated between female patients and healthy females ( $P=0.01$ ,  $P_{\text{corr}}=0.05$ ), (OR = 0.53, 95% CI: 0.32–0.86). Other polymorphisms were not associated either with MS susceptibility or with phenotype of the disease. No association with disability was found.

© 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a progressive autoimmune disease characterised by inflammation, demyelination, and axonal degeneration of the central nervous system (CNS) (Hartung et al., 2004). The exact cause of inflammation remains unclear, but an autoimmune reaction directed against antigens of cerebral white matter has been proved (Hartung et al., 2004).

The active stage of the disease is characterised by the breakdown of the blood-brain barrier (BBB), perivascular infiltration of inflammatory cells in the CNS and demyelination (Proost et al., 1993). The migration of autoreactive immune cells through the BBB into the CNS is crucial to the formation of inflammatory MS lesions (Martin et al., 2000). An important role in this process is played by matrix metalloproteinases (MMPs). These form a family of at least 23 endopeptidases, capable of degrading all the protein components of the extracellular matrix (Chandler et al., 1995; Bar-Or et al., 2003; Souza et al., 2005). In multiple sclerosis, they are assumed to act as effector molecules in the disruption of the BBB, invasion of inflammatory cells into the CNS parenchyma and degradation of myelin basic protein (MBP) (Proost et al., 1993; Chandler et al., 1995; Leppert et al., 1998; Ram et al., 2006). Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), stromelysin-1, interstitial collagenase and matrilysin have

been shown to cleave MBP *in vitro* (Proost et al., 1993; Chandler et al., 1995; Leppert et al., 1998; Ram et al., 2006). Furthermore, within the CNS, tumor necrosis factor alpha converting enzyme (TACE), a membrane-bound disintegrin metalloproteinase (ADAM-17), has been demonstrated to be capable of processing the tumour necrosis factor alpha (TNF-alpha) membrane-bound precursor to its mature, biologically active form (Moss et al., 1997; Black et al., 1997). This inflammatory cytokine has been reported as toxic to oligodendrocytes (Hartung 1996; Soliven and Szuchet, 1995; Yushchenko et al., 2003).

In multiple sclerosis serum, cerebrospinal fluid and brain tissues, MMP-1, -2, -3, -7, -9 and MMP-12 have been reported as elevated (Anthony et al., 1997; Vos et al., 2003; Kurzepa et al., 2005).

Metalloproteinases are secreted by a wide range of cell types (Chandler et al., 1995; Bar-Or et al., 2003). T-cells and macrophages have been found to produce gelatinases, MMP-2 and MMP-9 (Welgus et al., 1990; Leppert et al., 1995). It has been shown that migration of Th1 cells isolated from the peripheral blood is dependent on the presence of gelatinases and that Th1 cells secrete higher amounts of MMP-2 and MMP-9 than do Th2 cells (Abraham et al., 2005). A higher expression of MMP-2, TIMP-2, and MMP-14 in the monocyte population has been found in MS patients as compared with control subjects (Bar-Or et al., 2003). Astrocytes and microglial cells can also be induced to produce gelatinases, as well as other MMPs, such as stromelysin (MMP-3) (Leppert et al., 1998).

The activity of the metalloproteinases is regulated at several different levels (Yushchenko et al., 2003): gene expression, proenzyme activation, and by the activity of the tissue inhibitors of matrix

\* Corresponding author. Department of Neurology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic. Tel.: +420 731103044; fax: +420 532232249.  
E-mail address: [benevo@seznam.cz](mailto:benevo@seznam.cz) (Y. Benešová).

metalloproteinases (TIMPs). Modulated expression of genes for these proteins is expected in MS. We may assume that mutations in the genes encoding these proteins may influence the expression level as well as the stability of mRNA, which could influence the aetiopathogenesis of the process.

Four polymorphisms of MMP-9 (-1562C/T, R +279Q) and MMP-2 (-1575G/A, -1306C/T) were included in this association study. Only a few genetic association studies have been reported that address polymorphisms in the MMP-9 gene (Fiotti et al., 2004; Nelissen et al., 2000; 2002; Živković et al., 2007) in relation to susceptibility to MS. The -1562 C>T polymorphism in the promoter region of the human MMP-9 gene has been associated with increased MMP-9 expression; the -1562T MMP-9 allele decreased the capacity of a putative repressor protein to bind the MMP-9 promoter, with subsequent increase in gene transcription in cultured macrophages (Zhang et al., 1999b). However, no study investigating the association of MMP-2 gene polymorphisms with susceptibility to MS has been reported. The aim of this study was to investigate the possible association of MMP-9 (-1562C/T, R +279Q) and MMP-2 (-1575G/A, -1306C/T) gene polymorphisms with MS susceptibility; to find potential gender differences in these candidate gene polymorphisms with MS susceptibility; and to investigate whether these polymorphisms influence the disability.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The study was designed as a case-control study. A total of 376 unrelated Caucasian subjects were enrolled in the study. The study group consisted of 244 patients, fulfilling McDonald's criteria of MS (McDonald et al., 2001), with a mean age of 38.4±10.2 years (mean±S.D.), 181 females, and 63 males. The mean duration of the disease was 7.5±5.9 years (mean±S.D.). The control group consisted of 132 healthy volunteers, with a mean age of 35.6±11.7 years (mean±S.D.), 87 females, and 45 males. All patients were recruited from the Department of Neurology of the University Hospital Brno and were examined in a specialised MS centre by the same specialist neurologist (Y.B.). Clinical status was evaluated according to the Expanded Disability Status Scale (EDSS) (Kurtzke, 1983) and the disease severity were calculated according to the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (Roxburgh et al., 2005).

The study was approved by the local ethics committee. Prior to enrolment, all subjects gave their informed consent in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki.

Table 1  
Primer sequences, annealing temperatures for analysis of MMP-9, MMP-2 genes

Polymorphism	Primer sequence (sense/antisense)	PCR (temperature °C, time)
MMP-9 -1562C/T	5' ATGCTCATGCCCGTAATCT 3'	95/3'
	5' TGGGAAAAACCTGCTAACAACT 3'	94/30"-65/20"-72/40" (34×) 72/7' 10/10'
MMP-9 R +279Q	5' CTCGCCCCAGGACTCTACAC 3'	95/3'
	5' GTGCAGGGCGGAGTAGGATT 3'	94/20"-59.5/10"-72/10" (35×) 72/7' 10/10'
MMP-2 -1575G/A	5' ACTGACTCTGGAAAGTCAGAGCA 3'	95/3'
	5' GGCACAGGGTGAGGGGATGG 3'	94/50"-60/40"-72/50" (30×) 72/7' 10/10'
MMP-2 -1306C/T	5' CTTCTAGGCTGGTCTTACTGA 3'	95/4'
	5' CTGAGACCTGAAGAGCTAAAGACT 3'	95/45"-48.6/35"-72/45" (35×) 72/5' 10/10'

PCR – polymerase chain reaction.

Table 2  
Restriction enzymes, conditions and product lengths for analysis of MMP-9, MMP-2 genes

Polymorphism	Restriction enzyme	Conditions	Fragment length (bp)
MMP-9 -1562C/T	Pae I GCATG <sub>1</sub> C	37 °C for 4 h: PCR product 15 µl, H <sub>2</sub> O 2.7 µl, buffer B + BSA 2 µl, Pae I 3 U	CC 329, /329, bp TT 144,185/ 144,185, bp
		30 °C for 4 h: PCR product 15 µl, H <sub>2</sub> O 2.7 µl, buffer Y + /Tango 2 µl, Sma I 3 U	GG 22, 73, /22, 73, bp AA 95, /95, bp GA 22, 73, /95, bp
MMP-2 -1306C/T	Xsp I C <sub>1</sub> TAG	37 °C for 4 h: PCR product 10 µl, H <sub>2</sub> O 3.2 µl, buffer K 15 µl, Xsp I 3 U	CC 188, 5/188, 5 TT 162, 265/162, 26, 5 CT 188, 5/162, 26, 5
		65 °C for 4 h: PCR product 15 µl, H <sub>2</sub> O 2.7 µl, buffer NEB 1.2 µl, Tsp45I 1.2U	GG 113, 156/ 113, 156 AA 269/269 GA 113, 156/269

2.2. MMPs genotyping

Genomic DNA was isolated from peripheral blood leukocytes by standard technique using proteinase K. Genotyping in MMPs genes was performed with polymerase chain reaction (PCR) methods and restriction analysis. Detection of known polymorphisms was performed by polymerase chain reaction with sequence-specific primers (PCR-SSP), proposed by original authors after (Vašků et al., 2004; Zhang et al., 1999a).

Detailed descriptions of the methods used are summarised in Tables 1 and 2.

2.3. Statistical analysis

In the case-control study, comparisons were made between genotype distributions and allelic frequencies in the disease and control groups. Differences in genotype distributions were tested by the chi-square test and differences in allele frequencies of single nucleotide polymorphisms by a two-tail Fisher exact test. Differences in genotype distribution from those expected by Hardy-Weinberg equilibrium were evaluated by chi-square test; odds ratio (OR), 95% confidence intervals (CI), and significance values, using the usual methods.

Normally distributed metric parameters are presented as mean±standard deviation (S.D.). The normal distribution was checked for normality by the Kolmogorov-Smirnov test. The Bonferroni correction for multiple comparison (P<sub>corr</sub>) was calculated where appropriate. Values of p≤0.05 were considered to be statistically significant. A Kruskal-Wallis ANOVA test was used for the comparison of genotypes with disability as expressed by EDSS and MSSS. Statistical analysis was performed using the STATISTICA package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), version 8.

3. Results

3.1. Genetic association study

Genotype and allele frequencies of MMP-9 (-1562C/T, R +279Q) and MMP-2 (-1575G/A, -1306 C/T) in MS patients and controls are shown in Table 3.

The genotype distribution of polymorphisms did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium in any group.

A significantly lower frequency of the -1562T allele carrier was found in MS patients compared to healthy controls (P<sub>a</sub>=0.01, P<sub>corr</sub>=0.05) in -1562C/T MMP-9 gene polymorphism. The T-allele carriers were less frequent in patients with MS (OR=0.58, 95% CI:0.38–0.89). However, the difference in genotype distribution between the MS group and the control group did not remain significant after correction for multiple comparison (P<sub>g</sub>=0.03, P<sub>gcorr</sub>=0.15).



**Table 3**  
Comparisons of genotype and allele frequency between MS and the control groups

Polymorphism	Genotype	Genotype	Genotype	Pg	Pcorr	Allele	Allele	Pa	Pcorr
-1562C/T MMP-9	CC [%]	CT [%]	TT [%]	0.03	NS	C [%]	T [%]	0.01	0.05
MS (N=244)	191/244 [78.3]	50/244 [20.5]	3/244 [1.2]			432/488 [88.5]	56/488 [11.5]		
Control (N=132)	87/132 [65.9]	42/132 [31.8]	3/132 [2.3]			216/264 [81.8]	48/264 [18.2]		
R + 279Q MMP-9	RR [%]	RQ [%]	QQ [%]	0.56	NS	R [%]	Q [%]	0.276	NS
MS (N=111)	49/111 [44.15]	49/111 [44.15]	13/111 [11.7]			147/222 [66.2]	75/222 [33.8]		
Control (N=87)	33/87 [38]	40/87 [46]	14/87 [16]			106/174 [60.9]	68/174 [39.1]		
-1575G/A MMP-2	GG [%]	GA [%]	AA [%]	0.04	NS	G [%]	A [%]	0.122	NS
MS (N=240)	143/240 [59.6]	84/240 [35]	13/240 [5.4]			370/480 [77.1]	110/480 [22.9]		
Control (N=132)	75/132 [56.8]	40/132 [30.3]	17/132 [12.9]			190/264 [72]	74/264 [28]		
-1306C/T MMP-2	CC [%]	CT [%]	TT [%]	0.11	NS	C [%]	T [%]	0.111	NS
MS (N=244)	151/244 [61.9]	79/244 [32.4]	14/244 [5.7]			381/488 [78.1]	107/488 [21.9]		
Control (N=125)	72/125 [57.6]	38/125 [30.4]	15/125 [12]			182/250 [72.8]	68/250 [27.2]		

Pg – probability of differences in genotype distribution; Pa – probability of differences in allelic frequency; MS – multiple sclerosis group; Control – control group; NS – non-significant difference; N – number; Pcorr – Bonferroni correction.

**Table 4**  
Comparisons of genotype and allele frequency in MMP-9 -1562C/T gene polymorphism between female MS and female controls

Polymorphism	Genotype	Genotype	Genotype	Pg	Pcorr	Allele	Allele	Pa	Pcorr
-1562C/T MMP-9	CC [%]	CT [%]	TT [%]	0.04	NS	C [%]	T [%]	0.01	0.05
Female MS (N=181)	142/181 [78.5]	37/181 [20.4]	2/181 [1.1]			321/362 [88.7]	41/362 [11.3]		
Female controls (N=87)	56/87 [64.4]	28/87 [32.2]	3/87 [3.4]			140/174 [80.5]	34/174 [19.5]		

Pg – probability of differences in genotype distribution; Pa – probability of differences in allelic frequency; Female MS – female multiple sclerosis group; Female controls – female control group; NS – non-significant difference; N – number; Pcorr – Bonferroni correction.

Similarly, we demonstrated a significant difference in genotype distribution ( $P_g=0.04$ ) between the MS group and the control group in -1575G/A MMP-2 polymorphism. The homozygotes GG and the heterozygotes GA were more frequent in MS patients (OR=2.58, 95% CI:1.21–5.50). However, after correction for multiple comparison the difference did not remain significant ( $P_{gcorr}=0.2$ ).

In MMP-9 R + 279Q, MMP-2 -1306C/T gene polymorphisms, no statistically significant differences between MS patients and controls were observed.

### 3.2. Genotype-phenotype study

#### 3.2.1. Genotypes and gender difference

Genotype and allele frequencies of -1562C/T MMP-9 in female patients and female controls are shown in Table 4.

Significant differences were demonstrated in -1562T allele frequency ( $P_a=0.01$ ,  $P_{acorr}=0.05$ ), but not in genotype distribution ( $P_g=0.04$ ,  $P_{gcorr}=0.2$ ) between female patients and healthy females in -1562C/T MMP-9 polymorphism. The T-allele carriers were less frequent in female MS patients (OR=0.53, 95% CI:0.32–0.86).

#### 3.2.2. Genotypes and disability

A comparison of genotypes with disability as expressed by MSSS are shown in Table 5.

The mean EDSS score in the whole MS group was  $3.5 \pm 1.8$  (mean  $\pm$  S.D.). We found no significant associations of genotypes with disability as expressed by EDSS. Similarly, no associations of genotypes with disability described by MSSS score according to Roxburgh et al. were observed. The MSSS score in the whole MS group was calculated as  $5.39 \pm 2.38$  (mean  $\pm$  S.D.).

## 4. Discussion

Only a few genetic association studies of the relationship between polymorphisms in the MMP-9 gene (Fiotti et al., 2004; Nelissen et al., 2000; 2002; Živković et al., 2007) and susceptibility to MS have been previously reported, and there has been no concordance in these

findings. Our results showed a significant decrease in the T allele of -1562C/T MMP-9 gene polymorphism in MS patients. Similarly, a trend toward decreased frequency of T allele carriage of -1562C/T MMP-9 gene polymorphism in MS in the Serbian population has been described (Živković et al., 2007). Further, in the Živković study, a significant decrease in T allele carrier frequency in female patients with MS compared to female healthy controls was revealed. Allele T frequency in female patients was 10%, in female controls 17%. Our results are parallel. When the patient group was divided according to gender, we were able to demonstrate a significant difference between female patients and healthy females in MMP-9 -1562C/T gene polymorphism. Allele T frequency in our female patients with MS was 11.3% compared with 19.5% in female controls. We confirmed that the -1562T allele carriers were less frequent in the female patients with MS. However, Nelissen, in a case-control analysis of 345 Swedish individuals and in a study of 125 Sardinian simplex families, found no genetic association between -1562C/T gelatinase B gene polymorphism, CA microsatellite repeats and MS susceptibility (Nelissen et al., 2000) and to date, no other genetic association studies investigating -1562 C/T MMP-9 gene polymorphism in MS patients have been done. On the other hand, polymorphism in the microsatellite of the

**Table 5**  
Comparison of genotypes with disability as expressed by MSSS

Polymorphism	MSSS score (mean value)	H	P	P-value
-1562C/T MMP-9	CC: 5.263 CT: 5.919 TT: 4.824	2.713	0.258	0.276
R + 279Q MMP-9	RR: 5.041 RQ: 5.162 QQ: 4.773	0.621	0.733	0.763
-1575G/A MMP-2	GG: 5.442 GA: 5.426 AA: 4.658	1.150	0.563	0.560
-1306C/T MMP-2	CC: 5.479 CT: 5.319 TT: 4.561	1.845	0.398	0.415

MSSS – Multiple Sclerosis Severity Score; H = Kruskal–Wallis test criterion; P-value after 1000 permutations (Kruskal–Wallis ANOVA).

promoter region of MMP-9 was reported to play a role in susceptibility to multiple sclerosis in Italian MS patients (Fiotti et al., 2004). Several studies have shown that MMP-9 is up-regulated in MS (Abraham et al., 2005; Goodin et al., 2002; Lindberg et al., 2001; Leppert et al., 1998; Waubant et al., 2003), especially during periods of inflammatory disease activity (Hartung et al., 2004; Liuzzi et al., 2002). It has previously been described that the changes in the promoter region of the -1562 C/T MMP-9 gene polymorphism influence transcription in an allele-specific manner; the -1562 C>T polymorphism has been associated with increased MMP-9 expression (Zhang et al., 1999b). A similar presence of the rarer T allele in patients with another autoimmune disease – primary Sjogren's syndrome – has also been described (Hulkkonen et al., 2004), indicating a possible analogous basis in autoimmune processes.

To date, no genetic association study of MMP-2 gene variability and MS has been carried out. A number of genetic studies have focused on the association of MMP-2 gene polymorphisms with susceptibility to some other disorders. A relationship between MMP-2 -1575G/A gene polymorphisms and invasive colorectal cancer has been described (Xu et al., 2007). It has previously been indicated that the -1575G allele increases MMP-2 promoter activity, whereas the -1575A allele loses its transcription activation (Xu et al., 2007). Our results indicate a trend towards a higher frequency of GG and GA genotypes in MMP-2 -1575G/A gene polymorphism in patients with MS. These data suggest that carriage of the -1575 G allele may influence the MS disease process through higher MMP-2 serum level production.

The -1575G MMP-2 gene allele is in linkage disequilibrium with the functionally described -1306C/T allele of the gene (Vašků et al., 2004). The T allele of -1306 C/T MMP-2 gene polymorphism was associated with a lower promoter activity due to disruption of the Sp1-binding site *in vitro*. The cellular transcription factor SP1 binds to critical regulatory elements in a variety of cellular and viral promoters. The absence of an Sp1 consensus sequence in the MMP-2 -1306T allele would produce a lower level of MMP-2 protein in individuals carrying the CT or TT genotype than in those carrying the CC genotype (Price et al., 2001). However, no significant association was observed between this polymorphism and multiple sclerosis in our study group. We did not find any significant associations of genotypes with disability as expressed by either EDSS or MSSS score.

We enrolled 376 Czech subjects in this direct, association, case-control study (Cordell and Clayton, 2005). This is the third independent association study between -1562C/T gelatinase B gene polymorphism and MS susceptibility. We confirmed the Živkovič results, that -1562T allele carriers were less frequent in female patients with MS (Živkovič et al., 2007). However, Nelissen did not find such an association (Nelissen et al., 2000). Considering the results of these independent, association studies, which are not consistent, further studies in larger populations should be done to examine the results presented. Functional studies are also needed to clarify the position of MMPs in the pathophysiology of MS.

In conclusion, we confirmed that the genotypes and alleles of MMP-9 -1562C/T gene polymorphism were associated with higher MS susceptibility, and with higher MS susceptibility in female patients. No association of the studied gene polymorphisms with disability was found. Their impact on the understanding of the pathophysiology of MS and on the practical management of MS patients, remains, however, to be established.

#### Acknowledgement

The study was supported by grant Matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis of multiple sclerosis, NR/8832-4 IGA from the Ministry of Health of the Czech Republic.

#### References

- Abraham, M., Shapiro, S., Karni, A., Weiner, H.L., Miller, A., 2005. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J. Neuroimmunol.* 163, 157–164.
- Anthony, D.C., Ferguson, B., Matyzak, M.K., Miller, K.M., Esiri, M.M., Perry, V.H., 1997. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 23, 406–415.
- Bar-Or, A., Nuttall, R.K., Duddy, M., Alter, A., Kim, H.J., Ifergan, I., Pennington, C.J., Bourgoin, P., Edwards, D.R., Yong, W., 2003. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as a major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 126, 2738–2749.
- Black, R.A., Rauch, C.T., Kozlosky, C.J., Peschon, J.J., Slack, J.L., Wolfson, M.F., Castner, B.J., Stocking, K.L., Reddy, P., Srinivasan, S., Nelson, N., Boiani, N., Schooley, K.A., Gerhart, M., Davis, R., Fitzner, J.N., Johnson, R.S., Paxton, R.J., March, C.J., Cerretti, D.P., 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385, 729–733.
- Chandler, S., Coates, R., Gearing, A., Lury, J., Wells, G., Bone, E., 1995. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci. Lett.* 201, 223–226.
- Cordell, H.J., Clayton, D.G., 2005. Genetic association studies. *Lancet* 366, 1121–1131.
- Fiotti, N., Zivadinov, R., Altamura, N., Nasuelli, D., Bratina, A., Tommasi, M.A., Bosco, A., Locatelli, L., Grop, A., Cazzato, G., Guarnieri, G., Giansante, C., Zorzon, M., 2004. MMP-9 microsatellite polymorphism and multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 152, 147–153.
- Goodin, D.S., Frohman, E.M., Garmany, G.P., Halper, J., Likosky, W.H., Lublin, F.D., Silberberg, D.H., Stuart, W.H., van den Noort, S., 2002. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 58, 169–178.
- Hartung, H.P., 1996. Pathogenesis of multiple sclerosis: status of research. *Wien Med. Wochenschr.* 146, 520–527.
- Hartung, H.P., Bar-Or, A., Zoukos, Y., 2004. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J. Neurol.* 251, 12–29.
- Hulkkonen, J., Petrovaara, M., Antonen, J., Pasternac, A., Hurme, M., Pollanen, P., Lehtimäki, T., 2004. Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) gene polymorphism and MMP-9 plasma levels in primary Sjogren's syndrome. *Rheumatology* 43, 1476–1479.
- Kurtzke, J.F., 1983. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 33, 1444–1452.
- Kurzepa, J., Bartosik-Psujek, H., Suchozebska-Jesionek, D., Rejdek, K., Strycka-Zimmer, M., Stelmasiak, Z., 2005. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurol. Neurochir. Pol.* 39, 63–67.
- Leppert, D., Ford, J., Stabler, G., Grygar, C., Liener, C., Huber, S., Miller, K.M., Hauser, S.L., Kappos, L., 1998. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 121, 2327–2334.
- Leppert, D., Waubant, E., Galardy, R., Bunnett, N.W., Hauser, S.L., 1995. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration *in vitro*. *J. Immunol.* 154, 4379–4389.
- Lindberg, R.L., De Groot, C.J., Montagne, L., Freitag, P., Valk, P., Kappos, L., Leppert, D., 2001. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 124, 1743–1753.
- Liuzzi, G.M., Trojano, M., Fanelli, M., Avolio, C., Fasano, A., Livrea, P., Riccio, P., 2002. Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis. *Mult. Scler.* 8, 222–228.
- Martin, R., Bielekova, B., Gran, B., McFarland, H.F., 2000. Lessons from studies of antigen-specific T cell responses in multiple sclerosis. *J. Neural Transm. Suppl.* 60, 361–373.
- McDonald, W.I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H.P., Lublin, F.D., McFarland, H.R., Paty, D.W., Polman, C.H., Reingold, S.C., Sanberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinschenker, B.Y., Wolinsky, J.S., 2001. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from International Panel on the Diagnosis of Multiple sclerosis. A from International Panel on the Diagnosis of Multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 50, 121–127.
- Moss, M.L., Jin, S.L., Milla, M.E., Bickett, D.M., Burkhart, W., Cartner, H.L., Chen, W.J., Clay, W.C., Didsbury, J.R., Hassler, D., Hoffman, C.R., Kost, T.A., Lambert, M.H., Leesnitzer, M.A., McCauley, P., McGeehan, G., Mitchell, J., Moyer, M., Pahl, G., Roque, W., Overton, L.K., Schoenen, F., Seaton, T., Su, J.L., Warner, J., Willard, D., Becherer, J.D., 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor- $\alpha$ . *Nature* 385, 733–736.
- Nelissen, I., Dubois, B., Goris, A., Ronsse, I., Carton, H., Opedenacker, G., 2002. Gelatinase B, PECAM-1 and MCP-3 gene polymorphisms in Belgian multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* 200, 43–48.
- Nelissen, I., Vandenbroeck, K., Fiten, P., Hillert, J., Olsson, T., Marrosu, M.G., Opedenacker, G., 2000. Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not susceptibility factor for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 105, 58–63.
- Price, S.J., Greaves, D.R., Watkins, H., 2001. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele specific transcriptional regulation. *J. Biol. Chem.* 276, 7549–7558.
- Proost, P., Van Damme, J., Opedenacker, G., 1993. Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 192, 1175–1181.
- Ram, M., Sherer, Y., Shoenfeld, Y., 2006. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J. Clin. Immunol.* 26, 299–307.
- Roxburgh, R.H., Seaman, S.R., Masterman, T., Hensiek, A.E., Sawcer, S.J., Vukusic, S., Achiti, I., Confavreux, C., Coustans, M., le Page, E., Edan, G., McDonnell, G.V., Hawkins, S., Trojano, M., Liguori, M., Cocco, E., Marrosu, M.G., Tesser, F., Leone, M.A., Weber, A., Zipp, F., Mitriski, B., Epplen, J.T., Oturai, A., Sørensen, P.S., Celius, E.G.,



- Lara, N.T., Montalban, X., Villoslada, P., Silva, A.M., Marta, M., Leite, I., Dubois, B., Rubio, J., Butzkueven, H., Kilpatrick, T., Mycko, M.P., Selmaj, K.W., Rio, M.E., Sá, M., Salemi, G., Savettieri, G., Hillert, J., Compston, D.A., 2005. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 64, 1144–1151.
- Soliven, B., Szuchet, S., 1995. Signal transduction pathways in oligodendrocytes: role of tumor necrosis factor- $\alpha$ . *Int. J. Dev. Neurosci.* 13, 351–367.
- Souza, A.P., Trevillato, P.C., Scarel-Caminaga, R.M., Brito, R.B., Barros, S.P., Line, S.P., 2005. Analysis of the MMP-9 (C-1562T) and TIMP-2 (G-418C) gene promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J. Clin. Periodontol.* 32, 207–211.
- Vašků, A., Goldbergová, M., Izakovičová Holá, L., Sisková, L., Groch, L., Beránek, M., Tschoplová, S., Znojil, V., Vácha, J., 2004. A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790 T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol.* 22, 585–591.
- Vos, C.M.P., van Haastert, E.S., de Groot, C.J.A., van der Valk, P., Vries, H.E., 2003. Matrix metalloproteinase-12 is expressed phagocytosis macrophages in active multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 138, 106–114.
- Waubant, E., Goodkin, D., Bostrom, A., Bacchetti, P., Hietpas, J., Lindberg, R., Leppert, D., 2003. IFN beta lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS. *Neurology* 60, 52–57.
- Welgus, H.G., Campbell, E.J., Cury, J.D., Eisen, A.Z., Senior, R.M., Wilhelm, S.M., Goldberg, G.J., 1990. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J. Clin. Invest.* 86, 1496–1502.
- Xu, E., Xia, X., Lu, B., Xing, X., Huang, Q., Ma, Y., Wang, W., Lai, M., 2007. Association of matrix metalloproteinase-2 and -9 promoter polymorphisms with colorectal cancer in China. *Mol. Carcinog.* 46, 924–929.
- Yushchenko, M., Mader, M., Elitok, E., Bitsch, A., Dressel, A., Tumani, H., Bogumil, T., Kitze, B., Poser, S., Weber, F., 2003. Interferon-beta-1b decreased matrix metalloproteinase-9 serum levels in primary progressive multiple sclerosis. *J. Neurol.* 250, 1224–1228.
- Zhang, B., Henney, A., Eriksson, P., Hamsten, A., Watkins, H., Ye, S., 1999a. Genetic variation at the matrix metalloproteinase-9 locus on chromosome 20q12.2–13.1. *Hum. Genet.* 105, 418–423.
- Zhang, B., Ye, S., Herrmann, S.M., Eriksson, P., Maat, M., Evans, A., Arveiler, D., Luc, G., Cambien, F., Hamsten, A., Watkins, H., Henney, A.M., 1999b. Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis. *Circulation* 99, 1788–1794.
- Živković, M., Djurić, T., Dinčić, E., Rajčević, R., Alavantić, D., Stanković, A., 2007. Matrix metalloproteinase-9-1562C/T gene polymorphism in Serbian patients with multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* 189, 147–150.

**Benešová Y, Vašků A, Štourač P, Hladíková M, Okáčová I, Bednařík J.**

Asociace polymorfizmů v genu pro matrix metalloproteinázu-2 a tkáňový inhibitor metalloproteinázy-2 s roztroušenou sklerózou. *Cesk Slov Neurol N* 2012; 75/3: 314-19. **IF: 0.279**

## **Resumé**

Významnou úlohu v imunopatogenezi roztroušené sklerózu hraje porucha hematoencefalické bariéry (HEB). Matrix metalloproteinazy (MMPs) se významně podílí na jejím rozrušení a tím umožňují migraci aktivovaných T-lymfocytů, zánětlivých buněk, plazmatických proteinů, autoprotilátek a komplementu do CNS a infiltraci lézí. Navíc v CNS štěpí myelinový bazický protein a aktivují prekursor TNF-alfa do jeho vyzrálé, biologicky aktivní formy, který je toxický pro oligodendrocyty. Klíčovou roli hraje pravděpodobně metalloproteinaza-9 (MMP-9), metalloproteinaza-2 (MMP-2) a jejich inhibitory. Jsou exprimovane T lymfocyty a monocyty, které jsou převažující populaci zánětlivých buněk v aktivních demyelinizačních plakach. V naší předchozí studii jsme prokazali hraniční asociaci polymorfizmu MMP-2-1575 G/A s RS. Jiné studie zabývající se vztahem genetických polymorfizmů lokalizovaných v genech pro MMP-2 a tkáňový inhibitor metalloproteinázy-2 (TIMP-2) s RS dosud nebyly provedeny. Cílem studie bylo prozkoumat, zda jsou polymorfismy v genu pro MMP-2 a TIMP-2 spojeny s RS nebo jejím průběhem; zda se vyskytují častěji u žen či u mužů, nebo ovlivňují tíži onemocnění a stupeň postižení. Vyšetřili jsme celkem 375 jedinců; 240 nemocných s klinicky definovanou RS a 135 zdravých jedinců v kontrolním souboru. Klinické postižení bylo stanoveno vyšetřovací škálou EDSS, stupeň postižení byl kvantifikován pomocí MSSS. Byly genotypizovány polymorfismy (-168G/T, -735 C/T) v genu pro MMP-2 a polymorfizmus +853 G/A v genu pro TIMP-2. U sledovaných polymorfizmů nebyla nalezena asociace mezi skupinou nemocných a zdravých jedinců. Po rozdělení souboru na skupiny podle průběhu onemocnění bylo v distribuci TIMP-2 +853G/A genetického polymorfizmu prokázáno četnější zastoupení homozygotů GG a heterozygotů GA ve skupině pacientů s RR RS ve srovnání s kontrolním souborem ( $P_g = 0.04$ ), (OR 1.46; 95 % CI: 0.91–2.36). Nebyl zjištěn rozdíl mezi pohlavími ani asociace s tíži onemocnění. Z výsledků naší studie vyplývá, že vyšetřene polymorfizmy nejsou rizikovým faktorem vnímavosti k RS v české populaci. Avšak po rozdělení na skupiny podle průběhu onemocnění bylo zjištěno, že polymorfizmus TIMP-2 +853G/A by mohl hrát určitou úlohu u RR RS. Podílí se na ovlivnění struktury mRNA či snížení aktivity TIMP-2. Vzhledem k tomu, že tento enzym specificky inhibuje MMP-2, dochází při jeho snížené

aktivitě ke zvýšené produkci MMP-2, což může vést k aktivaci zánětlivého procesu a progresi onemocnění.

## Asociace polymorfizmů v genu pro matrix metalloproteinázu-2 a tkáňový inhibitor metalloproteinázy-2 s roztroušenou sklerózou

### An Association between Matrix Metalloproteinase-2 and TIMP-2 +853G/A Gene Polymorphisms and Multiple Sclerosis

#### Souhrn

**Úvod:** Matrix metalloproteinázy (MMPs) hrají důležitou roli v imunopatogenezi roztroušené sklerózy (RS). Významně se podílejí na progresi zánětlivého procesu, porušení hemato-encefalické bariéry, formování zánětlivých RS lézí a demyelinizaci. Jedná se zejména o metalloproteinázu-9 (MMP-9) a metalloproteinázu-2 (MMP-2), exprimované T lymfocyty a monocyty, které jsou převažující populací zánětlivých buněk v aktivních demyelinizačních plakách. V naší předchozí studii jsme prokázali hraniční asociaci polymorfismu MMP-2-1575G/A s RS. Jiné studie zabývající se vztahem genetických polymorfizmů lokalizovaných v genech pro MMP-2 a tkáňový inhibitor metalloproteinázy-2 (TIMP-2) s RS dosud nebyly provedeny. **Cíl:** Cílem práce bylo určit asociční vztah genetických polymorfizmů (-168G/T, -735C/T) lokalizovaných v genu pro MMP-2 a polymorfismu +853G/A v genu pro TIMP-2 s vnímavostí k RS; nalézt možné rozdíly mezi pohlavími a zjistit, zda ovlivňují tíži onemocnění a stupeň postižení. **Soubor a metodika:** Do studie bylo zařazeno 240 pacientů s RS, diagnostikovanou dle McDonaldových kritérií, kontrolní soubor byl tvořen 135 zdravými jedinci. Klinický stav byl hodnocen pomocí Expanded Disability Status Scale (EDSS), stupeň postižení byl kvantifikován pomocí Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). Genotypizace byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce a restrikční analýzou. **Výsledky:** Byla prokázána hraniční asociace v distribuci TIMP-2 +853G/A genetického polymorfismu s rizikem rozvoje relabující-remitentní RS ( $P_g = 0,04$ ), odds ratio (OR) 1,46; 95% Confidence Interval (CI): 0,91–2,36). V distribuci ostatních vyšetřených polymorfizmů asociace nalezena nebyla. Nebyl zjištěn rozdíl mezi pohlavími ani asociace s tíží onemocnění. **Závěr:** Vyšetřené polymorfizmy nejsou rizikovým faktorem vnímavosti k RS v české populaci.

#### Abstract

**Background:** Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the immunopathogenesis of multiple sclerosis (MS). They are notable contributors to the progression of inflammatory process, blood-brain barrier disruption, formation of MS lesions and demyelination. The matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) are the most important. They are expressed by T-lymphocytes and monocytes, the predominant group of inflammatory cells in active demyelinating plaques. In our previous study, we demonstrated a borderline association of MMP-2-1575G/A gene polymorphism with MS susceptibility. To date, no other genetic association study involving MMP-2 and (tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) gene variability and MS have been carried out. **Objective:** The aim of this study was to investigate the possible association of MMP-2 (-168G/T, -735C/T) and TIMP-2 (+853G/A) gene polymorphisms with MS susceptibility; to find potential gender differences; and to investigate whether these polymorphisms influence disability. **Materials and methods:** A study group consisted of 240 patients fulfilling McDonald's criteria of MS, a control group consisted of 135 healthy volunteers. Clinical status was evaluated with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the disease severity was calculated using the MS Severity Score (MSSS). Polymerase chain reaction (PCR) methods and restriction analysis were used for genotyping in MMPs genes. **Results:** We demonstrated a borderline association between TIMP-2 +853G/A gene polymorphism and a risk of developing relapsing-remitting MS ( $P_g = 0,04$ ), odds ratio (OR), 1.46; 95% confidence interval (CI): 0.91–2.36). Other polymorphisms were associated neither with MS susceptibility nor with the disease phenotype. No association with disability was found. **Conclusion:** MMP-2 and TIMP-2 gene polymorphisms are not a risk factor for MS susceptibility in the Czech population.

Y. Benešová<sup>1</sup>, A. Vašků<sup>2</sup>,  
P. Štourač<sup>1,3</sup>, M. Hladíková<sup>1</sup>,  
I. Okáčová<sup>1</sup>, J. Bednařík<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Neurologická klinika LF MU  
a FN Brno

<sup>2</sup> Ústav patologické fyziologie,  
LF MU, Brno

<sup>3</sup> CEITEC – Středoevropský technolo-  
gický institut, MU, Brno



MUDr. Yvonne Benešová, Ph.D.  
Neurologická klinika  
LF MU a FN Brno  
Jihlavská 20  
625 00 Brno  
email: benes@fnbrno.cz

Přijato k recenzi: 8. 8. 2011  
Přijato do tisku: 22. 12. 2011

#### Klíčová slova

genetické polymorfizmy – matrix metallo-  
proteinázy – roztroušená skleróza

#### Key words

gene polymorphism – matrix metallopro-  
teinases – multiple sclerosis

Práce byla vypracována s podporou grantu IGA MZ ČR č. NR 8832-4/2006: „Matrix metalloproteinázy v imunopatogenezi roztroušené sklerózy“ a díky projektu „CEITEC – Středoevropský technologický institut“ (CZ.1.05/1.1.00/02.0068) z Evropského fondu regionálního rozvoje.

## Úvod

Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je chronické, zánětlivé, autoimunitní onemocnění centrálního nervového systému (CNS), vedoucí ke ztrátě myelinu v zánětlivých ložiscích bílé hmoty a postižení axonů [1].

Jedná se o komplexní onemocnění, jehož rozvoj a progresi ovlivňuje několik patofyziologických procesů, které nejsou rovnoměrně zastoupeny u jednotlivých pacientů a podmiňují různý klinický průběh, prognózu a efekt léčby [2]. Migrace aktivovaných lymfocytů, makrofágů, zánětlivých buněk, autoprotilátok a komplementu přes hemato-encefalickou bariéru (HEB) do CNS je považováno za klíčové pro aktivitu onemocnění a formování zánětlivých RS lézí [3,4]. Důležitou roli v tomto procesu hrají adhezivní molekuly, chemokiny a matrix metalloproteinázy (MMPs).

MMPs jsou enzymy, které se podílejí na remodelaci tkání za normálních i patologických stavů a jsou schopné degradovat většinu proteinových složek základní mezibuněčné hmoty [5–7]. Je známo nejméně 26 MMPs [8,9], jejichž exprese byla zjištěna v různých buněčných populacích, zejména v T lymfocytech, monocytech a B lymfocytech [5,6]. Matrix metalloproteináza-2 (MMP-2), nazývaná také jako gelatináza A, hraje důležitou roli v patofyziologii RS. Dosavadní studie prokazují, že se spolu s matrix metalloproteinázou-9 (MMP-9) významně podílí na porušení HEB a štěpení myelinového bazického proteinu [5,10–12] u RS a experimentální autoimunitní encefalomyelitidy [13–16].

MMP-9 hraje významnou roli také v patogenezi mnoha dalších, zejména autoimunitních onemocnění – např. u systémového lupusu, revmatoidní artritidy, systémové sklerózy, arteriosklerózy a kardiovaskulárních onemocnění [17]. Byla zjištěna zvýšená exprese MMP-9 v nestabilních plakách ve studii 41 pacientů po endarterektomii [18]. Další experimentální studie na zvířecím modelu prokázala signifikantně zvýšenou expresi MMP-9 v kortexu ischemického ložiska po podání intravenózní trombolýzy s užitím tkáňového aktivátoru plazminogenu [19].

Gelatináza A je exprimována nejen periferními leukocyty, ale také astrocyty, neurony a endoteliálními buňkami v CNS [20–23]. Byla prokázána zvýšená exprese MMP-2, tkáňového inhibitoru metalloproteináz-2 (TIMP-2) a MMP-14

monocyty u RS pacientů ve srovnání se zdravými jedinci [6]. Vzhledem k tomu, že monocyty se v CNS transformují na makrofágy a mikroglia, které tvoří hlavní populaci zánětlivých buněk v aktivních demyelinizačních plakách [6], MMP-2 se pravděpodobně významně podílí na progresi zánětlivého procesu a vlastního onemocnění.

Byla nalezena zvýšená hladina MMP-2 v séru [24,25] u primárně progresivní RS, zvýšená exprese mRNA v periferních mononukleárech (PBMC) u RS pacientů [14] a v chronických demyelinizačních lézích [15,26,27]. Autoři Fairardi et al (2009) prokázali zvýšenou hladinu aktivní MMP-2 intratékálně a zvýšený poměr MMP-2/TIMP-2 v mozkomíšním moku a séru u RS pacientů ve srovnání s nezánnětlivými a jinými zánětlivými stavy [28].

Expresie a aktivita MMPs je regulována na několika úrovních: genové exprese; transkripce, zahrnující cytokiny a růstové faktory [5,6,8,29,30]; aktivace proenzymu; sekrece enzymu [31,32]; je inhibována specificky tkáňovými inhibitory (TIMPs), které se váží na proformy nebo aktivované MMPs a nespecificky alfa-2 makroglobulinem. Dochází k modifikované expresi genů kódujících tyto proteiny. Mutace těchto genů pravděpodobně ovlivňuje stupeň exprese, stabilitu mRNA a vlastnosti daných proteinů, což může ovlivnit etiopatogenezi procesu.

V naší předchozí studii jsme prokázali hraniční asociaci polymorfismu MMP-2 –1575G/A s RS [33]. Jiné studie zabývající se vztahem genetických polymorfizmů lokalizovaných v genech pro MMP-2 a TIMP-2 s RS dosud nebyly provedeny. Z tohoto důvodu jsme vyšetřili další funkční polymorfismy lokalizované v těchto kandidátních genech.

Cílem práce je analýza genetických polymorfizmů (–168G/T, –735C/T) lokalizovaných v genu pro MMP-2 a polymorfismu +853 G/A v genu pro TIMP-2, stanovení frekvence alel a genotypové distribuce ve studovaném souboru. Určit asociční vztah s vnímavostí k RS; nalézt možné rozdíly mezi pohlavími a zjistit, zda ovlivňují tíži onemocnění a stupeň postižení.

## Materiál a metodika

### Charakteristika souboru

Demografická data jsou shrnuta v tab. 1.

Jedná se o studii typu case-control. Bylo do ní zařazeno 375 jedinců, 240 pacientů s RS, diagnostikovanou dle revidovaných McDonaldových kritérií [34], průměrný věk  $38 \pm 10,2$  let ( $x \pm SD$ ), 181 žen a 59 mužů. Průměrná délka onemocnění činila  $7,5 \pm 6,3$  let ( $x \pm SD$ ). Kontrolní soubor byl tvořen 135 zdravými jedinci, průměrný věk  $36 \pm 11,9$  let ( $x \pm SD$ ), 85 žen a 50 mužů. Klinický stav byl hodnocen pomocí Expanded Disability Status Scale (EDSS) mimo ataku [35]. Stupeň postižení byl počítán podle Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) (graf 1) [36]. Nemocní byli rozděleni podle formy onemocnění do skupin následovně: 182 pacientů s relabující remitentní RS (RRRS), 32 nemocných s sekundárně chronicko-progresivní RS (SPRS) a 26 nemocných s primárně progresivní RS (PPRS) formou onemocnění.

Všichni pacienti byli vyšetřeni ve specializovaném centru pro RS stejným lékařem (YB). Studie byla schválena etickou komisí FN Brno a všichni jedinci podepsali informovaný souhlas před vstupem do studie.

### Genetická analýza

Genotypizace byla provedena metodou polymerázové řetězové re-

Tab. 1. Demografická data.

Skupina	n	Věk $x \pm SD$	EDSS $x \pm SD$	MSSS $x \pm SD$	Muži/ženy
RS	240	38,5 (10,2)	3,5 (1,8)	5,6 (2,3)	59/181
RRMS	182	35 (8,8)	2,7 (1,1)	4,8 (2,1)	40/142
SPMS	32	46 (10,1)	5,6 (1,2)	7,1 (1,8)	9/23
PPMS	26	48 (10,1)	6,1 (1,3)	7,8 (1,6)	10/16
kontroly	135	36 (11,9)	-	-	50/85

RS – roztroušená skleróza; RRRS – relabující-remitentní roztroušená skleróza; SPRS – sekundárně-progresivní roztroušená skleróza; PPRS – primárně progresivní roztroušená skleróza; EDSS – Expanded Disability Status Scale



## ASOCIACE POLYMORFISMŮ V GENU PRO MATRIX METALLOPROTEINÁZU-2 A TKÁŇOVÝ INHIBITOR

akce (PCR) a restrikční analýzou. DNA byla izolována z leukocytů periferní krve pomocí metody s využitím proteinázy K. Izolace DNA spočívala v lýze buněk v roztoku, který obsahuje 10 mM Tris-HCl (pH = 8,5); 0,1% SDS; 0,1 mg/ml proteinázy K. Proteináza K byla odstraněna extrakcí fenolem a po etanolové precipitaci a vysušení byl vzorek DNA rozpuštěn v TE pufru (10 mM Tris-Cl pH = 8,1 mM EDTA pH = 8).

Detekce polymorfismů (-168G/T, -735C/T) v genu pro MMP-2 a polymorfismu +853G/A v genu pro TIMP-2 byla provedena pomocí PCR se specifickými primery navrženými původními autory [37,38] a následné restrikční analýzy specifickými endonukleázami. Popis metody je uveden v tab. 2 a 3.

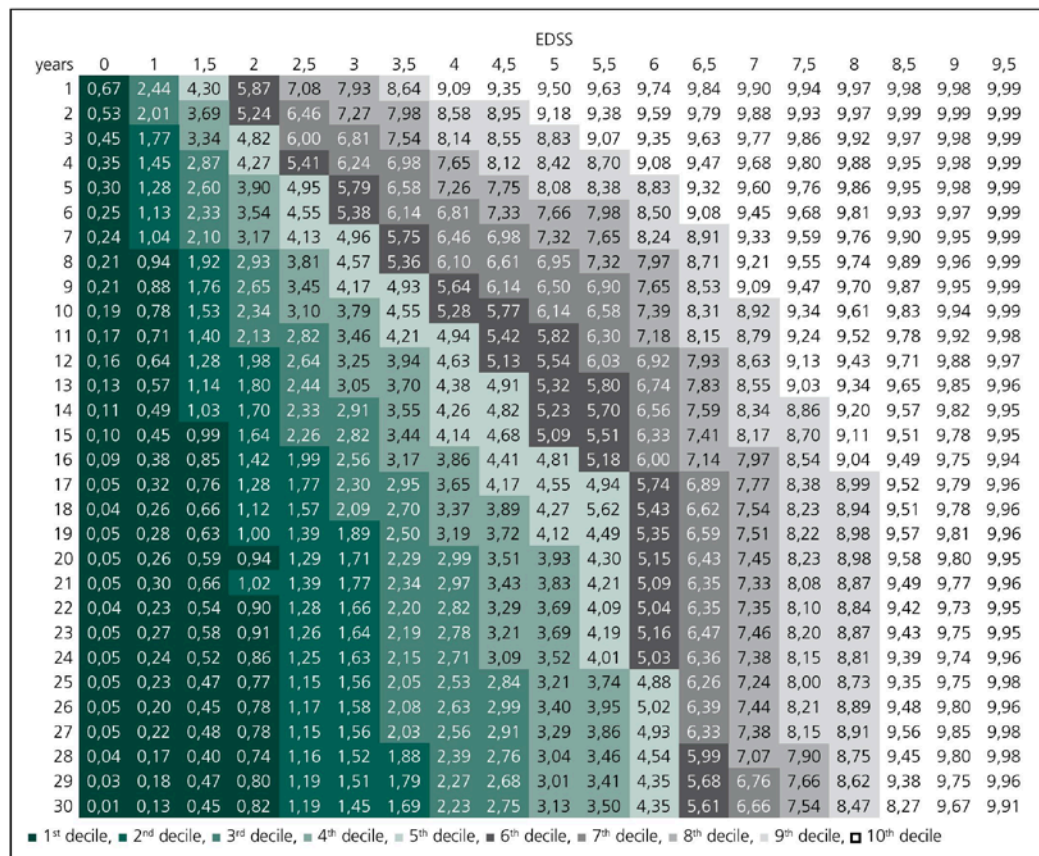
**Statistické hodnocení**

K testování rozdílů mezi vybranými skupinami nemocných nebo asociacemi mezi sledovanými parametry byly použity tyto statistické techniky: Normální rozložení bylo testováno Kolmogorov-Smirnovým testem normality. Normální rozložení dat bylo prezentováno jako průměr ± směrodatná odchylka ( $\bar{x} \pm SD$ ).

Vzhledem k tomu, že distribuce většiny získaných hodnot se lišila od normálního rozložení, byly dále použity neparametrické testy. V case-control studii bylo provedeno srovnání mezi genovou distribucí a alelovou frekvencí ve skupině nemocných a kontrolní skupině. K testování rozdílů mezi vybranými podskupinami nemocných byla použita Hardyho-Weinbergova rovnováha, rozdíl

v genové distribuci byly testovány chí-kvadrát ( $\chi^2$ ) testem a v alelové frekvenci polymorfismů jednotlivých nukleotidů Fisherovým exaktním testem. Pro ordinární kategorické proměnné byl použit nepárový test ANOVA. Odds Ratio (OR), 95% Confidence Interval (CI) a signifikance hodnot byla spočítána běžnými metodikami.

Pro mnohočetné srovnání byla spočítána Bonferroniho korelace ( $P_{corr}$ ). Pro zjištění korelačního vztahu mezi genotypy a tíží onemocnění vyjádřenou EDSS a stupněm postižení vyjádřenou MSSS byl použit Kruskal-Wallisův ANOVA test. Pro všechny analýzy byla považována za statisticky signifikantní hodnota  $p \leq 0,05$ . Ke zpracování výsledků byl použit program STATISTICA (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), verze 8.



Graf 1. Multiple Sclerosis Severity Score vygenerované v souboru 9 892 evropských RS pacientů.

Tab. 2. Sekvence primerů, teplota pro připojení primerů.

Polymorfismus	Sekvence primerů (sense/antisense)	PCR (teplota – °C, čas)
MMP-2 –735C/T	5'-ATAGGGTAAACCTCCACATT-3' 5'-GTAAATGAGGCTGAGACCTG-3'	95/5' 95/45"-59,2/45"-72/45" (35x) 72/7' 10/10'
MMP-2 –168G/T	5'-CTGACCATTCCTCCCGTTC-3' 5'-CGCCTGAGGAAAGTCTGGAT-3'	95/5' 95/50"-51/45"-72/50" (35x) 72/7" 10/10'
TIMP-2 +853G/A	5'-GCCCGAGGGTCTTCTGGATGG-3' 5'-CTCCGGCTGATGGCCCCACT-3'	96/3' 95/40"-63,5 / 30"-72/40" (30x) 72/7' 10/10'

PCR – polymerázová řetězová reakce

Tab. 3. Restrikční enzymy, podmínky a délka PCR produktů pro analýzu genů MMP-2 a TIMP-2.

Polymorfismus	Restrikční enzym	Podmínky	Délka fragmentu (bp)
MMP-2 –735C/T	HinfI G↓ANTC	37 °C for 4 h: PCR product 15 ul, H <sub>2</sub> O 2,5 ul, buffer R 2 ul, HinfI 5 U	CC 300/300 TT 45, 255/45, 255 CT 300/45, 255
MMP-2 –168G/T	BseDI C↓CNNGG	55 °C for 4h: PCR product 15 ul, H <sub>2</sub> O 2,7 ul, buffer Y/Tango 2 ul, BseDI 3 U	GG 26, 194, 205/26, 194, 205 TT 26, 399/26, 399 GT 26, 194, 205/26, 399
TIMP-2 +853G/A	BsrI ACTGGN↓	65 oC for 4h: PCR product 15 ul H <sub>2</sub> O, 2,5 ul, buffer R 2 ul, BsrI 2,5 U	GG 221/221 AA 61, 160/61, 160 GA 221/61, 160

## Výsledky

### Genetická studie

Genotypová distribuce a alelová frekvence polymorfizmů (–168G/T, –735C/T) v genu pro MMP-2 a polymorfizmu +853G/A v genu pro TIMP-2 v celé RS skupině a kontrolní skupině je shrnuta v tab. 4.

Genotypová distribuce a alelová frekvence polymorfizmu +853G/A v genu pro TIMP-2 ve skupině RRRS a kontrolní skupině je shrnuta v tab. 5.

Genotypová distribuce se nelišila v Hardyho-Weinbergově rovnováze v žádném polymorfizmu v žádné skupině ( $p > 0,05$ ).

Nebyla prokázána signifikantní asociace vyšetřených polymorfizmů s vnímavostí k RS a nebyl prokázán rozdíl mezi pohlavími.

Po rozdělení nemocných na skupiny podle průběhu onemocnění na RRRS, SPRS a PPRS jsme prokázali v distribuci polymorfizmu TIMP-2 +853G/A signifikantní rozdíl genové distribuce ( $P_g = 0,04$ ) mezi skupinou RRRS a kontrolní skupinou. Homozygoti GG a heterozygoti GA se vyskytovali frekventněji u pacientů s RRRS (OR 1,46; 95% CI: 0,91–2,36). Tento rozdíl

však nezástal signifikantní po mnohonásobném srovnání.

Nebyl prokázán signifikantní rozdíl vyšetřených polymorfizmů mezi skupinami RRRS, SPRS PPRS.

### Korelace genotypů s tíží onemocnění a stupněm postižení

Nebyla nalezena signifikantní korelace mezi genotypy a tíží onemocnění vyjádřenou EDSS ani stupněm postižení vyjádřenou MSSS podle Roxburgha. EDSS skóre v celé RS skupině činilo  $3,5 \pm 1,8$  ( $x \pm SD$ ), MSSS skóre v celé RS skupině činilo  $5,6 \pm 2,3$  ( $x \pm SD$ ).

### Diskuze

RS je multifaktoriální choroba, vnímavost k tomuto onemocnění je podmíněna genetickou predispozicí. Mezi kandidátní geny řadíme geny pro MMP-2, -9 a jejich inhibitory, neboť hrají důležitou roli v migraci zánětlivých buněk přes HEB, což je jedním z nejdůležitějších faktorů podmiňujících rozvoj a progresi RS.

V prezentované asociční studii byl poprvé testován vztah genetických polymor-

fizmů (–735C/T, –168G/T) lokalizovaných v kandidátním genu pro MMP-2 a TIMP-2 +853G/A genetického polymorfizmu s rizikem rozvoje RS. Naše předchozí studie prokázala četnější zastoupení homozygotů GG a heterozygotů GA MMP-2 –1575G/A genetického polymorfizmu ve skupině RS pacientů ve srovnání s kontrolním souborem [33]. Alela –1575G zvyšuje promotorovou aktivitu MMP-2 ovlivněním vazby estrogenního receptoru [39].

Alela T MMP-2-735C/T genetického polymorfizmu je také funkční, snižuje promotorovou aktivitu následkem přerušení Sp1-vazebného místa (CCACC box) ve studii *in vitro* [40]. Buněčný transkripční faktor Sp1 se váže na kritické regulační prvky v různých buněčných a virových promotorech. Chybějící Sp1-vazebná sekvence MMP-2 –735T alely může vést ke snížení produkce proteinu MMP-2 u jedinců nesoucích CT nebo TT genotyp ve srovnání s jedinci nesoucími CC genotyp [37]. Tato alela je funkčně spojena s alelou T –1306C/T genetického polymorfizmu, která také silně snižuje promotorovou aktivitu přerušením Sp1-

## ASOCIACE POLYMORFIZMŮ V GENU PRO MATRIX METALLOPROTEINÁZU-2 A TKÁŇOVÝ INHIBITOR

Tab. 4. Srovnání genotypové distribuce a alelové frekvence u skupiny RS a kontrol.

Polymorfismus	Genotyp	Genotyp	Genotyp	Pg	Pcorr	Alela	Alela	Pa	Pcorr
<b>-168 G/T MMP-2</b>	<b>GG (%)</b>	<b>GT (%)</b>	<b>TT (%)</b>	<b>0,89</b>	<b>NS</b>	<b>G (%)</b>	<b>T (%)</b>	<b>0,93</b>	<b>NS</b>
MS (n = 216)	180/216 (83,2)	35/216 (16,2)	1/216 (0,5)			395/432 (91,4)	37/432 (8,6)		
kontroly (n = 114)	95/114 (83,3)	18/114 (15,8)	1/114 (0,9)			208/228 (91,2)	20/228 (8,8)		
<b>-735 C/T MMP-2</b>	<b>CC (%)</b>	<b>CT (%)</b>	<b>TT (%)</b>	<b>0,27</b>	<b>NS</b>	<b>C (%)</b>	<b>T (%)</b>	<b>0,18</b>	<b>NS</b>
MS (n = 239)	176/239 (73,6)	60/239 (25,1)	3/243 (1,3)			412/478 (86,2)	66/478 (13,8)		
kontroly (n = 130)	103/130 (79,2)	27/130 (20,8)	0/130 (0)			233/260 (89,6)	27/260 (10,4)		
<b>+853 G/A TIMP-2</b>	<b>GG (%)</b>	<b>GA (%)</b>	<b>AA (%)</b>	<b>0,13</b>	<b>NS</b>	<b>G (%)</b>	<b>A (%)</b>	<b>0,33</b>	<b>NS</b>
MS (n = 240)	184/240 (76,7)	53/240 (22)	3/244 (1,3)			429/480 (87,7)	59/480 (12,3)		
kontroly (n = 135)	95/135 (70,4)	40/135 (29,6)	0/135 (0)			230/270 (85,2)	40/270 (14,8)		

Pg – pravděpodobnost rozdílu v genotypové distribuci; Pa – pravděpodobnost rozdílu v alelové frekvenci; RS – roztroušená skleróza; n – počet; NS – nesignifikantní rozdíl; Pcorr – Bonferroniho korekce

Tab. 5. Srovnání genotypové distribuce a alelové frekvence TIMP-2 +853G/A polymorfizmu skupin RS a kontrol.

Polymorfismus	Genotyp	Genotyp	Genotyp	Pg	Pcorr	Alela	Alela	Pa	Pcorr
<b>+853 G/A TIMP-2</b>	<b>GG (%)</b>	<b>GA (%)</b>	<b>AA (%)</b>			<b>G (%)</b>	<b>A (%)</b>		
RRMS (n = 182)	146/182 (80,2)	34/182 (18,7)	2/182 (1,1)	0,04	NS	326/364 (89,6)	38/364 (10,4)	0,11	NS
kontroly (n = 135)	95/135 (70,4)	40/135 (29,6)	0/135 (0)			230/270 (85,2)	40/270 (14,8)		
SPRS (n = 32)	23/32 (71,9)	8/32 (25)	1/32 (3,1)	0,11	NS	54/64 (84,4)	10/64 (15,6)	0,98	NS
kontroly (n = 135)	95/135 (70,4)	40/135 (29,6)	0/135 (0)			230/270 (85,2)	40/270 (14,8)		
PPRS (n = 26)	16/26 (61,5)	10/26 (38,5)	0/27 (0)	NS	NS	42/52 (81,6)	10/52 (19,2)	0,31	NS
kontroly (n = 135)	95/135 (70,4)	40/135 (29,6)	0/135 (0)			230/270 (85,2)	40/270 (14,8)		

Pg – pravděpodobnost rozdílu v genotypové distribuci; Pa – pravděpodobnost rozdílu v alelové frekvenci; RS – roztroušená skleróza; RRMS – relabující-remitentní roztroušená skleróza; PPRS – primárně progresivní roztroušená skleróza; n – počet; NS – nesignifikantní rozdíl; Pcorr – Bonferroniho korekce

-vazebného místa *in vitro* [37] a bylo prokázáno synergní ovlivnění exprese mRNA MMP-2 [41]. Byla zjištěna asociace haplotypu CC se zvýšeným rizikem karcinomu jícnu [40] a plicního karcinomu [41,42]. U revmatoidní artritidy byla zjištěna zvýšená frekvence alely T u nemocných mužů [43] ve srovnání se zdravými kontrolami. V našem souboru nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi RS pacienty a kontrolní skupinou u tohoto genetického polymorfizmu.

Asociační studie zabývající se vztahem genetických polymorfizmů lokalizovaných v genu pro TIMP-2 s RS nebyly dosud provedeny. Studovali jsme TIMP-2 +853 G/A polymorfismus, který je lokalizován na chromozomu X17q23–q25 a nachází se na 3. exonu. V našem souboru nebyl nalezen signifikantní rozdíl mezi RS pacienty a kontrolní skupinou. Po rozdělení souboru na skupiny podle průběhu onemocnění bylo prokázáno četnější zastoupení homozygotů GG a heterozygotů GA ve skupině RRRS pacientů ve srovnání s kontrolním souborem.

Byla zjištěna také zvýšená frekvence alely G u pacientů s těžkou chronickou obstrukční chorobou bronchopulmonální [44] a u nemocných s aneuryzmaty břišní aorty [45] ve srovnání s kontrolami. Ačkoli substitucí +853 G/A nukleotidu nedochází ke změně aminové kyseliny, je pravděpodobné snížení aktivity TIMP-2. Další možností je sekundární ovlivnění struktury mRNA, což vede k inhibici míry translace a/nebo snížení stability mRNA [44]. Tento enzym inhibuje specificky MMP-2, která se významně podílí na porušení HEB, remodelaci extracelulární matrix, poškození neuronů, axonů a reparaci tkání [46]. Při nedostatečné inhibici dochází ke zvýšené aktivitě MMP-2, což může vést k progresi onemocnění.

Naše nálezy neprokazují asociční vztah vyšetřených polymorfizmů v genu pro MMP-2 a TIMP-2 s vnímavostí k RS. Nenašli jsme ani asociaci genotypů s tíží onemocnění nebo stupněm postižení vyjádřeném EDSS a MSSS skóre. Jedná se však o první asociční studii uvedených SNPs

v genech pro MMP-2 a TIMP-2 s RS. Vzhledem k významu MMP-2 a TIMP-2 v patofyziologii RS je potřeba provést další nezávislé studie ve větším souboru pacientů a ověřit získané výsledky.

RS je multifaktoriální onemocnění, vznímavost k rozvoji a progresi choroby je geneticky determinována. Na spuštění autoimunitního procesu se pravděpodobně podílí velké množství malých genů, které podmiňují vysokou interindividuální variabilitu choroby [47–49]. Zjištění rizikových genetických polymorfizmů v regulačních oblastech kandidátních genů, které modifikují expresi metalloproteináz a jejich tkáňových inhibitorů, může poskytnout důležité informace o patogenetice onemocnění a nalézt jednotlivce se zvýšeným rizikem. Mimoto, zjištění rizikových alel pro dané onemocnění může napomoci ve vývoji specifické terapie a přispět ke zjištění individuální odpovědi pacientů na terapii.

MMPs jsou slibný biologický marker, jejich význam v patofyziologii RS a využití



v klinické praxi však ještě musí být ověřen v dalších studiích.

### Literatura

- Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J Neurol* 2004; 251 (Suppl 5): v12-v29.
- Hauser SL, Oksenberg JR. The neurobiology of multiple sclerosis: genes, inflammation, and neurodegeneration. *Neuron* 2006; 52(1): 61-76.
- Martin R, Bielekova B, Gran B, McFarland HF. Lessons from studies of antigen-specific T cell responses in multiple sclerosis. *J Neural Transm Suppl* 2000; 60: 361-373.
- Hafner DA. Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 2004; 113(6): 788-794.
- Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 1995; 201(3): 223-226.
- Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as a major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126(12): 2738-2749.
- de Souza AP, Trevisatto PC, Scarel-Caminaga RM, Brito RB, Bartos SP, Line SP. Analysis of the MMP-9 (C-1562T) and TIMP-2 (G-418C) gene promoter polymorphisms in patients with chronic periodontitis. *J Clin Periodontol* 2005; 32(2): 207-211.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; 4(2): 197-250.
- Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci* 2005; 6(12): 931-944.
- Proost P, Van Damme J, Opendakker G. Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; 192(3): 1175-1181.
- Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S et al. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 1998; 121(12): 2327-2334.
- Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol* 2006; 26(4): 299-307.
- Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM, Miller K, Wells GM, Schweitzer T et al. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 1998; 121(1): 159-166.
- Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N, Rawashden R, Miller A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon-beta therapy in relapsing and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2001; 50(4): 443-451.
- Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, Valk P, Kappos L et al. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124(9): 1743-1753.
- Abraham M, Shapiro S, Karni A, Weiner HL, Miller A. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J Neuroimmunol* 2005; 163(1-2): 157-164.
- Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol* 2006; 26(4): 299-307.
- Sherer Y, Shoenfeld Y. Immunomodulation for treatment and prevention of atherosclerosis. *Autoimmun Rev* 2002; 1(1-2): 21-27.
- Aoki T, Sumii T, Mori T, Wang X, Lo EH. Blood-brain barrier disruption and matrix metalloproteinase-9 expression during reperfusion injury: mechanical versus embolic focal ischemia in spontaneously hypertensive rats. *Stroke* 2002; 33(11): 2711-2717.
- Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wilhelm SM et al. Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development. *J Clin Invest* 1990; 86(5): 1496-1502.
- Leppert D, Waubant E, Galardy R, Bunnett NW, Hauser SL. T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro. *J Immunol* 1995; 154(9): 4379-4389.
- Montgomery AM, Sabzevari H, Reisfeld RA. Production and regulation of gelatinase B by human T-cells. *Biochim Biophys Acta* 1993; 1176(3): 265-268.
- Maeda A, Sobel RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; 55(3): 300-309.
- Avolio C, Ruggieri M, Giuliani F, Luzzi GM, Leante R, Riccio P. Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. *J Neuroimmunol* 2003; 136(1-2): 46-53.
- Benesová Y, Vasku A, Novotná H, Litzman J, Stourač P, Beránek M et al. Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15(3): 316-322.
- Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH. Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke. *Neuropathol Appl Neurobiol* 1997; 23(5): 406-415.
- Diaz-Sanchez M, Williams K, DeLuca GC, Esiri MM. Protein co-expression with axonal injury in multiple sclerosis plaques. *Acta Neuropathol* 2006; 111(4): 289-299.
- Fainardi E, Castellazzi M, Tamborino C, Trentini A, Manfrinato MC, Tola MR et al. Potential relevance of cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal synthesis of active matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) as markers of disease remission in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler* 2009; 15(5): 547-554.
- Borden P, Keller RA. Transcriptional control of matrix metalloproteinases and the tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1997; 7(1-2): 159-178.
- Yushchenko M, Mäder M, Elitok E, Bitsch A, Dresse A, Tuman H et al. Interferon-beta-1b decreased matrix metalloproteinase-9 serum levels in primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; 250(10): 1224-1228.
- Nagase H, Engchild JJ, Suzuki K, Salvesen G. Stepwise activation of the precursor of matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) by proteinases and (4-aminophenyl) mercuric acetate. *Biochemistry* 1990; 29(24): 5783-5789.
- Bernardo MM, Fridman R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J* 2003; 347(3): 739-745.
- Benesová Y, Vasku A, Stourač P, Hladíková M, Beránek M, Kadanka Z et al. Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2008; 205(1-2): 105-109.
- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005; 58(6): 840-846.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 1983; 33(11): 1444-1452.
- Roxburgh RH, Seman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005; 64(7): 1144-1151.
- Price SJ, Greaves DR, Watkins H. Identification of novel, functional genetic variants in the human matrix metalloproteinase-2 gene: role of Sp1 in allele specific transcriptional regulation. *J Biol Chem* 2001; 276(10): 7549-7558.
- Vasku A, Goldbergová M, Izakovicová Hollá L, Sisková L, Groch L, Beránek M et al. A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790 T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease. *Matrix Biol* 2004; 22(7): 585-591.
- Xu E, Xia X, Lü B, Xing X, Huang Q, Ma Y et al. Association of matrix metalloproteinase-2 and -9 promoter polymorphisms with colorectal cancer in Chinese. *Mol Carcinog* 2007; 46(11): 924-929.
- Yu C, Zhou Y, Miao X, Xiong P, Tan W, Lin D. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. *Cancer Res* 2004; 64(20): 7622-7628.
- Zhou Y, Yu C, Miao X, Wang Y, Tan W, Tong S et al. Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 and lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2005; 26(6): 1117-1121.
- Rollin J, Régina S, Vourc'h P, Iochmann S, Bléchet C, Reverdiu P et al. Influence of MMP-2 and MMP-9 promoter polymorphisms on gene expression and clinical outcome of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2007; 56(2): 273-280.
- Nemec P, Goldbergová M, Svobodník T, Polásková D, Soucek M, Vasku A. Polymorphism of gene promoter region for MMP-2 in rheumatoid arthritis. *Vnitř Lek* 2006; 52(4): 348-354.
- Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, Morishima Y, Masuyama K, Ishii Y et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 2001; 18(5): 748-752.
- Wang X, Tromp G, Cole CW, Verloes A, Sakalihan N, Yoon S et al. Analysis of coding sequences for tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) and (TIMP2) in patients with aneurysms. *Matrix Biol* 1999; 18(2): 121-124.
- Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH. T-cell and macrophage mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain* 2001; 124(11): 2203-2214.
- Ebers G. Genetic factors in multiple sclerosis. *MS Forum; Modern Management Workshop Boston* 1995.
- Brynedal B, Duvefelt K, Jonassdottir G, Roos IM, Akesson E, Palmgren J. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One* 2007; 2(7): e664.
- Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A et al. Multiple Sclerosis Genetics Group. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. *Nat Genet* 2007; 39(9): 1083-1091.



**Benešová Y, Vašků A, Novotná H, Litzman J, Štourač P, Beránek M, Kadaňka Z, Bednařík J.**

Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis. *Mult. Scler* 2009; 15(3): 316-322. **IF: 3.279**

### **Resumé**

Matrix metalloproteinázy (MMPs) hrají důležitou roli imunopatogenezi roztroušené sklerózy (RS). Významně se podílí na progresi zánětlivého procesu, porušení hematoencefalické bariéry (HEB), formování zánětlivých RS lézí a demyelinizaci. Cílem této studie bylo stanovit hladiny MMP-9, MMP-2 a jejich tkáňových inhibitorů v séru a zhodnotit jejich vztah ke klinickému průběhu, stupni postižení a tíži onemocnění. Do studie bylo zařazeno 87 pacientů s RS, diagnostikovanou dle Mc Donaldových kritérií, kontrolní soubor byl tvořen 50 zdravými jedinci. Stanovení a kvantifikace hladin enzymů bylo provedeno metodou enzyme-linked immunoassay (ELISA). Klinický stav byl hodnocen pomocí Expanded Disability Status Scale (EDSS), stupeň postižení byl spočítán podle Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). Bylo prokázáno statisticky signifikantní zvýšení hladin MMP-9 v séru a MMP-9/TIMP-1 u RS skupiny ( $P < 0.001$ ), zejména u relabující formy onemocnění ( $P < 0.001$ ) při srovnání s kontrolním souborem. Dále bylo prokázáno signifikantní zvýšení hladin MMP-2 v séru a MMP-2/TIMP-2 u progresivní formy onemocnění ( $P < 0.001$ ) ve srovnání s relabující formou. Toto zvýšení korelovalo s tíží onemocnění ( $P < 0.001$ ) a stupněm postižení ( $P < 0.05$ ).

Závěry: Bylo prokázáno statisticky signifikantní zvýšení MMP-9, MMP-9/TIMP-1 u RS, zejména relabující formy onemocnění. Odráží stupeň zánětlivého postižení a porušení HEB. 2. Bylo prokázáno signifikantní zvýšení MMP-2, MMP-2/TIMP-2 u progresivní formy onemocnění. Je známkou větší destrukce nervové tkáně v chronických lézích. Byla také nalezena korelace MMP-2, MMP2/TIMP2 s tíží onemocnění a stupněm postižení. Hlavním přínosem práce je zjištění, že MMPs jsou slibným biologickým markerem, jejich význam v patofyziologii RS a využití v klinické praxi však ještě musí být ověřeno v dalších studiích.

## Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 as biomarkers of various courses in multiple sclerosis

Y Benešová<sup>1</sup>, A Vašků<sup>2</sup>, H Novotná<sup>3</sup>, J Litzman<sup>4</sup>, P Štourač<sup>1</sup>, M Beránek<sup>2</sup>, Z Kadaňka<sup>1</sup> and J Bednařík<sup>1</sup>

**Background** Matrix metalloproteinases are notable contributors to neuroinflammation and blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis (MS).

**Objective** The goal of this study was to determine the serum levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and their tissue inhibitors (TIMP-1) and (TIMP-2), and to investigate their possible relations to type, disability, and severity of MS.

**Materials and methods** Eighty-seven patients with definite MS according to the McDonald criteria and 50 healthy controls were enrolled in the study. Their clinical status was evaluated with the Expanded Disability Status Scale. Serum levels were analyzed by enzyme-linked immunoassay.

**Results** A significant elevation in MMP-9 serum levels and in the MMP-9/TIMP-1 ratio was found in the whole MS group ( $P < 0.001$ ), in the relapsing–remitting MS (RRMS) ( $P < 0.001$ ), and secondary-progressive MS (SPMS) ( $P < 0.001$ ) groups when compared with the controls. A significant elevation in MMP-2 serum levels and in the MMP-2/TIMP-2 ratio was observed in the primary progressive MS (PPMS) ( $P < 0.001$ ) and the SPMS ( $P < 0.002$ ) groups when compared with the RRMS group, and this increase was also associated with the disability ( $P < 0.001$ ) and severity ( $P < 0.05$ ) of the disease.

**Conclusion** We confirmed that metalloproteinases are useful biological markers in MS, providing information about the clinical type, disability, and severity of the disease. *Multiple Sclerosis* 2008; 00: 1–7. <http://msj.sagepub.com>

**Key words:** immunology; matrix metalloproteinase 2; matrix metalloproteinase 9; multiple sclerosis; tissue inhibitors of metalloproteinases

### Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a progressive autoimmune disease, characterized by inflammation, demyelination, and axonal degeneration of the central nervous system (CNS) [1]. The disease can be divided into several types, in terms of its course. The majority of patients present with a relapsing–remitting MS (RRMS) disease. This type tends to develop later into a secondary-progressive course with neurological deterioration due to incomplete recovery

after each relapse [2]. The primary-progressive MS (PPMS) type is characterized by a continuous and cumulative neurological disability, without attacks.

Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the immunopathogenesis and progression of disease. They make up a family of at least 23 endopeptidases that are involved in the degradation of extracellular matrix proteins [3]. The activity of the metalloproteinases is regulated on at least three different levels [4]: gene expression, proenzyme activation, and through the activity of the

<sup>1</sup>Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>Department of Clinical Biochemistry and Hematology, University Hospital Brno, Brno, Czech Republic

<sup>4</sup>Department of Clinical Immunology and Allergology, Faculty of Medicine, St Anne's Faculty Hospital, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Correspondence to: Yvonne Benešová, MD, Department of Neurology, University Hospital Brno, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic. Email: [beneivo@seznam.cz](mailto:beneivo@seznam.cz)

Received 6 June 2008; accepted 9 October 2008

tissue inhibitors of matrix metalloproteinases (TIMPs). It has been suggested that an imbalance between MMP and TIMP expression may lead to persistent proteolytic activity with subsequent continuous tissue destruction in various diseases, including MS [5,6]. In the immunopathogenesis of MS, metalloproteinases are involved in the disruption of the blood-brain barrier (BBB), invasion of immune cells into the CNS parenchyma, degradation of the basic myelin protein [7,5], and direct neurotoxicity [8].

Investigations of the serum, cerebrospinal fluid, and brain tissue of patients with MS have demonstrated an increase of MMP-1, -2, -3, -7, -9, and MMP-12 [9]. A higher expression of MMP-2, TIMP-2, and MMP-14 in the monocyte population has been found in patients with MS as compared with control subjects [3].

The upregulation of some MMPs correlates with the course of disease [3,6]. Increased serum levels of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 have been shown in the relapsing–remitting type [4]. In RRMS, an increase of MMP-9 in serum has been correlated with the number of T-1 weighted gadolinium-enhancing magnetic resonance image (MRI) lesions [10,11] and been considered predictive of the disease activity [12]. Increased levels of MMP-9 in the cerebrospinal fluid have been found in all patients with RRMS but only in 57% of the patients with PPMS [7].

Only limited and controversial findings concerning MMP-2 as a potential marker of the course of MS are available. Increased serum levels of MMP-2 have been found in PPMS and higher MMP-2/TIMP-2 ratio values have been found in secondary-progressive MS (SPMS) and PPMS in a group of 42 patients with MS [4]. Furthermore to these findings, Galboiz, *et al.* [13] described an increased expression of MMP-2 in 16 relapsing–remitting patients compared with 12 secondary-progressive patients. So far, no study investigating the correlation of serum levels of MMP-9, MMP-2, and their inhibitors with disability has been reported in a representative sample of patients with MS.

As mentioned above, we do not currently have biomarkers reliable enough for evaluation of the disease activity and its type or to provide information about the pathophysiological process and clinical prognosis of MS. From a practical standpoint, the most useful biomarkers are those measurable in serum or plasma. MMPs, especially MMP-9, MMP-2, and their inhibitors, are promising biological candidates.

The aim of this study was to determine the serum levels of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), and their tissue inhibitors (TIMP-1) and (TIMP-2) in a larger study group and to investigate a possible relation

to the clinical course and severity of MS. This may give us laboratory markers useful in following up patients with MS and may also help us to understand better the role of metalloproteinases in the pathophysiology of the disease.

## Materials and methods

### Patients and controls

The study group consisted of 87 patients, fulfilling McDonald's criteria of MS [14], with a mean age of  $39.7 \pm 11.8$  years (mean  $\pm$  SD). The mean duration of the disease was  $7.8 \pm 6.2$  years (mean  $\pm$  SD). The control group consisted of 50 healthy volunteers, with a mean age of  $37.2 \pm 14.4$  years (mean  $\pm$  SD). The patients were divided into groups as follows: 40 patients with RRMS, 20 with the definite SPMS, and 27 with PPMS. Clinical status was evaluated according to the Expanded Disability Status Scale (EDSS), [15] and the disease severity was calculated according to the MS Severity Score (MSSS) [16]. The mean disease progression as expressed by EDSS score over the past 2 years was  $0.69 \pm 0.67$  (mean  $\pm$  SD) for the whole MS group. Relapse was defined as the appearance or worsening of an MS symptom or symptoms, lasting at least 24 h, preceded at least 30 days of stable or improved neurological state. The relapse rate during the previous 2 years in the RRMS group was  $1.26 \pm 1.08$  (mean  $\pm$  SD). Both patients and controls were free of infection, and the patients were clinically stable at the time of blood collection. All patients were recruited from the Department of Neurology of the University Hospital Brno and were examined in a specialised MS centre by the same specialist neurologist (Y.B.).

The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital Brno, and all persons gave their informed consent before their enrolment in the study.

### Measurement of serum levels of metalloproteinases and their inhibitors

The serum levels of MMP-9, MMP-2, TIMP-1, and TIMP-2 were measured by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) using the following kits: MMP-2, Human, Biotrak ELISA System RPN2617; TIMP-1, Human, Biotrak ELISA System RPN2611; and TIMP-2, Human, Biotrak ELISA RPN2618, all from Amersham Biosciences UK (Buckinghamshire, UK), in accordance with the manufacturer's instructions.

Q1

### Statistical analysis

The normality of the values obtained was assessed by the Kolmogorov–Smirnov test. Because the majority of the values showed a distribution different from normal, a nonparametric Mann–Whitney *U*-test and the Kruskal–Wallis ANOVA were applied. Because of the need for multiple hypothesis testing, a standard Bonferroni correction was applied for each group studied when appropriate. The critical value for the Bonferroni correction was  $P < 0.008$ . The results are given as mean  $\pm$  standard deviation ( $\pm$ SD) and as median (quantile 5%, 95%). A Spearman's rank correlation test was used for the correlation of MMPs and the serum levels of their inhibitors with disability and severity as expressed by EDSS and MSSS, respectively. The STATISTICA package (StatSoft, Inc., Tulsa, Oklahoma, USA), version 8, was used throughout.

### Results

The demographic data of the study groups are summarised in Table 1.

**Table 1** Demographic data

Group	No.	Age Mean ( $\pm$ SD)	Disease duration Mean ( $\pm$ SD)	EDSS Mean ( $\pm$ SD)	MSSS Mean ( $\pm$ SD)	Change in EDSS score <sup>a</sup> Mean ( $\pm$ SD)	Male/ female
MS	87	39.7 (11.8)	7.76 (6.2)	4.53 (2.07)	6.69 (2.24)	0.69 (0.67)	27/60
RRMS	40	32.2 (7.2)	5.20 (5.03)	2.75 (1.02)	5.31 (2.08)	0.42 (0.48)	11/29
SPMS	20	47.5 (7.1)	10.42 (5.05)	6.22 (1.03)	7.85 (1.41)	0.76 (0.64)	6/14
PPMS	27	47.2 (9.9)	10.04 (6.97)	6.27 (1.3)	8.12 (1.51)	1.07 (0.74)	10/17
Control	50	37.2 (14.4)	—	—	—	—	17/33

The results are given as mean  $\pm$  standard deviation (SD).

EDSS, Expanded Disability Status Scale; MSSS, Multiple Sclerosis Severity Score.

Q2 <sup>a</sup>The mean disease progression as expressed by EDSS score over the past 2 years.

**Table 2** Serum (metalloproteinases and their inhibitors) level quantified by ELISA; MMP-9/TIMP1 ratio and MMP-2/TIMP-2 ratio in patients and control groups

Group	No.	MMP-9 (ng/mL)	MMP-2 (ng/mL)	MMP-9/TIMP-1	TIMP-1 (ng/mL)	TIMP-2 (ng/mL)	MMP-2/TIMP-2
MS	87	288 (116;500)*	1534 (1040;2454)	2.5*	107 (56;164)	86 (49;120)	18
RRMS	40	307 (152;471)*	1377 (1083;1828)	2.7*	109 (67;147)	94 (67;112)	15.4
SPMS	20	330 (165;500)*	1738 (914;2848)	2.8*	102 (53;162)	83 (40;115)	21.6
PPMS	27	226 (100;487)	1868 (1200;2475)	2.1	108 (57;204)	77 (34;104)	23.6
Control	50	170 (65;392)	1540 (1232;2283)	1.6	114 (67;174)	78 (60;118)	20.8

The results are given as median (kvantil 5%, 95%).

ELISA, enzyme linked immunosorbent assay; MMP, matrix metalloproteinase; TIMP, tissue inhibitors of matrix metalloproteinases; MS, multiple sclerosis; RRMS, relapsing–remitting MS; SPMS, secondary-progressive MS; PPMS, primary-progressive MS.

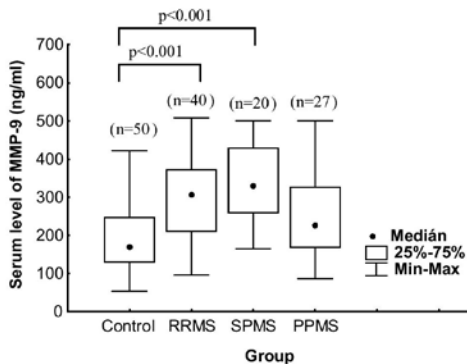
\*Comparison of MMP-9 serum levels between MS and control group.

\*Comparison of MMP-9/TIMP-1 ratio between MS and control group.

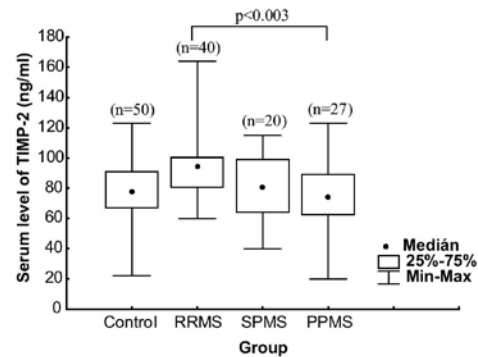
\*Comparison of MMP-9 serum levels among RRMS, SPMS, PPMS, and control groups.

\*Comparison of MMP-9/TIMP-1 ratio among RRMS, SPMS, PPMS, and control groups.

Q2 <sup>\*</sup> $P < 0.008$  (critical value after applying Bonferroni correction for multiple testing) for comparison with control group.

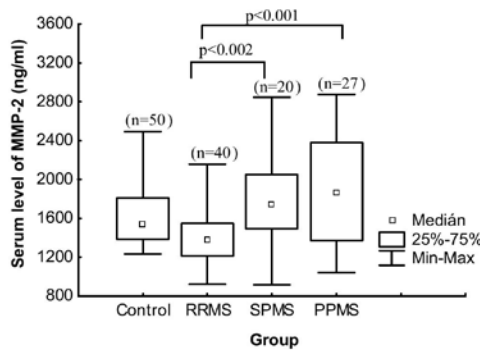


**Figure 1** Comparison of MMP-9 serum levels among RRMS, SPMS, PPMS, and control groups.  $P < 0.001$  for all groups studied (Kruskal–Wallis ANOVA);  $P < 0.001$  for RRMS versus control group (Mann–Whitney  $U$ -test);  $P < 0.001$  for SPMS versus control group (Mann–Whitney  $U$ -test). MMP, matrix metalloproteinase; RRMS, relapsing–remitting MS; SPMS, secondary-progressive MS; PPMS, primary-progressive MS.



**Figure 3** Comparison of TIMP-2 serum levels among RRMS, SPMS, PPMS, and control groups.  $P < 0.05$  for all groups studied (Kruskal–Wallis ANOVA);  $P < 0.003$  for PPMS versus RRMS (Mann–Whitney  $U$ -test).

Table 2). As far as MMP-2 serum levels are concerned, a significant elevation was found in MMP-2 serum levels in the PPMS ( $P < 0.001$ ) and the SPMS ( $P < 0.002$ ) groups (Figure 2) and a significant elevation in the MMP-2/TIMP-2 ratio in the PPMS ( $P < 0.001$ ) and the SPMS ( $P < 0.001$ ) groups when compared with the RRMS group (data not shown). A significant decrease in TIMP-2 serum levels was shown in the PPMS group when compared with the RRMS group ( $P < 0.003$ ) (Figure 3).



**Figure 2** Comparison of MMP-2 serum levels among RRMS, SPMS, PPMS, and control groups.  $P < 0.001$  for all groups studied (Kruskal–Wallis ANOVA);  $P < 0.001$  for PPMS versus RRMS (Mann–Whitney  $U$ -test);  $P < 0.002$  for SPMS versus RRMS (Mann–Whitney  $U$ -test). MMP, matrix metalloproteinase; RRMS, relapsing–remitting MS; SPMS, secondary-progressive MS; PPMS, primary-progressive MS.

**MMPs serum levels, disability, and severity of the disease**

An increase in MMP-2 serum levels was associated with disability and the severity of the disease as expressed by EDSS ( $P < 0.001$ ) and MSSS ( $P < 0.05$ ), respectively. Similarly, an increase in the MMP-2/TIMP-2 ratio was associated with disability ( $P < 0.001$ ) and severity ( $P < 0.05$ ). Furthermore, a decrease in the TIMP-2 serum levels was associated with disability ( $P < 0.05$ ), whereas associations with the MMP-9, TIMP-1, and MMP-9/TIMP-1 ratio were not found (data not shown).

**Discussion**

Metalloproteases are not only important contributors to MS pathogenesis but their determination may be important for the evaluation of the disease activity and its type.

We found increased MMP-9 serum levels and MMP-9/TIMP-1 ratio in the whole MS group as compared with the control group. This is in agreement with previous observations that have shown association between elevated MMP-9 mRNA levels in peripheral blood mononuclear cells, raised MMP-9 levels in the serum, and cerebrospinal fluid with clinical and MRI disease activity [10,17–20]. More recently, elevated levels of MMP-9 and MMP-7 in lesions and apparently normal white matter in patients with MS have been observed [6].

Further, we studied the relation between MMP-9 serum levels and the various types of MS. After stratification of the patient group with MS according to disease type, we showed increased MMP-9 serum

levels and MMP-9/TIMP-1 ratio in the RRMS and the SPMS groups compared with the control group. We confirmed the findings of some other authors: increased serum levels of MMP-9 and MMP-9/TIMP-1 were shown in the RRMS type of the disease [4], Leppert, *et al.* [7] also found that MMP-9 was increased in all the patients with RRMS. A recent study on the regulation of MMPs in MS plaques at different stages of development showed that MMP-7 and MMP-9 were transcriptionally upregulated in all lesions except those of the chronic inactive type [6]. In the course of experimental autoimmune encephalomyelitis, the increase of MMP-9 and MMP-7 transcripts in the brain tissue reached peak levels at the time of appearance of clinical signs [21]. These data indicate that elevated serum and CSF levels of MMP-9 are related to the course of MS and possibly to its progression [22]. Recent clinical trials have shown that specific MMP-9 inhibitors could be a potential drug target for MS [23,24]. A correlation between decreased MMP-9 serum levels and reduction of gadolinium-enhancing lesion activity was shown in patients with RRMS in a clinical trial with combination therapy with interferon  $\beta$ -1a and doxycycline, a potent inhibitor of MMPs [24]. Several studies have also shown that interferon- $\beta$  treatment leads to decrease of MMP-9 mRNA and serum levels in patients with MS [12,13,25].

So far, only limited data are available on MMP-2 in the course of MS. We found increased MMP-2 serum levels and MMP-2/TIMP-2 ratio in the PPMS and SPMS groups, mainly in the PPMS when compared with the RRMS group, which is in accordance with the results of previous studies [4], but not in the RRMS group. Our results are in contradiction with the results of Galboiz, *et al.* who found divergent expression of MMP-2 mRNA by peripheral blood leukocytes (PBL) between patients with RRMS and SPMS compared with controls; increased MMP-2 expression in the relapsing–remitting type at a magnitude of times 2.8 in comparison with the secondary-progressive type and at a magnitude of times 1.4 compared with that detected in healthy controls [13]. However, the differences were not statistically significant in any comparison [13]. Several mechanisms may contribute to differences between our findings and those of Galboiz. First, the activity of MMPs is regulated at several different levels: gene expression; post-transcriptional regulatory mechanisms, which may include modulation of mRNA stability, as well as of protein translation or secretion; proenzyme activation; and through the activity of the TIMPs. MMP-2 (gelatinase A) is secreted as the proenzyme. The latent form, pro-MMP-2, is activated by the membrane type 1 (MT1-MMP), in a process regulated by TIMP-2 [26]. MMP-2 also plays an important role in MMP-9 activation and

can act as a positive regulator of proMMP-9 activation [27].

Second, these findings have been surprising as the mRNA expression by PBL was not reflected at the protein level. MMPs are secreted by a wide range of cell types [28]: by T-cells [29], monocytes, B-cells [3], macrophages [30], glial and endothelial cells [31,32], and their expression is regulated by cytokines and growth factors [31]. In active MS and necrotic lesions, the majority of macrophages were MMP-1, -2-, -3-, and -9-positive, and in acute and chronic MS lesions, MMP-2, -3, and -9 expressions by astrocytes have been found [30]. In-vitro studies have shown that stimulation of astrocytes and neurons with lipopolysaccharide markedly increased pro-MMP-9 and pro-MMP-2 expression in astrocytes, with only a slight increase in neurons [33]; also MMP-2 has been seen to be induced in activated astrocytes [32]. Furthermore, the treatment of astrocytes and microglia in an in-vitro study with IFN- $\beta$  inhibited the expression of both MMP-2 and MMP-9 in astrocytes and of MMP-9 in microglia [34]. According to these findings, the MMP-2 mRNA is generated not only by PBL but also by macrophages, microglia, endothelial cells, astrocytes, and neurons and thus may contribute to an increase of serum MMP-2 levels and to MS pathogenesis. Elevation of serum MMP-2 levels may reflect a higher degree of destruction of nervous tissue in chronic lesions [4].

An increase in MMP-2 serum levels was also associated with disability and severity as evaluated by EDSS and MSSS in our group. The cumulative tissue loss in both gray and white matter, especially of axons, is important, probably the principal determinant of the accumulation of irreversible neurological disability and of conversion to a progressive disease course [35]. During the chronic stages of the disease, MMP-2 may participate in remodelling the extracellular matrix, in neuronal death, axonal injury, and in tissue repair [4]. Axonal injury observed in the brains of patients with MS was correlated not only with the presence of CD8+ T lymphocytes but also with the presence of macrophages and intrinsic microglia, which have many similar characteristics [36]. A higher expression of MMP-2, TIMP-2, and MMP-14 was observed in the monocytes of patients with MS [3].

Finally, we showed a significant decrease in TIMP-2 serum levels and an increase in the MMP-2/TIMP-2 ratio in the PPMS group when compared with the RRMS group. The decrease in the TIMPs serum levels leads to an elevation of the MMPs/TIMPs ratio and increases MMP activity. Sustained proteolytic stress through MMP overproduction may be a key factor in the development of neuronal loss in MS and may thus be a prevailing cause of chronic progression.

In conclusion, we confirmed that MMP-9, MMP-2, and the protein serum levels of their inhibitors are useful biological markers in MS, which help clarify the pathological mechanisms of the disease. We presume that the changes in the MMPs and TIMPs profiles, such as the shift in MMP-9 and MMP-2 levels, may provide us with information on the clinical manifestation, disability, and severity of the disease. However, MS is a complex matter as several pathophysiological processes (including inflammation, demyelination, axonal damage, and repair mechanism) participate in the disease process. Furthermore, these processes are not uniformly represented across the patient population, but can selectively predominate in individual patients, thus contributing to the heterogeneity in phenotypic expression of the disease, its prognosis, and response to therapies. One of the major components of MS pathogenesis that is targeted by currently available therapies has been increased permeability of the BBB. MMPs have been classified as biomarkers of BBB disruption and could contribute to an improvement in diagnostic standards and therapeutic interventions for this disease. Recent clinical trials have shown that specific MMPs inhibitors could be a potential drug target for this purpose [23,24]. On this account, the measurement of MMPs serum levels and their inhibitors may be helpful in monitoring treatment response in individual patients to a specific drug, could select patient populations in which this targeted process is prevalent, and could assist more rapid screening of therapeutic agents. Their impact on the understanding of the pathophysiology of MS and on the practical management of patients with MS, however, remains to be established.

### Acknowledgements

The study was supported by grant NR/8832-4 IGA from the Ministry of Health of the Czech Republic.

### References

- Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? *J Neurol* 2004; **251**: 12–19.
- Achiron A. Predicting the course of relapsing-remitting MS using longitudinal disability curves. *J Neurol* 2004; **251**: 65–68.
- Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, et al. Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as a major inflammatory mediators in multiple sclerosis. *Brain* 2003; **126**: 2738–2749.
- Avolio C, Ruggieri M, Giuliani F, et al. Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. *J Neuroimmunol* 2003; **136**: 46–53.
- Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y. Matrix Metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol* 2006; **26**: 299–307.
- Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne I, Valk P, Kappos L, Leppert D. The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis. *Brain* 2001; **24**: 1743–1753.
- Leppert D, Ford J, Stabler G, et al. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 1998; **121**: 2327–2334.
- Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH. T-cell- and macrophage mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain* 2001; **124**: 2203–2214.
- Kurzepa J, Bartosik-Psujek H, Suchozebrska-Jesioneck D, Rejdak K, Stryjecka-Zimmer M, Stelmasiak Z. Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurol Neurochir Pol* 2005; **39**: 63–67.
- Lee MA, Palace J, Stabler G, Ford J, Gearing A, Miller K. Serum gelatinase B, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 1999; **122**: 191–197.
- Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, et al. Disease modifying therapies in multiple sclerosis: Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* 2002; **58**: 169–178.
- Waubant E, Goodkin D, Bostrom A, et al. IFN beta lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS. *Neurology* 2003; **60**: 52–57.
- Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N, Rawashden R, Miller A. Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon-beta therapy in relapsing and secondary progressive multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2001; **50**: 443–451.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from international panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001; **50**: 121–127.
- Kurtzke JF. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* 1983; **33**: 1444–1452.
- Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005; **64**: 1144–1151.
- Lichtinghagen R, Seifert T, Kracke A, Marckmann S, Wurster U, Heidenreich F. Expression of matrix metalloproteinase-9 and its inhibitors in mononuclear blood cells of patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 1999; **99**: 19–26.
- Ozenci V, Rinaldi L, Teleshova N, Matusiewicz D, Kivisakk P, Kouwenhoven M. Metalloproteinases and their tissue inhibitors in multiple sclerosis. *J Autoimmun* 1999; **12**: 297–303.
- Liuzzi GM, Trojano M, Fanelli M, et al. Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis. *Mult Scler* 2002; **8**: 222–228.
- Waubant E, Goodkin DE, Gee L, et al. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 1999; **53**: 1397–1401.
- Kieseier BC, Kiefer R, Clements JM, et al. Matrix metalloproteinase-9 and -7 are regulated in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 1998; **121**: 159–166.
- Leppert D, Lindberg RL, Kappos L, Leib SL. Matrix metalloproteinases: multifunctional effectors of inflam-

- mation in multiple sclerosis and bacterial meningitis. *Brain Res Brain Res Rev* 2001; **36**: 249–257.
23. Muroski, ME, Roycik, MD, Newcomer, RG, *et al.* Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis. *Curr Pharm Biotechnol* 2008; **9**: 34–46.
  24. Minagar, A, Alexander, JS, Schwendimann, RN, *et al.* Combination therapy with interferon beta-1a and doxycycline in multiple sclerosis: an open-label trial. *Arch Neurol* 2008; **65**: 199–204.
  25. Yushchenko, M, Mader, M, Elitok, E, *et al.* Interferon-beta-1b decreased matrix metalloproteinase-9 serum levels in primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 2003; **250**: 1224–1228.
  26. Bernardo, MM, Fridman, R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. *Biochem J* 2003; **15**: 739–745.
  27. Toth, M, Chvyrkova, I, Bernardo, MM, Hernandez-Barrantes, S, Fridman, R. Pro-MMP-9 activation by the MT1-MMP/MMP-2 axis and MMP-3: role of TIMP-2 and plasma membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; **22**: 386–395.
  28. Chandler, S, Coates, R, Gearing, A, Lury, J, Wells, G, Bone, E. Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 1995; **201**: 223–226.
  29. Abraham, M, Shapiro, S, Karni, A, Weiner, HL, Miller, A. Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells. *J Neuroimmunol* 2005; **163**: 157–164.
  30. Maeda, A, Sobel, RA. Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 1996; **55**: 300–309.
  31. Birkedal-Hansen, H, Moore, WG, Bodden, MK, *et al.* Matrix metalloproteinases: a review. *Crit Rev Oral Biol Med* 1993; **4**: 197–250.
  32. Muir, EM, Adcock, KH, Morgenstern, DA, *et al.* Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes. *Brain Res Mol Brain Res* 2002; **100**: 103–117.
  33. Liu, W, Furuichi, T, Miyake, M, Rosenberg, GA, Liu, KJ. Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in cultured astrocytes and neurons regulates the activation of matrix metalloproteinase-2. *J Neurosci Res* 2007; **85**: 829–836.
  34. Liuzzi, GM, Latronico, T, Fasano, A, Carlone, G, Riccio, P. Interferon-beta inhibits the expression of metalloproteinases in rat glial cell cultures: implications for multiple sclerosis pathogenesis and treatment. *Mult Scler* 2004; **10**: 290–297.
  35. Bruck, W. Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Neurol* 2005; **252**: 10–15.
  36. Kulmann, T, Linfeld, G, Bitsch, A, Shuchardt, J, Bruck, W. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 2002; **125**: 2202–2212.



**Křenek P, Benešová Y, Bienertová-Vašků J, Vašků A.**

The Impact of Five VDR Polymorphisms on Multiple Sclerosis Risk and Progression: a Case-Control and Genotype-Phenotype Study. *J Mol Neurosci.* 2018 Mar 28. doi: 10.1007/s12031-018-1034-1. [Epub ahead of print]. **IF 2.229**

## **Resumé**

Riziko rozvoje roztroušené sklerózy (RS) je podmíněno kombinací faktorů genetických a environmentálních. U geneticky predisponovaného jedince je onemocnění pravděpodobně spuštěno vlivem zevních faktorů, mezi které řadíme nedostatečnou koncentraci vitamínu D v séru, herpetické infekce a kouření. Vitamin D<sub>3</sub> prostřednictvím receptoru pro vitamin D (VDR) navozuje silné antiproliferativní, prodiferenční a imunomodulační účinky. VDR po své aktivaci slouží jako transkripční faktor regulující expresi více než devítiset 1.25 (OH) 2 D<sub>3</sub> responzivních genů, zároveň je také přítomen na buněčných membránách. Významnou roli hraje též interakce vitamínu D<sub>3</sub> s alelou HLA-DRB1\*15, neboť v proximální promotorové oblasti této alely je lokalizován responzivní element pro vitamin D. Cílem práce byla analýza pěti polymorfismů v genu pro VDR (EcoRV, FokI, ApaI, TaqI, and BsmI) a vyhodnocení jejich vlivu na vnímavost k rozvoji RS, tíži postižení, průběh onemocnění a rozdíly mezi pohlavími. Do studie bylo zařazeno celkem 296 RS pacientů, splňujících Mc Donaldova kritéria a 135 zdravých nepříbuzných jedinců. Klinický stav byl hodnocen stupnicí EDSS. Genotypizace byla provedena metodou PCR a restrikční analýzou. Nebyla nalezena asociace vyšetřených polymorfismů s vnímavostí k RS v celé skupině. Po rozdělení souboru podle pohlaví byl zjištěn signifikantní rozdíl ve frekvenci alel a/nebo genotypové distribuci u polymorfismů TaqI, BsmI a ApaI mezi skupinou zdravých a nemocných mužů (Taq,  $p_g = 0,02$ ,  $p_a = 0,02$ ; BsmI,  $p_g = 0,02$ ,  $p_a = 0,04$ ; ApaI,  $p_g = 0,008$ ,  $p_a = 0,005$ ). U žen byl prokázán významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypů ApaI u skupiny zdravých žen oproti kontrolám ( $p_g = 0,01$ ,  $p_a = 0,05$ ). Dále jsme se zaměřili na funkční genetický polymorfismus EcoRV (rs4516035), který nebyl dosud v souvislosti s RS studován. Jako první jsme prokázali signifikantně frekventnější výskyt alely C u nemocných mužů ve srovnání s kontrolami (OR 1.8; 95% CI: 1.08- 2.24),  $p_a = 0,02$ ; podílí se tedy na zvýšené vnímavosti k rozvoji RS u mužů. U žen je genotyp CT asociován s přibližně pětinasobně vyšší pravděpodobností rozvoje prognosticky nepříznivé primárně progresivní roztroušené sklerózy (CT vs. CC + TT  $p_{corr} = 0,01$ , senzitivita 0,833, specificita 0,525, síla testu 0,823). Studie in vitro prokazují, že u nosičů alely C dochází ke snížené expresi VDR, což může následně nepříznivě ovlivnit imunomodulační účinky vitamínu D<sub>3</sub> a vést ke klinické manifestaci onemocnění. **Závěry:** Naše výsledky prokazují, že variabilita vyšetřených polymorfismů v genu pro VDR je rizikovým faktorem vnímavosti a progresu RS v české populaci. Bylo zjištěno, že u mužů by se mohla podílet na riziku rozvoje choroby, u žen ovlivňuje tíži a průběh onemocnění. Úloha těchto genetických polymorfismů v patogenezi RS musí být ověřena v dalších studiích.



## The Impact of Five VDR Polymorphisms on Multiple Sclerosis Risk and Progression: a Case-Control and Genotype-Phenotype Study

Pavel Křenek<sup>1</sup> · Yvonne Benešová<sup>2</sup> · Julie Bienertová-Vašků<sup>1</sup> · Anna Vašků<sup>1</sup>

Received: 10 October 2017 / Accepted: 30 January 2018  
© Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

### Abstract

Vitamin D receptor polymorphisms have been the target of many studies focusing on multiple sclerosis. However, previously reported results have been inconclusive. The objective of this study was to investigate the association between five vitamin D receptor polymorphisms (EcoRV, FokI, ApaI, TaqI, and BsmI) and multiple sclerosis susceptibility and its course. The study was carried out as a case-control and genotype-phenotype study, consisted of 296 Czech multiple sclerosis patients and 135 healthy controls. Genotyping was carried out using polymerase chain reaction and restriction analysis. In multiple sclerosis men, allele and/or genotype distributions differed in EcoRV, TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms as compared to controls (EcoRV,  $p_a = 0.02$ ; Taq,  $p_g = 0.02$ ,  $p_a = 0.02$ ; BsmI,  $p_g = 0.02$ ,  $p_a = 0.04$ ; ApaI,  $p_g = 0.008$ ,  $p_a = 0.005$ ). In multiple sclerosis women, differences in the frequency of alleles and genotypes were found to be significant in ApaI (controls vs multiple sclerosis women:  $p_g = 0.01$ ,  $p_a = 0.05$ ). Conclusive results were observed between multiple sclerosis women in the case of EcoRV [differences in Expanded Disability Status Scale ( $p = 0.05$ ); CT genotype was found to increase the risk of primary progressive multiple sclerosis 5.5 times (CT vs CC+TT  $p_{\text{corr}} = 0.01$ , sensitivity 0.833, specificity 0.525, power test 0.823)] and FokI [borderline difference in Multiple Sclerosis Severity Score ( $p = 0.05$ )]. Our results indicate that the distribution of investigated vitamin D receptor polymorphisms is a risk factor for multiple sclerosis susceptibility and progression in the Czech population. The association between disease risk and polymorphisms was found to be stronger in men. The association of disease progression with polymorphisms was observed only in women.

**Keywords** Multiple sclerosis · Single-nucleotide polymorphism · Vitamin D receptor · EDSS · MSSS

### Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory autoimmune disorder of the central nervous system, characterized by a cascade of events involving the engagement of the immune

system, acute inflammatory injury of axons and glia, recovery of function and structural repair, post-inflammatory gliosis, and neurodegeneration (Compston & Coles, 2002). These events disrupt the ability of parts of the nervous system to communicate, resulting in a range of signs and symptoms including physical, mental, and sometimes psychiatric problems (Compston & Coles, 2002; Compston & Coles, 2008; Murray et al., 2012).

The risk of MS development seems to be determined by a combination of genetic and environmental factors. In addition to cigarette smoking, viral infections (Epstein-Barr virus, varicella zoster virus, Chlamydia pneumoniae and human endogenous retroviruses), and a decrease of intestinal helminths, these also include inadequate serum concentrations of vitamin D (Ascherio et al., 2010; Ascherio & Munger, 2007; Johnston et al., 2001). Vitamin D deficiency is thought to constitute an MS risk factor since MS frequency rises with increasing latitude, which is strongly inversely correlated with the duration and intensity of UVB from sunlight and thus also with vitamin D concentration (Ascherio et al., 2010). Simultaneously, MS prevalence was found to be lower than

✉ Yvonne Benešová  
beneivo@seznam.cz

Pavel Křenek  
394634@mail.muni.cz

Julie Bienertová-Vašků  
julka@mail.muni.cz

Anna Vašků  
avasku@med.muni.cz

<sup>1</sup> Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Kamenice 5, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>2</sup> Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic

expected at high latitudes in populations with a high consumption of vitamin D-rich fatty fish (Ascherio et al., 2010). Finally, MS risk seems to decrease with migration from high to low latitudes (Ascherio et al., 2010).

Apart from the exogenous factors, vitamin D deficiency may also be influenced by genetic factors. These factors can affect 25-hydroxy vitamin D blood concentrations through the vitamin D metabolism, skin color, and behavior (Ascherio et al., 2010). However, vitamin D effects on the immune system may also be influenced by genetic variations in vitamin D receptor (VDR) and other genes (for example vitamin D-related genes) (Ascherio et al., 2010).

In the immune system, vitamin D exerts an endocrine action on the cells, generating anti-inflammatory and immunoregulatory effects (Antico et al., 2012). Calcitriol, the most active form of vitamin D, enhances the innate immune response whereas it exercises a modulation action on the adaptive immune system (Antico et al., 2012). It regulates the interaction between lymphocytes and antigen-presenting cells and mediates an effector mechanism (Antico et al., 2012). In addition, a highly conserved vitamin D-responsive element (VDRE) has been identified in the promoter region of the HLA-DRB1\*1501 haplotype, which is the strongest genetic predictor of MS risk, conferring an approximately three times increased risk of MS in individuals of European ancestry including the inhabitants of the Czech Republic (Ascherio et al., 2010; Benešová et al., 2013a). Therefore, vitamin D receptor seems to be the connection between this genetic predictor of MS risk and inadequate serum concentrations of vitamin D and has become the subject of our research.

The objective of this study is to establish an association between genotypes/alleles given by five single-nucleotide polymorphisms (SNPs) in the vitamin D receptor gene (VDRG)—rs4516035 (EcoRV), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI), rs7975232 (ApaI), and rs1544410 (BsmI)—and MS incidence, disease duration, Expanded Disability Status Scale (EDSS), Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS), and the form of the disease.

## Materials and Methods

### Subjects

The case-control and genotype-phenotype study focused on a group of patients which included 296 unrelated Czech MS patients who met the McDonald MS criteria (McDonald et al., 2001) (216 women, 80 men; all patients of MUDr. Yvonne Benešová, Ph.D., Multiple Sclerosis Center, Department of Neurology, University Hospital Brno). The group of controls included 135 patients with no neurological diseases and no family history of such diseases (86 women, 49 men, compiled by MUDr. Yvonne Benešová, Ph.D.) whose

age and gender breakdown matched the patient group. Written informed consent was obtained from all study participants.

Patients and controls were divided into subgroups of men and women due to differences in prevalence and the course of the disease (Milo & Kahana, 2010). Disease duration and form were determined in the case of MS patients. The clinical status of MS patients was evaluated by EDSS (Kurtzke, 1983) and MSSS (Roxburgh et al., 2005). Patient characteristics are reported in Table 1.

### Genetic Analysis

DNA was isolated by phenol-chloroform extraction with proteinase K from peripheral blood leukocytes. VDR genotypes of rs4516035 (EcoRV), rs2228570 (FokI), rs731236 (TaqI), rs7975232 (ApaI), and rs1544410 (BsmI) polymorphisms were detected using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism method. An overview of utilized methods is presented in Table 2. The reliability of individual methods was verified by the sequencing of several samples.

### Statistical Analysis

Statistical associations of the identified genotypes with MS risk as well as with clinical phenotypes were calculated by means of Kruskal-Wallis ANOVA, Mann-Whitney *U* test, Fisher's exact test, and the chi-square test using Statistica 12 software.

The study was approved by the Ethics Committee of University Hospital Brno and all procedures were performed in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013.

## Results

### Case-Control Study

Study results are presented in Table 3.

#### rs4516035

Rs4516035 (EcoRV) allele frequencies showed a statistically significant difference ( $p_a$ ) between healthy male controls and MS patients (chi-square test, controls vs MS men  $p_a = 0.02$ ); MS men were 1.8 times more likely to be carriers of the C allele than controls: Fisher's exact test, OR = 1.80 (95% confidential interval 1.08–2.24),  $p = 0.02$ , sensitivity 0.575, specificity 0.571, and power test 0.600. Moreover, significant differences between MS men and women were found in the case of the C allele, which was found to be 1.55 times more frequent in MS men compared to MS women: Fisher's exact test, OR = 1.55 (1.08–2.24),  $p = 0.02$ , sensitivity 0.575, specificity 0.535, and power test 0.629.



**Table 3** Case-control study of MS patients and controls in five VDR SNPs

VDR EcoRV (rs4516035)							
Genotypes and alleles	CC (%)	CT (%)	TT (%)	$p_g$	C	T	$p_a$
MS group men (N = 80)	29 (36)	34 (43)	17 (21)	0.07	0.58	0.42	0.02
Control group men (N = 49)	9 (18)	24 (49)	16 (33)		0.43	0.57	
MS group women (N = 216)	46 (21)	109 (50)	61 (29)	0.993	0.47	0.53	0.997
Control group women (N = 86)	18 (21)	44 (51)	24 (28)		0.47	0.53	
VDR FokI (rs2228570)							
Genotypes and alleles	GG (%)	GA (%)	AA (%)	$p_g$	G	A	$p_a$
MS group men (N = 80)	28 (35)	41 (51)	11 (14)	0.609	0.61	0.39	0.476
Control group men (N = 49)	16 (33)	23 (47)	10 (20)		0.56	0.44	
MS group women (N = 216)	74 (34)	104 (48)	38 (18)	0.179	0.58	0.42	0.340
Control group women (N = 86)	21 (24)	51 (59)	14 (17)		0.54	0.46	
VDR TaqI (rs731236)							
Genotypes and alleles	AA (%)	AG (%)	GG (%)	$p_g$	A	G	$p_a$
MS group men (N = 80)	20 (25)	49 (61)	11 (14)	0.02	0.56	0.44	0.02
Control group men (N = 49)	24 (49)	21 (43)	4 (8)		0.70	0.30	
MS group women (N = 216)	98 (45)	102 (47)	16 (8)	0.65	0.69	0.31	0.44
Control group women (N = 86)	34 (40)	45 (52)	7 (8)		0.66	0.34	
VDR ApaI (rs7975232)							
Genotypes and alleles	CC (%)	AC (%)	AA (%)	$p_g$	C	A	$p_a$
MS group men (N = 80)	8 (10)	47 (59)	25 (31)	0.008	0.39	0.61	0.005
Control group men (N = 49)	13 (27)	30 (61)	6 (12)		0.57	0.43	
MS group women (N = 216)	19 (9)	136 (63)	61 (28)	0.01	0.40	0.60	0.05
Control group women (N = 86)	18 (21)	48 (56)	20 (23)		0.49	0.51	
VDR BsmI (rs1544410)							
Genotypes and alleles	CC (%)	CT (%)	TT (%)	$p_g$	C	T	$p_a$
MS group men (N = 80)	17 (21)	52 (65)	11 (14)	0.02	0.54	0.46	0.04
Control group men (N = 49)	23 (47)	23 (47)	3 (6)		0.66	0.34	
MS group women (N = 216)	97 (45)	101 (47)	18 (8)	0.963	0.68	0.32	0.841
Control group women (N = 86)	38 (44)	40 (47)	8 (9)		0.67	0.33	

MS multiple sclerosis, SNP single-nucleotide polymorphism

2005; Suzuki et al., 2003). We found the association of angiotensinogen (-6)A/G, M235T/gene polymorphism with disease severity and demonstrated a significant association of M235T polymorphism with Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS) ( $p = 0.02$ ) (Hladíková et al., 2011).

VDR polymorphisms have recently been the target of a large number of studies. They have been extensively studied

with regard to their association with the risk of autoimmune diseases, e.g., systemic lupus erythematosus, type 1 diabetes mellitus, inflammatory bowel diseases, and autoimmune thyroid disease (Ascherio et al., 2010; Yang et al., 2013; D'Aurizio et al., 2015). Many of the studies also focused on multiple sclerosis (Ascherio et al., 2010). However, EcoRV SNP has never been studied in connection with multiple

**Table 4** Genotype-phenotype study—MS women and rs4516035

Genotype	Number of patients	EDSS Median (range)	Disease duration [years] Median (range)	Disease form		
				RRMS	SPMS	PPMS
CT	109	3.5 (1.0–8.0)	7.0 (1.0–29.0)	80	14	15
CC	46	3.0 (1.0–7.5)	6.5 (1.0–35.0)	33	11	2
TT	61	2.5 (1.0–8.0)	4.0 (1.0–30.0)	53	7	1
All groups	216	3.0 (1.0–8.0)	6.0 (1.0–35.0)	166	32	18

MS multiple sclerosis, EDSS Expanded Disability Status Scale, RRMS relapsing-remitting multiple sclerosis, SPMS secondary progressive multiple sclerosis, PPMS primary progressive multiple sclerosis

**Table 1** MS patient characteristics

MS patients	Age at sampling median (age range)	EDSS median (range)	Disease duration in years median (range)
Women (216)	37 (17–69)	3.0 (1–8)	6 (1–35)
Men (80)	34 (15–61)	3.5 (1–8)	5 (1–31)

MS multiple sclerosis, EDSS Expanded Disability Status Scale

**rs2228570**

No differences in rs2228570 (FokI) allele frequency and/or genotype distribution were observed in the case-control study.

**rs731236**

In the case of the rs731236 (TaqI) polymorphism, different allele frequencies ( $p_a$ ) and genotype distributions ( $p_g$ ) were established between the male control group and MS men (chi-square test, controls vs MS men  $p_g = 0.02$ ,  $p_a = 0.02$ ). The G allele was found to increase the risk of MS development 1.9 times: Fisher's exact test, OR = 1.90 (95% confidential interval 1.11–3.24),  $p = 0.02$ , sensitivity 0.556, specificity 0.296, and power test 0.561.

**rs7975232**

In the case of the rs7975232 (ApaI) polymorphism, different genotype/allele frequencies were observed between the male control group and MS men and between the female control group and MS women (chi-square test, male controls vs MS men  $p_g = 0.008$ ,  $p_a = 0.005$ ; female controls vs MS women  $p_g = 0.01$ ,  $p_a = 0.05$ ). The A allele of the ApaI increased the risk of MS development 2.05 times in men [Fisher's exact test, OR = 2.05 (95% confidential interval 1.23–3.42),  $p = 0.005$ , sensitivity 0.394, specificity 0.429, power test 0.724] and 1.42 times in women [Fisher's exact test, OR = 1.42 (95% confidential interval 0.99–2.02),  $p = 0.05$ , sensitivity 0.597, specificity 0.488, power test 0.487].

**rs1544410**

The Rs1544410 (BsmI) SNP was associated with different genotype/allele frequencies between male controls and MS men (chi-square test, controls vs MS men  $p_g = 0.02$ ,  $p_a = 0.04$ ). The presence of the T allele increased the risk of MS development in men 2.05 times [Fisher's exact test, OR = 2.05 (95% confidential interval 1.20–3.49),  $p = 0.006$ , sensitivity 0.463, specificity 0.704, power test 0.681]. In the case of the BsmI polymorphism, a significant difference was observed between MS men and MS women in terms of both allele frequency and genotype distribution (chi-square test, MS men vs MS women  $p_g = 0.0009$ ,  $p_a = 0.001$ ). In a codominant

heredity model, the CC genotype was observed 3.02 times more frequently in MS women than in MS men: Fisher's exact test, OR = 3.02 (95% confidential interval 1.66–5.49),  $p = 0.0001$ , sensitivity 0.449, specificity 0.788, and power test 0.970. This result is highly clinically specific and statistically reliable.

**Genotype-Phenotype Study****rs4516035**

In the case of EcoRV, EDSS differences in MS women were found to be borderline statistically significant (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0.05$ ; Table 4) while differences in disease duration were found to be highly statistically significant (Kruskal-Wallis ANOVA,  $p = 0.003$ ; Table 4). In addition, the form of the disease varied among MS women on the ground of EcoRV polymorphism. Women with primary progressive multiple sclerosis (PPMS) were 5.5 times more likely to have the CT genotype than women with either relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS) and secondary progressive multiple sclerosis (SPMS): Fisher's exact test, PPMS vs RRMS+SPMS OR = 5.532 (95% confidential interval 1.553–19.710),  $p = 0.003$ ,  $p_{\text{corr}} = 0.01$  (Bonferroni correction), sensitivity 0.833, specificity 0.525, and power test 0.823.

**rs2228570**

In the case of rs2228570 (FokI), a difference in MSSS was established with borderline statistical significance in women (chi-square test,  $p_G = 0.05$ ). To detail, MS women with AA genotype have lower MSSS median (Mann-Whitney  $U$  test,  $p = 0.02$ ; Table 5).

No conclusive results were observed in the genotype-phenotype study either in the case of MS men or for the remaining examined SNPs.

**Discussion**

MS is a chronic neuro-inflammatory autoimmune disease with a complex etiology. The human leukocyte antigen (HLA) class II region, namely the HLA-DRB1\*1501 allele ( $p = 1 \times 10^{-320}$ , OR = 3.1), has been linked to MS in northern



Table 2 PCR methods employed in this study

SNP	rs4516035 (EcoRV)	rs2228570 (FokI)	rs731236 (TaqI)	rs7975232 (ApaI)	rs1544410 (BsmI)
Forward primer	SCCTCTCTGTAAG AGGC GAATAGCGAT3	5AGCTGGCCCTGGC ACTG ACTCTGGCTCT3	SCAGAGCATGGACAG GGAGCAA3	5CAGAGCATGGACAG GGAGCAA3	5CAACCAAGACTACA AGTACCCCGTCAGTGA3
Reverse primer	5GGACAGGTGAAAA AGATGGGGTTC3	5ATGGAAACACCTTGC TTCTTCCCTC3	5GCAACTCTCTCATGG CTGAGGCTC3	5GCAACTCTCATGG CTGAGGCTC3	5AAACACCGGAA GAGG TCAAAGG3
PCR product length	179 bp	267 bp	745 bp	745 bp	813 bp
Restriction enzyme	EcoRV	FokI	TaqI	ApaI	BsmI
Incubation temperature	37 °C	65 °C	37 °C	37 °C	37 °C
Genotypes (restriction analysis fragment length)	CC (179 bp) TT (152 + 27 bp) CT (179 + 152 + 27 bp)	GG (267 bp) AA (193 + 74 bp) GA (267 + 193 + 74 bp)	AA (496 + 249 bp) GG (295 + 249 + 201 bp) AG (496 + 295 + 249 + 201 bp)	AA (745 bp) CC (532 + 213 bp) AC (745 + 532 + 213 bp)	TT (813 bp) CC (670 + 145 bp) CT (813 + 670 + 145 bp)

The italicized values are insignificant

PCR polymerase chain reaction, SNP single-nucleotide polymorphism

Europeans (Sadovnick, 2012; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, et al., 2011; Schmied et al., 2012). In our previous study, we investigated the HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 gene polymorphism. A significant difference in genotype distribution ( $p_g = 3.06 \times 10^{-9}$ ) (OR = 4.27, 95% CI 2.64–6.92) and allele frequency ( $p_a = 6.08 \times 10^{-10}$ ) between MS patients and controls was demonstrated and significant difference between female MS patients and female controls in genotype distribution ( $p_g = 1.3 \times 10^{-8}$ ) and allele frequency ( $p_a = 2.82 \times 10^{-9}$ ) (OR = 5.11, 95% CI 2.86–9.15) was also proved (Benešová et al., 2013b).

Recently, another 110 MS risk variants mapped to 103 discrete loci outside of the HLA region have been established (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) et al., 2013). Genes encoding cytokine pathways and costimulatory and signal transduction molecules of immunological relevance have been identified and, in addition, environmental risk factors such as vitamin D have also been found. There is a relative absence of genes to be relevant to potential pathways for neurodegeneration independent of inflammation (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) et al., 2013). More than one third of the known risk polymorphisms were previously associated with other autoimmune diseases (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, et al., 2011; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) et al., 2013). This supports an autoimmune etiology for MS and emphasizes the possibility that common pathways may be dysregulated in different autoimmune diseases.

Neuro-inflammatory reactions and blood-brain barrier (BBB) disruption are early and central events in MS immunopathogenesis (Jadidi-Niaragh & Mirshafiey, 2011; Pittock & Lucchinetti, 2007). It is considered that matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the breakdown of the BBB, invasion of immune cells into the CNS parenchyma, degradation of the myelin basic protein (Leppert et al., 1998; Ram et al., 2006), and direct neurotoxicity (Newman et al., 2001; Yushchenko et al., 2003). Our previous study disclosed a significant association between the risk of MS and MMP-9-1562C/T gene polymorphism (Benešová et al., 2008). A significantly lower frequency of the -1562 T allele carrier was found in MS patients compared to healthy controls ( $p_a = 0.01$ , OR = 0.58, 95% CI 0.38–0.89). Significant differences were also demonstrated between female patients and healthy females ( $p_a = 0.01$ ,  $p_{\text{corr}} = 0.05$ ) (OR = 0.53, 95% CI 0.32–0.86).

Also, angiotensinogen (ATG), classified as systemic acute-phase protein, plays a role in regulation of vascular and BBB permeability, activation of infiltrating immunocompetent cells, recruitment of inflammatory cells into the tissues, and expression of pro-inflammatory and pro-oxidant genes (Das,

**Table 5** Genotype-phenotype study—MS women and rs2228570

VDR FokI (GG+GA/AA)	Number of patients	MSSS minimum	MSSS maximum	MSSS median
GG+GA	177	0.937	9.950	5.749
AA	39	0.994	9.737	4.568
All groups	216	0.937	9.950	5.418

MS multiple sclerosis, EDSS Expanded Disability Status Scale, MSSS Multiple Sclerosis Severity Score

sclerosis and previous research into the connection between VDR polymorphisms and MS generally provided inhomogeneous findings.

In the case of FokI SNP, while some previous case-control studies did provide significant results (Simon et al., 2010; Partridge et al., 2004; Čierny et al., 2015; Tizaoui et al., 2015), the most of investigations regarding the risk of the disease development offered inconclusive results (Smolders et al., 2009a; Dickinson et al., 2009; Abdollahzadeh et al., 2016; Agnello et al., 2016; Al-Temaimi et al., 2015; Narooie-Nejad et al., 2015a; García-Martín et al., 2013; Huang & Xie, 2012; Cox et al., 2012). In the case of ApaI SNP, some case-control studies were performed with conclusive results (Tizaoui et al., 2015; Abdollahzadeh et al., 2016; Al-Temaimi et al., 2015; Tajouri et al., 2005; Narooie-Nejad et al., 2015b) but others reached inconclusive findings (Agnello et al., 2016; Huang & Xie, 2012; Smolders et al., 2009b; Yamout et al., 2016; Ben-Selma et al., 2015). A similar situation occurred in TaqI case-control studies, where the number of TaqI investigations with significant results (Abdollahzadeh et al., 2016; Al-Temaimi et al., 2015; Cox et al., 2012; Tajouri et al., 2005; Narooie-Nejad et al., 2015b; Ben-Selma et al., 2015; Agliardi et al., 2011) equaled the number of studies with non-significant results (Tizaoui et al., 2015; Dickinson et al., 2009; Agnello et al., 2016; García-Martín et al., 2013; Huang & Xie, 2012; Smolders et al., 2009b; Sioka et al., 2011). Finally, the ratio of conclusive (Abdollahzadeh et al., 2016; Al-Temaimi et al., 2015; Narooie-Nejad et al., 2015a; Fukazawa et al., 1999; Niino et al., 2000; Čierny et al., 2016) and inconclusive (Tizaoui et al., 2015; Agnello et al., 2016; Huang & Xie, 2012; Yamout et al., 2016; Sioka et al., 2011) findings was repeated in the case of BsmI case-control studies. In the case-control studies of more SNPs, only two combined studies of ApaI, BsmI, and TaqI SNPs (Abdollahzadeh et al., 2016; Al-Temaimi et al., 2015), two combined studies of ApaI and TaqI (Tajouri et al., 2005; Narooie-Nejad et al., 2015b), and one combined study of ApaI and FokI (Tizaoui et al., 2015) had conclusive findings for more than one polymorphism at the same time. Thus, this case-control study is the only one to date to provide statistically significant results in the case of four VDR SNPs.

Apart from one genotype-phenotype study focusing on ApaI and TaqI (Tajouri et al., 2005) and two genotype-phenotype studies of FokI (Čierny et al., 2016; Mamutse

et al., 2008), no impact of VDR polymorphisms on the progression of MS was proved in the genotype-phenotype studies compared to our research. Moreover, highly clinically sensitive results in our genotype-phenotype study of EcoRV may be used for distinguishing between more benign forms and PPMS in the early phases of disease development in MS women.

Despite the small size of the control group, this study may be perceived as demonstrative for power test values, which were sufficiently large in many results. Nevertheless, potential limitation of this study is the absence of an assessment of 25-hydroxyvitamin D 25(OH)D levels in relation to investigated SNPs because dose-dependent effect of vitamin D on MS development has recently been confirmed (Munger et al., 2017; Rhead et al., 2016). Munger et al. (2017) in a prospective case-control study among 800,000 women in the Finnish Maternity Cohort, with 1.8 million serum samples taken during the pregnancies, proved twofold higher MS risk in women with 25(OH)D < 30 nmol/l as compared to women with 25(OH)D ≥ 50 nmol/l (RR 2.02, 95% CI 1.18–3.45,  $p = 0.01$ ) (Munger et al., 2017). Rheyad et al. (2016) in large study proved strong evidence that low serum 25(OH)D concentration is a cause of MS, independent of established risk factors (Rhead et al., 2016).

Although most existing studies did not divide patients according to sex, we decided to do so due to dissimilar disease incidence, course, and prognosis (Compston & Coles, 2008; Milo & Kahana, 2010). This could have been reflected in our results that were for both groups very different.

Any conclusive association of VDR polymorphisms with MS remains difficult to establish due to the complexity of MS etiopathology. Further genetic, biochemical, and immunological studies are therefore needed in order to obtain more definitive results.

**Acknowledgements** The authors would like to thank the laboratory personnel of the Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, and the employees of the Department of Neurology, University Hospital Brno, for their help. The authors would also like to thank all patients and controls for participating in the study.

**Funding Information** This publication was written at Masaryk University as part of the project “Experimentální molekulární patofyziologie vybraných komplexních chorob/stavů”, No. 1549/2014 and “Genetická a epigenetická patofyziologie vybraných stavů”, No. 1426/2015 with the support of the Specific University Research Grant, as provided by the Ministry of Education, Youth and Sports of the Czech Republic in 2015 and 2016.



## Compliance with Ethical Standards

The study was approved by the Ethics Committee of University Hospital Brno and all procedures were performed in accordance with the Helsinki Declaration as revised in 2013. Written informed consent was obtained from all study participants.

**Conflict of Interest** The authors declare that there is no conflict of interests.

## References

- Abdollahzadeh R, Fard MS, Rahmani F, Moloudi K, Kalani BS, Azarnehad A (2016) Predisposing role of vitamin D receptor (VDR) polymorphisms in the development of multiple sclerosis: a case-control study. *J Neurol Sci* 367:148–151. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2016.05.053>
- Agliardi C, Guerini FR, Saresella M, Caputo D, Leone MA, Zanzottera M, Bolognesi E, Marventano I, Barizzone N, Fasano ME, Al-Daghri N, Clerici M (2011) Vitamin D receptor (VDR) gene SNPs influence VDR expression and modulate protection from multiple sclerosis in HLA-DRB1\*15-positive individuals. *Brain Behav Immun* 25(7):1460–1467. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.05.015>
- Agnello L, Scazzone C, Ragonese P, Salemi G, Lo Sasso B, Schillaci R, Musso G, Bellia C, Ciaccio M (2016) Vitamin D receptor polymorphisms and 25-hydroxyvitamin D in a group of Sicilian multiple sclerosis patients. *Neurol Sci* 37(2):261–267. <https://doi.org/10.1007/s10072-015-2401-0>
- Al-Temaimi RA, Al-Enezi A, Al-Serri A, Alroughani R, Al-Mulla F (2015) The association of vitamin D receptor polymorphisms with multiple sclerosis in a case-control study from Kuwait. *PLoS One* 10(11):e0142265. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142265>
- Antico A, Tampoa M, Tozzoli R, Bizzaro N (2012) Can supplementation with vitamin D reduce the risk or modify the course of autoimmune diseases? A systematic review of the literature. *Autoimmun Rev* 12(2):127–136. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2012.07.007>
- Ascherio A, Munger KL (2007) Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol* 61(4):288–299
- Ascherio A, Munger KL, Simon KC (2010) Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 9(6):599–612. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70086-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70086-7)
- Benešová Y, Vašků A, Štourač P, Hladíková M, Beránek M, Kadaňka Z, Novotná H, Bednařík J (2008) Matrix metalloproteinase-9 and matrix metalloproteinase-2 gene polymorphisms in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 205(1–2):105–109
- Benešová Y, Vašků A, Štourač P, Hladíková M, Fiala A, Bednařík J (2013a) Association of HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 gene polymorphism with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 255(1–2):92–96. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2012.10.014>
- Benešová Y, Vašků A, Štourač P, Hladíková M, Fiala A, Bednařík J (2013b) Association of HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 gene polymorphism with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 255(1–2):92–96
- Ben-Selma W, Ben-Fredj N, Chebel S, Frih-Ayed M, Aouni M, Boukadida J (2015) Age- and gender-specific effects on VDR gene polymorphisms and risk of the development of multiple sclerosis in Tunisians: a preliminary study. *Int J Immunogenet* 42(3):174–181. <https://doi.org/10.1111/iji.12197>
- Čierny D, Michalík J, Kurča E, Dobrota D, Lehotský J (2015) FokI vitamin D receptor gene polymorphism in association with multiple sclerosis risk and disability progression in Slovaks. *Neurol Res* 37(4):301–308. <https://doi.org/10.1179/1743132814Y.0000000459>
- Čierny D, Michalík J, Škereňová M, Kantorová E, Sivák Š, Javor J, Kurča E, Dobrota D, Lehotský J (2016) ApaI, BsmI and TaqI VDR gene polymorphisms in association with multiple sclerosis in Slovaks. *Neurol Res* 38(8):678–684. <https://doi.org/10.1080/01616412.2016.1200287>
- Compston A, Coles A (2002) Multiple sclerosis. *Lancet* 359(9313):1221–1231
- Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372(9648):1502–1517. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(08\)61620-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)61620-7)
- Cox MB, Ban M, Bowden NA, Baker A, Scott RJ, Lechner-Scott J (2012) Potential association of vitamin D receptor polymorphism Taq1 with multiple sclerosis. *Mult Scler* 18(1):16–22. <https://doi.org/10.1177/1352458511415562>
- D'Aurizio F, Villalta D, Metus P, Doretto P, Tozzoli R (2015) Is vitamin D a player or not in the pathophysiology of autoimmune thyroid diseases? *Autoimmun Rev* 14(5):363–369. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2014.10.008>
- Das UN (2005) Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit* 11:155–162
- Dickinson JL, Perera DI, van der Mei AF, Ponsonby AL, Polanowski AM, Thomson RJ, Taylor BV, McKay JD, Stankovich J, Dwyer T (2009) Past environmental sun exposure and risk of multiple sclerosis: a role for the Cdx-2 vitamin D receptor variant in this interaction. *Mult Scler* 15(5):563–570. <https://doi.org/10.1177/1352458509102459>
- Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada T, Miyasaka K, Tashiro K (1999) Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese. *J Neurol Sci* 166(1):47–52
- García-Martín E, Agúndez JA, Martínez C, Benito-León J, Millán-Pascual J, Calleja P, Díaz-Sánchez M, Pisa D, Turpin-Fenoll L, Alonso-Navarro H, Ayuso-Peralta L, Torrecillas D, Plaza-Nieto JF, Jiménez-Jiménez FJ (2013) Vitamin D3 receptor (VDR) gene rs2228570 (Fok1) and rs731236 (Taq1) variants are not associated with the risk for multiple sclerosis: results of a new study and a meta-analysis. *PLoS One* 8(6):e65487. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0065487>
- Hladíková M, Vašků A, Štourač P, Benešová Y, Bednařík J (2011) Two frequent polymorphisms of angiotensinogen and their association with multiple sclerosis progression rate. *J Neurol Sci* 303(1–2):31–34
- Huang J, Xie ZF (2012) Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and multiple sclerosis risk: a meta-analysis of case-control studies. *J Neurol Sci* 313(1–2):79–85. <https://doi.org/10.1016/j.jns.2011.09.024>
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2); International IBD Genetics Consortium (IBDGC), Beecham AH et al (2013) Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. *Nat Genet* 45:1353–1360
- 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 et al (2011) Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476:214–219
- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A (2011) Th17 cell, the new player of neuroinflammatory process in multiple sclerosis. *Scand J Immunol* 74:1–13
- Johnston JB, Silva C, Holden J, Warren KG, Clark AW, Power C (2001) Monocyte activation and differentiation augment human endogenous retrovirus expression: implications for inflammatory brain diseases. *Ann Neurol* 50(4):434–442
- Kurtzke JF (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS). *Neurology* 33:1444–1452



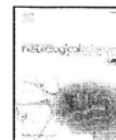
- Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S et al (1998) Matrix metalloproteinase -9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain* 121:2327–2334
- Mamutse G, Woolmore J, Pye E, Partridge J, Boggild M, Young C, Fryer A, Hoban PR, Rukin N, Alldersea J, Strange RC, Hawkins CP (2008) Vitamin D receptor gene polymorphism is associated with reduced disability in multiple sclerosis. *Mult Scler* 14(9):1280–1283. <https://doi.org/10.1177/1352458508094643>
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, McFarland HF, Paty DW, Polman CH, Reingold SC, Sandberg-Wollheim M, Sibley W, Thompson A, van den Noort S, Weinschenker BY, Wolinsky JS (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:121–127
- Milo R, Kahana E (2010) Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 9(5):A387–A394. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.11.010>
- Munger KL, Hongell K, Aivo J, Soilu-Hänninen M, Surcel HM, Ascherio A (2017) 25-Hydroxyvitamin D deficiency and risk of MS among women in the Finnish Maternity Cohort. *Neurology* 89(15):1578–1583. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000004489>
- Murray ED, Buttnar EA, Price BH (2012) Depression and psychosis in neurological practice. In: Daroff R, Fenichel G, Jankovic J, Mazziotta J (eds) *Bradley's neurology in clinical practice*, 6th edn. Elsevier Saunders, Philadelphia, pp 103–116
- Narooie-Nejad M, Moossavi M, Torkamanzahi A, Moghtaderi A, Salimi S (2015a) Vitamin D receptor gene polymorphism and the risk of multiple sclerosis in South Eastern of Iran. *J Mol Neurosci* 56(3):572–576. <https://doi.org/10.1007/s12031-015-0513-x>
- Narooie-Nejad M, Moossavi M, Torkamanzahi A, Moghtaderi A (2015b) Positive association of vitamin D receptor gene variations with multiple sclerosis in South East Iranian population. *Biomed Res Int* 2015:427519. <https://doi.org/10.1155/2015/427519>
- Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH (2001) T-cell- and macrophage mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases. *Brain* 124:2203–2214
- Niino M, Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Tashiro K (2000) Vitamin D receptor gene polymorphism in multiple sclerosis and the association with HLA class II alleles. *J Neurol Sci* 177(1):65–71
- Partridge JM, Weatherby SJ, Woolmore JA, Highland DJ, Fryer AA, Mann CL, Boggild MD, Ollier WE, Strange RC, Hawkins CP (2004) Susceptibility and outcome in MS: associations with polymorphisms in pigmentation-related genes. *Neurology* 62(12):2323–2325
- Pittock SJ, Lucchinetti CF (2007) The pathology of MS: new insights and potential clinical applications. *Neurologist* 13:45–56
- Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y (2006) Matrix metalloproteinase-9 and autoimmune diseases. *J Clin Immunol* 26:299–307
- Rhead B, Bäämhielm M, Gianfrancesco M, Mok A, Shao X, Quach H, Shen L, Schaefer C, Link J, Gyllenberg A, Hedström AK, Olsson T, Hillert J, Kockum I, Glymour MM, Alfredsson L, Barcellos LF (2016) Mendelian randomization shows a causal effect of low vitamin D on multiple sclerosis risk. *Neurol Genet* 2(5):e97. <https://doi.org/10.1212/NXG.0000000000000097>
- 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, Mizerski B, Epplen JT, Oturai A, Sørensen PS, Celiu 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, Sá M, Salemi G, Savettieri G, Hillert J, Compston DA (2005) Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 64:1144–1151
- Sadovnick AD (2012) Genetic background of multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 11:163–166
- Schmied MC, Zehetmayer S, Reindl M, Ehling R, Bajer-Korinek B, Leutmezer F, Zebeholzer K, Hotzy C, Lichtner P, Meitinger T, Wichmann HE, Illig T, Gieger C, Huber K, Khalil M, Fuchs S, Schmidt H, Auff E, Kristoferitsch W, Fazekas F, Berger T, Vass K, Zimprich A (2012) Replication study of multiple sclerosis (MS) susceptibility alleles and correlation of DNA-variants with disease features in a cohort of Austrian MS patients. *Neurogenetics* 13:181–187
- Simon KC, Munger KL, Yang X, Ascherio A (2010) Polymorphisms in vitamin D metabolism related genes and risk of multiple sclerosis. *Mult Scler* 16(2):133–138. <https://doi.org/10.1177/1352458509355069>
- Sioka C, Papakonstantinou S, Markoula S, Gkartzioi F, Georgiou A, Georgiou I, Pelidou SH, Kyritsis AP, Fotopoulos A (2011) Vitamin D receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis patients in northwest Greece. *J Negat Results Biomed* 10:3. <https://doi.org/10.1186/1477-5751-10-3>
- Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R (2009a) Fok-I vitamin D receptor gene polymorphism (rs10735810) and vitamin D metabolism in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 207(1–2):117–121. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2008.12.011>
- Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R (2009b) Association study on two vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D metabolites in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 1173:515–520. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04656.x>
- Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egidio J (2003) Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 35:881–900
- Tajouri L, Ovcaric M, Curtain R, Johnson MP, Griffiths LR, Csurhes P, Pender MP, Lea RA (2005) Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population. *J Neurogenet* 19(1):25–38
- Tizaoui K, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K (2015) Association between vitamin D receptor polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis of case-control studies. *Cell Mol Immunol* 12(2):243–252. <https://doi.org/10.1038/cmi.2014.47>
- Yamout B, Karaky NM, Mahfouz RA, Jaber F, Estaitieh N, Shamaa D, Abbas F, Hoteit R, Daher RT (2016) Vitamin D receptor biochemical and genetic profiling and HLA-class II genotyping among Lebanese with multiple sclerosis—a pilot study. *J Neuroimmunol* 293:59–64. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2016.02.008>
- Yang CY, Leung PS, Adamopoulos IE, Gershwin ME (2013) The implication of vitamin D and autoimmunity: a comprehensive review. *Clin Rev Allergy Immunol* 45(2):217–226. <https://doi.org/10.1007/s12016-013-8361-3>
- Yushchenko M, Mader M, Elitok E, Bitsch A, Dressel A, Tumani H, Bogumil T, Kitzke B, Poser S, Weber F (2003) Interferon-beta-1b decreased matrixmetalloproteinase-9 serum levels in primary progressive multiple sclerosis. *J Neurol* 250:1224–1228

**Hladíková M, Vašků A, Štourač P, Benešová Y, Bednařík J.**

Two frequent polymorphisms of angiotensinogen and their association with multiple sclerosis progression rate. *J Neurol Sci.* 2011; 303 (1-2): 31-34. **IF 2.167**

### **Resumé**

Renin-angiotenzinový systém je zkoumán zejména ve spojitosti s regulací krevního tlaku a iontového hospodářství, ale byl zjištěn také jeho podíl v zánětlivém procesu na různých systémových úrovních v celém organismu. Angiotenzinogen (ATG) spolu s jedním ze svých produktů, angiotenzinem II je definován jako prozánětlivý mediátor. Hrají roli v procesu regulace propustnosti cévní a hematoencefalické bariéry, aktivaci infiltrujících imunokompetentních buněk, expresi prozánětlivých a prooxidačních genů či zesílení fagocytární aktivity u makrofágů. ATG může být v CNS lokálně exprimován buňkami glie, neurony a makrofágy. Studovali jsme dva funkční polymorfizmy v genu pro ATG; (-6) A/G v promotorové oblasti genu a M235T v exonu a ACE I/D. Cílem studie bylo zjistit, zda existuje asociace mezi zkoumanými polymorfizmy a vnímavostí k roztroušené skleróze, s tíží klinického postižení a/nebo formě tohoto onemocnění. Genotypizace byla provedena v souboru 195 pacientů s diagnózou roztroušené sklerózy a 126 zdravých kontrol. Tíže postižení byla kvantifikována pomocí MSSS. Neprokázali jsme statisticky signifikantní rozdíl v genotypové či alelické distribuci pro zkoumané polymorfizmy mezi skupinou nemocných a kontrolními osobami ani mezi skupinami pacientů s rozdílnými formami onemocnění. Nalezli jsme signifikantní korelaci mezi genetickým polymorfismem M235T a tíží postižení. Homozygoti MM měli nejlehčí (3.8), heterozygoti MT vyšší (5.2) a homozygoti TT nejtěžší (5.4) stupeň postižení vyjádřený pomocí MSSS ( $p=0.02$ ). V polymorfismu (-6) A/G v genu pro ATG byla zjištěna pouze hraniční asociace ( $p=0.06$ ), homozygoti GG měli nižší hodnoty MSSS než heterozygoti a homozygoti AA. Závěr: Naše studie neprokázala, že by (-6) A/G a M235T ATG polymorfizmy měly vliv na vnímavost k roztroušené skleróze, ani že by asociovaly s různými formami tohoto onemocnění. Zjistili jsme však, že polymorfismus M235T může ovlivnit tíži postižení pravděpodobně aktivací zánětlivého procesu.



## Two frequent polymorphisms of angiotensinogen and their association with multiple sclerosis progression rate

Magdalena Hladikova<sup>a,\*</sup>, Anna Vaškú<sup>b</sup>, Pavel Štourač<sup>a</sup>, Yvonne Benešová<sup>a</sup>, Josef Bednařík<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Neurology, The Faculty Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Jihlavská 20, 625 00 Brno, Czech Republic

<sup>b</sup> Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Komenského náměstí 2, 662 43 Brno, Czech Republic

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 15 September 2010  
Received in revised form 3 December 2010  
Accepted 19 January 2011  
Available online 12 February 2011

#### Keywords:

Multiple sclerosis  
Angiotensin converting enzyme  
Angiotensinogen  
Polymorphism  
Neuroinflammation

### ABSTRACT

A total of 195 patients with multiple sclerosis (MS) and 126 controls were investigated for angiotensinogen/(-6)A/G, M235T and angiotensin converting enzyme I/D gene polymorphisms to test their association with MS susceptibility and/or disease progression using Global Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). We demonstrated a significant association of M235T polymorphism with MSSS. The MM homozygotes had the lowest (3.8), heterozygotes MT higher (5.2) and homozygotes TT the highest (5.4) mean MSSS values ( $P=0.02$ ). For polymorphisms (-6)A/G of ATG, only a trend was observed ( $P=0.06$ ), where the homozygotes GG carried lower MSSS values than heterozygotes and homozygotes AA. No significant association with susceptibility was observed. For ACE I/D polymorphism, neither significant differences in the genotype-phenotype study nor in the case-control study were observed.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

### 1. Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory demyelinating disease of the central nervous system (CNS) leading to progressive dysfunction in motor, sensory and vegetative systems. It is characterized by a destruction of myelin sheath of nerve fibers, axonal loss and neuronal degeneration [1,2].

According to the pathogenesis two major processes are important – neuroinflammation and neurodegeneration. The inflammation is present also in the time of clinical remission, which is well documented by MRI where we can find formation of new demyelinating inflammatory lesions in the brain and the spinal cord [3,4].

In the last few years a lot of studies documented that renin-angiotensin system (RAS) is widely involved in the process of inflammation not only in the fluid balance and blood pressure control [5]. ATG as a precursor and AT II as a final product of the ACE activity are these days classified as pro-inflammatory mediators. They can play a role in the process such as regulation of vascular and BBB permeability, activation of infiltrating immunocompetent cells, recruitment of inflammatory cells into the tissues, expression of pro-inflammatory and pro-oxidant genes [6,7]. AT II can enhance the adhesion of monocytes and neutrophils to endothelial cells, can up-regulate a phagocytic activity of macrophages, can cause the increased leukocyte rolling flux, their adhesion and migration, can directly enhance intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion

molecule 1 (VCAM-1) and can increase selectins expressions in vascular endothelial cells [7]. Inflammation activates angiotensinogen transcription as a result of the macrophage-derived cytokines interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$ . Activation of the RAS, through production of AT II as a main effector of this system, results in positive feedback stimulation of angiotensinogen synthesis [8].

The aim of the study was to investigate whether association among ATG and ACE polymorphisms and a susceptibility to multiple sclerosis and/or disease severity exists.

ATG gene is found in 1q41-42. We studied two functional polymorphisms. The first is the site mutation in the promoter region (-6) A/G and the second M235T polymorphism (exon 2) with the substitution of amino acid. A and T alleles in both polymorphisms are connected with elevated expression and higher final plasma levels in healthy persons [9].

The human ACE gene in chromosomal region 17q23 spans 21 kb and comprises 26 exons [10]. In intron 16, the ACE gene has an insertion/deletion (287 bp) polymorphism that causes 25–50% of the phenotypic variance in serum ACE levels. The ACE DD genotype is associated with high, ID with intermediate and II with low tissue and plasma levels [11,12].

### 2. Materials and methods

#### 2.1. Patients and controls

It was a case-control study. A total of 195 unrelated patients with definitive MS (49 men and 146 women) according to McDonald's criteria revised 2005 [13] were recruited. The cohort included patients

\* Corresponding author. Tel.: +420 603752215; fax: +420 532232249.  
E-mail address: [magdap@centrum.cz](mailto:magdap@centrum.cz) (M. Hladikova).

with relapse remitting RR (157), secondary progressive SP (26) and primary progressive PP (12) disease course and with mean age  $37.6 \pm 9.3$  years.

Disease severity was estimated using Global Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS), which reflects the relation between disease disability and disease duration [14]. In our study the median value of MSSS was 4.95 (minimum 0.937, maximum 9.862).

The control group was represented by 126 healthy controls (44 men and 82 women) with no personal history of MS or another autoimmune disease. The control individuals were matched for age and sex.

The study was approved by Committee for Ethics of Medical Experiments on Human Subjects, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno. The written informed consent of examined subjects was obtained.

## 2.2. Genotyping

All subjects were genotyped for M235T and (–6)A/G polymorphisms of ATG gene and for ACE I/D polymorphism according to Russ, Hegele and Rigat [15–17].

## 2.3. Statistical analysis

Comparison of the allelic variant frequencies as well as comparisons of double genotypes in the case–control study were performed by Fisher's exact test. The  $\chi^2$  test was used to compare categorical variables and to test differences between observed and expected frequencies, assuming Hardy–Weinberg equilibrium and also for testing the genotype distribution. *P*-values were corrected by Holm's test (Pcorr) for multiple comparison. A relation between genotypes and disease severity evaluated by MSSS was set using a Kluskal–Wallis ANOVA test according to Roxburgh et al. [14]. The software program Statistica, version 8.0 (StratSoft, Inc., Tulsa, OK, USA) was used in our statistical calculations.

## 3. Results

### 3.1. RAS polymorphisms and susceptibility to MS (case–control study)

Genotype and allele frequencies of ATG polymorphisms and ACE I/D polymorphism are shown in Tables 1 and 2. There were no deviations from Hardy–Weinberg equilibrium in any study group. We observed no significant differences in genotype or allelic distribution between groups of MS patients and control subjects either for ACE I/D polymorphism or for two ATG polymorphisms, when they had been tested separately.

A difference in double ATG genotype distribution was found in the case–control comparison. The relative risk of associated genotypes was calculated for all variants except those with null number of subject. The double homozygotes MMGG were found to be less frequent in the group of MS patients ( $P=0.03$ , odds ratio=0.57, CI 0.33–0.98, Table 4). However, using the Holm's test for multiple comparison, the results

**Table 2**  
Double genotype frequencies of ATG in MS patients and controls.

Genotype	Patients (%)	Controls (%)	<i>P</i> (Fisher's exact test)	Pcorr
Total	195	126		
MMGG	34 (0.174)	34 (0.270)	<b>0.029</b>	<b>NS (0.17)</b>
MMGA	4 (0.021)	2 (0.016)	0.560	NS
MMAA	0 (0)	0 (0)		
MTGG	1 (0.005)	1 (0.008)	0.632	NS
MTGA	97 (0.498)	51 (0.405)	0.065	NS
MTAA	1 (0.005)	0 (0)		
TTGG	0 (0)	0 (0)		
TTGA	3 (0.015)	2 (0.016)	0.651	NS
TTAA	55 (0.282)	36 (0.285)	0.521	NS

lacked the statistical significance (Pcorr=0.17). Both study ATG polymorphisms were in tight linkage with the same trend (T combined with A, M with G) in MS and control subjects.

### 3.2. RAS polymorphisms and disease progression rate (genotype–phenotype study)

We demonstrated significant association of M235T polymorphism with MSSS. The MM homozygotes had the lowest (3.8), the MT heterozygotes higher (5.2) and the TT homozygotes were characterized by the highest (5.4) mean MSSS values ( $P=0.02$ ). For polymorphisms (–6)A/G of ATG only a trend ( $P=0.06$ ) was indicated. The GG homozygotes carried lower MSSS values compared to the GA heterozygotes and the AA homozygotes. (Tables 3 and 4). Also when we tested relation between MSSS and double genotype polymorphism of ATG we found only a trend ( $P=0.07$ ) without statistical significance. The patients carrying genotype MMGG and MMGA had lower MSSS values (3.8, 3.4) than the others (Table 5). For ACE I/D polymorphism, no significant results were observed (Table 6).

## 4. Discussion

The first information about RAS dates back to the end of the 19th century, but the major components of "classical circulating" RAS and their function as the blood pressure and fluid balance regulators were identified in the early 1970s [5]. Recent observations related to tissue expression of mRNA for renin, angiotensinogen and ACE suggest that all components of RAS exist locally [5,18]. In some organs, they operate independently of the "circulating endocrine" RAS, e.g., in the adrenal glands and brain [5]. For that reason proteins of RAS as the proteins with participation in modulation of brain functions and in the inflammatory processes were studied in some other neurological and autoimmune diseases. Significant elevated ACE levels in CSF were found in neurosarcoidosis, CNS syphilis, viral encephalitis or Huntington's disease [19,20]. Its increased levels were also found in serum and CSF of MS patients. Changes in serum ACE activity correlated with changes in total plaque volume on MRI [21]. Quantitative RT-PCR

**Table 1**  
Genotype and allele frequencies of the study polymorphisms in MS patients and controls.

Polymorphism	Genotype	Patients (%)	Controls (%)	<i>P</i> <sub>g</sub>	Allele	Patients (%)	Controls (%)	<i>P</i> <sub>a</sub>
ACE I/D	Total	195	126			390	252	
	II	46 (23.6)	24 (19.1)	0.61	I	182 (46.7)	108 (42.9)	0.34
	ID	90 (46.2)	60 (47.6)		D	208 (53.3)	144 (57.1)	
	DD	59 (30.2)	42 (33.3)					
ATG M235T	MM	38 (19.5)	36 (28.6)	0.12	M	175 (44.9)	124 (49.2)	0.28
	MT	99 (50.8)	52 (41.3)		T	215 (55.1)	128 (50.8)	
	TT	58 (29.7)	38 (30.1)					
	GG	35 (17.9)	35 (27.8)	0.09	G	174 (44.6)	125 (49.6)	0.22
ATG (–6)A/G	GA	104 (96.4)	55 (43.6)		A	216 (55.4)	127 (50.4)	
	AA	56 (28.7)	36 (28.6)					

**Table 3**  
Genotypes and progression of disability by MSSS for ATG M235T.

Genotype	MSSS 195 patients	MSSS minimum	MSSS maximum	MSSS median	P
MM	38	0.937	9.092	3.808	0.02
MT	99	1.004	9.862	5.236	
TT	58	1.039	8.642	5.438	

**Table 4**  
Genotypes and progression of disability by MSSS for ATG (-6)A/T.

Genotype	MSSS 195 patients	MSSS minimum	MSSS maximum	MSSS median	P
GG	35	0.937	9.092	3.808	0.06
GA	104	1.004	9.862	5.297	
AA	56	1.039	8.555	5.089	

**Table 5**  
Genotype and progression of disability by MSSS for double genotype polymorphism of ATG.

Double genotype	MSSS 195 patients	MSSS minimum	MSSS maximum	MSSS median	P
MMGG	34	0.937	9.092	3.808	0.07
MMGA	4	1.029	6.002	3.341	
MTGG	1	5.762	5.762	5.762	
MTGA	97	1.004	9.862	5.236	
MTAA	1	5.236	5.236	5.236	
TTGA	3	6.821	8.642	7.271	
TTAA	55	1.039	8.555	4.942	

analyses showed an up-regulation of renin, ACE and AT1R in the inflamed spinal cord and immune system, including antigen presenting cells in the myelin-oligodendrocyte glycoprotein-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (MOG-EAE) [22]. Using proteomics approach, up-regulation of RAS components in the brain MS lesions was observed. AT1R was induced in myelin-specific CD4+ T cells and monocytes during autoimmune neuroinflammation [23].

In Lovrečić study ACE I/D polymorphism in MS was studied. They demonstrated that DD genotype and the presence of D allele, connected with high plasma and tissue ACE levels, increased risk for MS in the group of men [24].

Our results did not confirm those of Lovrečić study. We did not find statistically significant association between susceptibility to multiple sclerosis and ACE I/D polymorphism. Our group is the first which studied ATG polymorphisms relations to MS. We did not find statistically significant differences between patients and controls in the case control study. Double homozygotes GGTG and AAMM were missing in our study group. This corresponded with the previous studies where almost complete linkage disequilibrium between these two polymorphisms was found [9].

The second aim of our study was to associate genotypes with MSSS. M235T polymorphism of ATG represents the functional polymorphism where the T was connected with elevated expression

**Table 6**  
Genotype and progression of disability by MSSS for ACE I/D.

Genotype	MSSS 195 patients	MSSS minimum	MSSS maximum	MSSS median	P
II	46	1.039	9.549	5.866	0.45
ID	90	1.029	8.642	4.942	
DD	59	0.937	9.862	4.942	

and the highest final plasma level of ATG in healthy persons [9,25]. In our study homozygotes TT reached significantly higher MSSS values than homozygotes MM. Thus, the TT homozygotes were the patients with the faster disease progression.

For polymorphisms (-6)A/G of ATG the results were analogous. The patients carrying allele A, which is connected with higher final plasma level, reached higher MSSS values than homozygotes GG. But, the association was not statistically significant. The ACE I/D polymorphism did not significantly influence the MSSS values.

A negative aspect of our study can be the technology. Candidate gene association study with SNPs relies on the choice of suitable candidate genes. Small sample sizes increase the risk for false positive results. Also additional problems, such as population stratification and adjustment for multiple testing, are addressed for this approach [26]. In the last 3 years these problems have been widely discussed. Nevertheless, well-designed, population-based association studies are a powerful and effective tool to discover disease susceptibility alleles [27]. A positive aspect of our study is the examined sample. The Czech Republic is ranked among countries with high prevalence of MS, also with high genetical homogeneity of its population. The chosen sample tightly corresponds to the common stratification (gender, age, forms).

A pivotal role of RAS in the autoimmune inflammation of the central nervous system is considered today. Also possibilities of known pharmaceuticals used in internal medicine can be in the near future studied at MS. In animal model of MS treatment with renin inhibitor, angiotensin II converting-enzyme inhibitor and AT1R antagonist resulted in a significantly ameliorated course of EAE through the suppression of autoreactive Th1 and Th17 cells and through the promotion of Treg cells [28–30]. The results of genetic studies of RAS system can bring some new genetic biomarkers not serving only as predictors of disease susceptibility and progression rate but defining responders vs. nonresponders of therapy in the beginning of the disease. Such markers can substitute today's rather equivocal clinical and MR findings as predictors of therapeutical response.

We concluded that two frequent polymorphisms of AGT gene might be associated with multiple sclerosis progression rate evaluated by MSSS.

#### Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

#### Acknowledgement

The study was supported by the Czech Ministry of Education Research Plan No. MSM0021622404.

#### References

- [1] Minagar A, Toledo EG, Alexander JS, Kelley RE. Pathogenesis of brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *J Neuroimaging* 2004;14:55–105.
- [2] De Stefano N, Guidi I, Stromillo ML, Bartolozzi ML, Federico A. Imaging neuronal and axonal degeneration in multiple sclerosis. *Neuro Sci* 2003;24:5283–6.
- [3] Miller DH, Barkhof F, Berris I, Kappos L, Scotti G, Thompson AJ. Magnetic resonance imaging in monitoring the treatment of multiple sclerosis: concerted action guidelines. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1991;54:683–8.
- [4] Thorpe JW, Kidd D, Moseley IF, Kennell BE, Thompson AJ, MacManus DG, et al. Serial gadolinium-enhanced MRI of the brain and spinal cord in early relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 1996;46:373–8.
- [5] Fyhrquist F, Sajonmaa O. Renin-angiotensin system revisited. *J Intern Med* 2008;264:224–36.
- [6] Das UN. Is angiotensin-II an endogenous pro-inflammatory molecule? *Med Sci Monit* 2005;11:155–62.
- [7] Suzuki Y, Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Ruperez M, Esteban V, Egido J. Inflammation and angiotensin II. *Int J Biochem Cell Biol* 2003;35:881–900.
- [8] Brasler AR, Li J. Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription. *Hypertension* 1996;27:465–75.
- [9] Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, et al. A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription in vitro. *J Clin Invest* 1997;99:1786–97.



- [10] Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F. Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternate promoters correspond to evolutionary steps of a duplicated gene. *J Biol Chem* 1991;266:15377–83.
- [11] Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990;86:1343–6.
- [12] Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, et al. Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Hum Genet* 1992;51:197–205.
- [13] Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58:840–6.
- [14] Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S, et al. Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity. *Neurology* 2005;64:1144–51.
- [15] Russ AP, Maerz W, Ruzicka V, Stein U, Gross W. Rapid detection of the hypertension-associated Met235→Thr allele of the human angiotensinogen gene. *Hum Mol Genet* 1993;2:609–10.
- [16] Hegeler RA, Harris SB, Hanley AJ, Sun F, Connelly PW, Zinman B. -6A promoter variant of angiotensinogen and blood pressure variation in Canadian Ojibwe. *J Hum Genet* 1998;43:37–41.
- [17] Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucleic Acids Res* 1992;20:1433.
- [18] Igić R, Behnia R. Properties and distribution of angiotensin I converting enzyme. *Curr Pharm Des* 2003;9:697–705.
- [19] Schweisfurth H, Schöberg-Schiegnitz S, Kuhn W, Parusel B. Angiotensin I converting enzyme in cerebrospinal fluid of patients with neurological diseases. *Klin Wochenschr* 1987;65:955–8.
- [20] Tian J, Shi J, Bailey K, Harris JM, Pritchard A, Lambert JC, et al. A polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene is associated with damage to cerebral cortical white matter in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 2004;354:103–6.
- [21] Constantinescu CS, Goodman DB, Grossman RI, Mannon LJ, Cohen JA. Serum angiotensin-converting enzyme in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 1997;54:1012–5.
- [22] Stegbauer J, Lee DH, Seubert S, Ellrichmann G, Manzel A, Kvakian H, et al. Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;19:14942–7.
- [23] Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV, et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;19:14948–53.
- [24] Lovrečić L, Ristić S, Starčević-Čizmarović N, Jazbec SS, Sepčić J, Kapović M, et al. Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism and risk of multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2006;114:374–7.
- [25] Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel JM, et al. Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations. *Am J Hum Genet* 2002;70:108–23.
- [26] Hoffman S, Akkad DA. The genetics of multiple sclerosis: an update 2010. *Mol Cell Probes* 2010;24:237–43.
- [27] Risch N. Searching for genetic determinants in the new millennium. *Nature* 2000;405:847–56.
- [28] Stegbauer J, Lee DH, Seubert S, Ellrichmann G, Manzel A, Kvakian H, et al. Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;19:14942–7.
- [29] Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV, et al. Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;19:14948–53.
- [30] Constantinescu CS, Ventura E, Hilliard B, Rostami A. Effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor captopril on experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1995;17:471–91.

**Benešová Y, Vašků A, Štourač P, Hladíková M, Okáčová I, Bednařík J.**

Association of IL7RA rs6897932 gene polymorphism with multiple sclerosis. European Journal of Neurology 2014; 21: (Suppl. 1), 686. **IF: 4.055**

## **Resumé**

Roztroušená skleróza je multifaktoriální onemocnění, v jehož etiopatogenezi se významně podílí genetické faktory. Na spuštění autoimunitního procesu se pravděpodobně podílí velké množství tzv. malých genů a jejich kombinace, které podmiňují velkou interindividuální variabilitu choroby. Primární roli hraje pravděpodobně geneticky determinovaná imunitní odpověď. V rozsáhlých, tzv. genome-wide asociačních studiích (GWAS), provedených v evropské populaci bylo prokázáno, že MHC na chromozomu 6p21 reprezentuje nejvýznamnější lokus vnímavosti k RS. Geny mimo oblast HLA se také podílí na rozvoji a progresi onemocnění. Mezi kandidátní geny řadíme geny kódující cytokiny, chemokiny, kostimulační či signální molekuly. Avšak každý z nich přispívá pouze mírně k celkové genetické predispozici choroby. Gen pro IL7RA kóduje povrchový znak CD 127 receptoru IL-7. Významnou měrou se podílí v patogenezi onemocnění a progresi zánětlivého procesu v RS plakách. IL7RA ovlivňuje regulaci a vývoj lymfocytů, podporuje proliferaci, diferenciaci a přežívání T a B buněk. Genetický polymorfismus rs6897932 lokalizovaný v exonu IL7RA genu je funkční variantou tohoto genu ( $p=2.94 \times 10^{-7}$ ). V souboru 305 pacientů s roztroušenou sklerózou definovanou dle Mc Donaldových kritérií a 136 zdravých jedinců byla provedena genotypizace rs6897932 C/T genetického polymorphismu v genu pro IL7RA. Byl studován jeho vliv na vnímavost k rozvoji roztroušené sklerózy, tíži postižení a rozdíly mezi pohlavími v české populaci. Nebyla prokázána asociace mezi skupinou nemocných a zdravých jedinců ve vyšetřeném polymorfismu. Pouze homozygoti CC a heterozygoti CT se vyskytovali častěji ve skupině RS pacientů ( $p=0.02$ ) ve srovnání s kontrolami. Po rozdělení souboru podle pohlaví byl zjištěn signifikantní rozdíl ve frekvenci alel ( $P_a=0.04$ ) mezi skupinou zdravých a nemocných mužů. Výsledky této studie prokázaly, že polymorfismus rs6897932 C/T není rizikovým faktorem vnímavosti k RS v české populaci. Distribuce polymorfismu rs6897932 C/T by se však mohla podílet na genetické vnímavosti k rozvoji RS u mužů v české populaci.





# ASSOCIATION OF IL7RA rs6897932 GENE POLYMORPHISM WITH MULTIPLE SCLEROSIS



Benešová Y.<sup>1</sup>, Vašků A.<sup>2</sup>, Štourač P.<sup>1</sup>, Hladíková M.<sup>1</sup>, Okáčová I.<sup>1</sup>, Bednařík J.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Neurology, University Hospital Brno and Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic  
<sup>2</sup> Institute of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** Multiple sclerosis (MS) is a multifactorial disease with complex genetic basis. The whole genome-wide association studies (GWAS) indicate that the major histocompatibility complex on chromosome 6p21 represents the strongest MS susceptibility locus. Several additional genetic risk loci for MS, including the interleukin 7 receptor gene (IL7RA) and the interleukin 2 receptor gene (IL2RA) have been identified by recent GWAS and replication studies. However each of them contributes very modestly to the overall genetic risk for disease.

**OBJECTIVE:** The rs6897932 C/T polymorphism in IL7RA gene and its impact on MS susceptibility, disability and gender differences in the Czech population was investigated.

**METHODS:** The study group consisted of 305 MS patients, fulfilling McDonald's criteria, with a mean age of 38 ± 10.5 years (mean ± S.D.).

The control group consisted of 136 healthy controls, with a mean age of 37 ± 11.6 years (mean ± S.D.). Genotyping in IL7RA gene was performed using polymerase chain reaction methods and restriction analysis.

**RESULTS:** We demonstrated a significant difference in allele frequency (P=0.04) between male patients and male controls. No significant differences between MS patients and controls in genotype distribution (P=0.07) and allele frequency (P=0.236) were observed. Only the homozygotes CC and CT were more frequent in MS group (p=0.02) compared to controls. Similarly, no differences between MS female patients and female controls was found.

**CONCLUSION:** Our results appear to indicate that the distribution of the IL7RA rs6897932 C/T gene polymorphism investigated is not a risk factor for MS susceptibility in the Czech population.

**Keywords:** Gene; IL7RA; Multiple sclerosis; Polymorphism

## METHODS

### 1. Subjects

The investigation was designed as a case-control study. A total of 441 unrelated Caucasian subjects were enrolled. The study group consisted of 305 patients fulfilling the McDonald criteria for MS (17), with a mean age of 38 ± 10.5 years (mean ± S.D.), 220 females, and 85 males with MS. The control group consisted of 136 healthy volunteers, with a mean age of 37 ± 11.6 years (mean ± S.D.), 87 females, and 49 males. Mean duration of the disease was 7.2 ± 6.2 (mean ± S.D.). Clinical status was evaluated with the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and the disease severity was calculated using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS).

All patients and controls were recruited from the Department of Neurology of the University Hospital, Brno and were examined in a specialised MS centre by the same specialist neurologist (Y. B.). The study was approved by the Ethics Committee of the University Hospital, Brno, and all persons gave their informed consent prior to enrolment in the study.

### 2. IL7RA genotyping

Genomic deoxyribonucleic acid (DNA) was extracted from white blood cells by standard techniques using genomic DNA extraction kit. Genotyping in IL7RA gene was performed by means of polymerase chain reaction (PCR) and restriction analysis. DNA was isolated from 5 ml of EDTA-anticoagulated blood from leucocytes by the standard extraction method. Detection of rs6897932 gene polymorphism was performed by PCR with sequence-specific primers (PCR-SSP).

### 3. Statistical analysis

Statistical analysis - Differences in genotype distribution and consistency by Hardy-Weinberg equilibrium were tested by the chi-square test. Differences in allele frequencies of SNPs were tested by a two-tail Fisher exact test. The Kruskal-Wallis ANOVA test was used for comparison of genotypes with disability as expressed by EDSS and MSSS. Statistical analysis was performed using the STATISTICA software package (StatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA), version 10.

For detection of rs6897932 polymorphism in IL7RA gene we used primers: F 5' -GGG AGA TGG ATC TCT TAC TGA - (East Port Praha s.r.o.) R 5' -TGT GGA AAT TGG CTG AGG AT - (East Port Praha s.r.o.)

## BACKGROUND

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune disease of the central nervous system (CNS) leading to demyelination, axonal damage, and progressive neurological disability (1). Both genetic and environmental factors contribute to susceptibility to the disease. The whole genome-wide association studies (GWAS) indicates that the human leukocyte antigen (HLA) class II region is the strongest MS susceptibility locus in northern Europeans. In particular, the HLA-DQB1\*0101- HLA-DRB1\*1501- HLA-DQA1\*0102- HLA-DQB1\*0602 haplotype and its individual alleles have been linked to MS. This haplotype confers a relative risk of approximately 3 and homozygosity for this haplotype increases the risk more than six-fold (2).

In a collaborative GWAS that analysed data from 9,772 cases and 17,376 controls of European descent, a total of 465,434 autosomal

single polymorphisms (SNPs) appeared. It emerged that HLA-DRB1\*1501 has the strongest association with MS, with a consistent influence within the cohort (p=1x10<sup>-35</sup>, OR = 3.1) (3). There were established next 110 MS risk variants at 103 discrete loci outside of the HLA in 80.09% individuals of European ancestry (P < 5.0 × 10<sup>-8</sup>) (4). There were proved many of genes coding for cytokine pathway (CXCR5, IL2RA, IL7R, IL7, IL12RB1, IL22RA2, IL12A, IL12B, IRF8, TNFRSF1A, TNFRSF14, TNFSF14), costimulatory and signal transduction molecules of immunological relevance, but also relates to environmental risk factors such as Vitamin D and therapies for MS including Natalizumab and Daclizumab. There is a relative absence of genes relevant to potential pathways for neurodegeneration independent of inflammation (4).

## RESULTS

The basic characteristics of the study group are summarised in Table 1.

### 1. Case-control genetic association study

Genotype and allele frequency of IL7RA rs6897932 gene polymorphism in MS patients and controls are shown in Table 2. The genotype distribution of polymorphisms did not deviate from the Hardy-Weinberg equilibrium in any group.

No statistically significant differences between MS patients and controls in genotype distribution (P=0.07) and allele frequency (P=0.236) were observed. Only the homozygotes CC and heterozygotes CT were more frequent in MS group (p=0.02; OR=2.58) compared to controls.

### 2. Genotype-phenotype study

#### 2.1. Genotypes and gender difference

Genotype and allele frequency of IL7RA rs6897932 gene polymorphism in female patients and female controls and in male patients and male controls are shown in Table 2.

A significant difference was disclosed between MS male patients and male controls in allele frequency (P=0.04; OR=1.16). The homozygotes CC and the heterozygotes CT were more frequent in MS patients (OR=2.30).

No statistically significant differences between female MS patients and female controls were observed in IL7RA rs6897932 gene polymorphism (P=0.08, Pa=0.98).

#### 2.2. Genotypes and disability

The mean EDSS score in the whole MS group was 3.4 ± 1.7 (mean ± S.D.). No significant associations of genotypes with disability as expressed by EDSS were identified. Similarly, no associations of genotypes with severity in terms of MSSS score, Roxburgh et al., were observed. The MSSS score for the whole MS group was calculated as 5.5 ± 2.3 (mean ± S.D.).

Table 1 Demographic data

Group	n	Mean age x (SD)	EDSS x (SD)	MSSS x (SD)	Male/Female
MS	305	38 (10.5)	3.4 (1.7)	5.5 (2.3)	85/220
RRMS	235	35 (8.9)	2.7 (1.2)	4.8 (2.2)	65/170
SPMS	43	44 (10.1)	5.6 (1.2)	7.1 (1.8)	11/32
PPMS	27	48 (10.1)	6.1 (1.3)	7.8 (1.6)	9/18
Control	136	37 (11.6)	-	-	69/87

MS multiple sclerosis; RRMS relapsing remitting multiple sclerosis; SPMS secondary progressive multiple sclerosis; PPMS primary progressive multiple sclerosis; EDSS Expanded Disability Status Scale; MSSS Multiple Sclerosis Severity Score.

Table 2 Comparisons of genotype and allele frequency in rs6897932 gene polymorphism between MS and the control groups, female MS and female controls, and male MS and male controls.

Polymorphism	Genotype		Genotype		Allele		Pa
	CC (%)	CT (%)	CC (%)	CT (%)	C (%)	T (%)	
rs6897932							0.24
MS (N=305)	177/305 (58)	117/305 (38.4)	11/205 (3.6)	11/205 (3.6)	471/610 (77.2)	139/610 (22.8)	
Control (N=136)	76/136 (55.9)	48/136 (35.3)	12/136 (8.8)	12/136 (8.8)	203/272 (73.5)	72/272 (26.5)	
rs6897932							0.08
MS female (N=220)	123/220 (55.9)	90/220 (40.9)	7/220 (3.2)	7/220 (3.2)	336/440 (76.4)	104/440 (23.6)	0.98
Control female (N=87)	53/87 (61)	27/87 (31)	7/87 (8)	7/87 (8)	133/174 (76.4)	41/174 (23.6)	
rs6897932							0.14
MS male (N=85)	56/85 (65.9)	27/85 (31.8)	4/85 (4.7)	4/85 (4.7)	135/170 (79.4)	35/170 (20.6)	0.04
Control male (N=49)	23/49 (46.9)	21/49 (42.9)	5/49 (10.2)	5/49 (10.2)	67/98 (68.4)	31/98 (31.6)	

Pg probability of differences in genotype distribution; Pa probability of differences in allele frequency; MS multiple sclerosis group; N control group number.

## References

- Hartung HP et al. What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS? J. Neurol. 2014; 251: 12-29.
- Sobronick AD. Genetic background of multiple sclerosis. Autoimmun. Rev. 2012; 11: 163-66.
- MGSC, WTCCC2, Seaton S et al. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. Nature 2011; 476: 214-19.
- MGSC, WTCCC2, IBDOG. Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis. Nat Genet. 2013; 45: 1353-60.
- MGSC, Huffer DA et al. 2007. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genome-wide study. N. Engl. J. Med. 2007; 357: 851-62.
- Gregory SD et al. MGSC. Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis. Nat Genet. 2007; 39: 1083-91.
- Jäger J et al. IL7RA haplotype-associated alterations in cellular immune function and gene expression patterns in multiple sclerosis. Genes Immun. 2013; 14: 453-61.
- Zuvich RL et al. Genetic variation in the IL7RA/IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility. Hum Genet. 2010; 127: 525-35.

## 4. Závěry

### 4.1 Genetické studie

- a) Byla nalezena signifikantní asociace polymorfismu rs3135388 v genu pro HLA-DRB1\*1501 se zvýšeným rizikem rozvoje RS v celé skupině a u žen.
- b) Byla nalezena signifikantní asociace polymorfismu -1562 C/T v genu pro MMP-9 s vyšším rizikem rozvoje RS v celé skupině a u žen.
- c) Byla nalezena asociace polymorfismu-1575G/A v genu pro MMP-2 s vyšším rizikem rozvoje RS.
- d) Byla nalezena asociace v distribuci TIMP-2 +853G/A genetického polymorfismu s vyšším rizikem rozvoje RR RS.
- e) Byla nalezena asociace polymorfismu rs6897932 v genu pro IL7RA s vyšším rizikem rozvoje RS u mužů.
- f) Byla nalezena asociace polymorfismů rs4516035, rs731236, rs7975232, rs1544410 v genu pro receptor vitamínu D s vyšším rizikem rozvoje RS u mužů.
- g) Byla nalezena asociace polymorfismu rs7975232 v genu pro receptor vitamínu D s vyšším rizikem rozvoje RS u žen.
- h) Byla nalezena asociace polymorfismu rs4516035 v genu pro receptor vitamínu D s vyšším rizikem rozvoje primární progresivní RS u žen.
- i) Naše studie prokázala, že polymorfismus M235T v genu pro ATG může ovlivnit tíži postižení.
- j) Nebyla nalezena korelace vyšetřených polymorfismů v genu pro MMP-9 a v genu pro MMP-2 s hladinami enzymů v séru.
- k) Nebyla nalezena vzájemná interakce mezi genetickými polymorfismy rs3135388 a rs4516035

### 4.2 Studie hladin metalloproteináz a jejich inhibitorů

- a) Bylo prokázáno statisticky signifikantní zvýšení MMP-9, MMP-9/TIMP-1 u RS, zejména relabující formy onemocnění. Odráží stupeň zánětlivého postižení a porušení HEB.
- b) Bylo prokázáno statisticky signifikantní zvýšení MMP-2, MMP-2/TIMP-2 u progresivní formy onemocnění. Je známkou větší destrukce nervové tkáně v chronických lézích.
- c) Byla nalezena korelace MMP-2, MMP2/TIMP2 s tíží onemocnění a stupněm postižení.

## 5 Diskuse

Naše výsledky prokazují, že distribuce vyšetřeného genetického polymorfismu (rs3135388) v genu pro HLA-DRB1\*1501 je významným rizikovým faktorem vnímavosti k rozvoji RS ( $P_g=3.06 \times 10^{-9}$ ) v české populaci. Nosiči alely A se vyskytovali frekventněji ve skupině nemocných s RS (OR= 3.69) ve srovnání s kontrolním souborem. Naše studie potvrdila předchozí závěry srbské studie, ve které bylo zjištěno, že nosiči alely A rs3135388 genetického polymorfismu se častěji vyskytují ve skupině RS pacientů (OR = 4.37) (Živković et al., 2009). Také Matiello v americké populaci, našel v case-kontrolní studii asociaci alely A rs3135388 genetického polymorfismu s RS (OR=3.93) (Matiello et al., 2010). Obdobně ve studii GWAS byla také nalezena genetická asociace mezi alelou A a vnímavostí k RS (OR=1.99) (Hafler et al., 2007).

Nejednoznačné nálezy ve vztahu k haplotypu DR15 však byly získány po rozdělení podle pohlaví. Některé studie neprokázaly rozdíl (Ballerini et al., 2004; Fernández et al., 2004), jiné potvrdily vazbu na ženské pohlaví (Hensiek et al., 2002; Luomala et al., 2001; Weatherby et al., 2001) a v jedné studii byla naopak popsána mírně vyšší prevalence u mužů (McDonnell et al., 1999). Ve studovaném genetickém polymorfismu rs3135388 jsme jako jediní prokázali signifikantní rozdíl mezi nemocnými a zdravými ženami ( $P_g=1.3 \times 10^{-8}$ ). Frekvence alely A u nemocných žen činila 30.9% ve srovnání s 8% u kontrol; OR pro GA heterozygoty a AA homozygoty činilo 5.92. Prokázali jsme, že přítomnost alely A polymorfismu rs3135388 je asociována s vyšší vnímavostí k RS u žen v české populaci.

Asociace nemoci s alelou A podporuje hypotézu, že zvýšená vnímavost k RS je podmíněna aktivací autoagresivních imunitních buněk, které zvyšují zánětlivou aktivitu choroby. Bylo prokázáno, že rs3135388 polymorfismus je funkční a alela A koreluje se zvýšenou expresí DRB1, DRB5 a DQB1 genů v bělošské populaci a to 15.7-; 5.2-; resp. 8,3-krát u homozygotních nosičů AA rs3135388 genetického polymorfismu ve srovnání s homozygoty GG (Alcina et al., 2012). Zvýšená exprese molekul II třídy, schopných navázat se na peptidové antigeny myelinu vede k následné stimulaci autoagresivních T-lymfocytů a aktivaci onemocnění (Gourraud et al., 2012).

Později provedené studie v různých populacích také potvrdily asociaci rs3135388 genetického polymorfismu s vnímavostí k RS. Asociaci s RS prokázal v USA Hebring et al. ve výzkumném projektu "Personalized Medicine Research Project" na klinice v Marshfieldu (Hebring et al., 2013), další fenotypová studie provedená v USA, do které bylo zařazeno 6005

jedinců, prokázala také asociaci mezi RS a rs3135388 genetickým polymorfismem (OR= 2.56  $P= 1.4 \times 10^{-7}$ ) (Carroll et al., 2014). Ve španělské studii byla doložena asociace v souboru 300 nemocných (García-Martín et al., 2013), obdobně též ve slovenské populaci (Ďurmanová et al., 2015) a v ruské studii pak byla zjištěna asociace s benigním průběhem onemocnění (Korobko et al., 2013). V Německu Akkad et al. v rozsáhlé asociační studii v souboru 1033 nemocných a 633 zdravých kontrol, ve které bylo testováno 58 kandidátních genetických polymorfismů, prokázal asociaci s 21 genetickými polymorfismy. Nejvíce signifikantní asociace byla opět zjištěna pro genetický polymorfismus rs3135388 (OR= of 2.41  $P= 2.4 \times 10^{-22}$ ) (Akkad et al., 2015, Akkad et al., 2016).

Vyšetření tohoto genetického polymorfismu by mohlo být potenciálně využito jako biomarkeru v klinické praxi vzhledem k jeho vysokému stupni korelace s alelou HLA DRB1\*1501 a rizikem rozvoje onemocnění a navíc nízkými náklady spojenými s jeho stanovením.

V prezentované asociační studii byl dále testován vztah genetických polymorfismů lokalizovaných v kandidátních genech pro MMP-9, MMP-2 a TIMP-2 s rizikem rozvoje RS. Prokázali jsme signifikantní snížení frekvence T alely polymorfismu -1562 C/T v genu pro MMP-9 ve skupině RS pacientů; po rozdělení skupiny nemocných podle pohlaví jsme též našli signifikantní rozdíl mezi nemocnými a zdravými ženami. Bylo prokázáno, že nosiči -1562 T alely jsou méně frekventní u nemocných žen. V srbské studii byla zjištěna také tendence ke snížené frekvenci nosičů alely T v polymorfismu -1562 C/T genu pro MMP-9 (Živkovič et al., 2007) u pacientů s RS. Výsledky několika dalších asociačních studií, zabývajících se vztahem genetických polymorfismů lokalizovaných v genu pro MMP-9 s rizikem rozvoje RS (Fiotti et al., 2004; Nelissen et al., 2000; Nelissen et al., 2002) jsou však rozdílné. Ve švédské case-control studii a ve studii na Sardinii nebyla asociace mezi genetickým polymorfismem -1562 C/T gelatinázy B a rizikem rozvoje RS potvrzena (Nelissen et al., 2000). Bylo však zjištěno, že polymorfismus mikrosatelitu promotorové oblasti genu pro MMP-9 hraje roli ve vnímavosti k RS v italské populaci (Fiotti et al., 2004). Pozdější studie, které byly provedeny v Itálii, Polsku i Španělsku však naše nálezy potvrzují, navíc byla prokázána asociace s tíží postižení a klinickým průběhem choroby (La Russa et al., 2010; Fernandes et al., 2009; Mirowska-Guzel et al., 2009).

Jako první jsme se zabývali asociačním vztahem genetického polymorfismu MMP-2 -1575G/A s rizikem rozvoje RS. Vycházeli jsme z poznatků, že alela -1575G je funkční a zvyšuje MMP-2 promotorovou aktivitu (Xu et al., 2007). Řada studií potvrzuje asociaci MMP-2 genetických polymorfismů s rizikem rozvoje nebo tíží jiných, zejména nádorových a

autoimunitních onemocnění. Byla popsána např. asociace -1575 G/G genotypu se významně zvýšeným rizikem invazivního kolorektálního karcinomu (Xu et al., 2007). Naše výsledky prokázaly frekventnější zastoupení homozygotů GG a heterozygotů GA v MMP-2 -1575G/A genetickém polymorfismu ve skupině RS pacientů. Druhá studie, která byla následně provedena, prokázala asociaci MMP-2 -1575G/A s dřívějším počátkem RS (Gašparovič et al., 2015). Nosičství alel -1575 G by mohlo vést ke zvýšení produkce MMP-2 a ovlivnění etiopatogenetického procesu.

Dosud nebyla provedena žádná studie, zabývající se genetickými polymorfismy TIMP-2 ve vztahu k RS. V našem souboru jsme po jeho rozdělení na skupiny podle průběhu onemocnění prokázali hraniční asociaci TIMP-2 +853G/A genetického polymorfismu s vyšším rizikem rozvoje RR RS. Homozygoti GG a heterozygoti GA se vyskytovali frekventněji ve skupině RR RS pacientů ve srovnání s kontrolním souborem. Alela +853G/A se pravděpodobně podílí na ovlivnění aktivity TIMP-2. Ačkoli substitucí +853 G/A nukleotidu nedochází ke změně aminové kyseliny, je pravděpodobné snížení aktivity TIMP-2 sekundárním ovlivněním struktury mRNA, které vede k inhibici míry translace a/nebo snížení stability mRNA (Hirano et al., 2001). Byla zjištěna také zvýšená frekvence alely G u pacientů s aneuryzmaty břišní aorty (Wang et al., 1999) či těžkou chronickou obstrukční chorobou bronchopulmonální (Hirano et al., 2001) ve srovnání s kontrolami. TIMP-2 inhibuje specificky MMP-2, která se významně podílí na porušení HEB, remodelaci extracelulární matrix, poškození neuronů, axonů a reparaci tkání (Newman et al., 2001). Při nedostatečné inhibici dochází ke zvýšené aktivitě MMP-2, což může vést k progresi onemocnění.

Naše nálezy neprokazují asociaci vyšetřených genotypů MMP-2 a TIMP-2 s tíží onemocnění nebo stupněm postižení vyjádřené EDSS a MSSS skóre. Jedná se však o první asociační studii uvedeného polymorfismu v genu pro TIMP-2, v genu pro MMP-2 byla provedena pouze jedna klinická asociační studie u nemocných s RS. Vzhledem k významu MMP-2 a TIMP-2 v patofyziologii RS je potřeba provést další nezávislé studie ve větším souboru pacientů a ověřit získané výsledky.

Dále jsme studovali genetický polymorfismus rs6897932, který je lokalizován v exonu 6 v genu pro IL7RA. IL7RA hraje důležitou roli ve vývoji lymfocytů, podporuje proliferaci, diferenciaci, maturaci, přežívání a homeostázu T a B-lymfocytů (Gregory et al., 2007). Na rozdíl od některých předchozích prací jsme v naší studii nepotvrdili významnou asociaci tohoto genetického polymorfismu s chorobou, nenalezli jsme ani asociaci s průběhem onemocnění (Gregory et al., 2007; Hafler et al., 2007; Weber et al., 2008). Ve slovenské

studii, která byla provedena později, byla asociace s progresivním průběhem nemoci zjištěna (Čierny et al., 2015), v další studii pak asociace s PP RS (Teusch et al., 2003). V našem souboru byla nalezena hraniční asociace polymorfismu rs6897932 v genu pro IL7RA s vyšším rizikem rozvoje RS u mužů. Alela C se vyskytovala frekventněji ve skupině nemocných mužů ve srovnání se zdravými kontrolami ( $p=0.04$ ). Bylo prokázáno, že polymorfismus rs6897932 je funkční variantou tohoto genu ( $p=2.94 \times 10^{-7}$ ) (Gregory et al., 2007). Nosičství alely C může ovlivnit chorobu aktivací exprese exonu 6 a zvýšením solubilního IL7RA proteinu (sIL-7RA). Jäger et al. v německé populaci prokázal, že hladiny sIL-7RA a mRNA kolísají u čtyř obecných IL7RA haplotypů (rs1494555, rs6897932, rs987107 a rs987106). Bylo zjištěno, že hladina sIL-7RA je u protektivního haplotypu až třikrát nižší ve srovnání s ostatními. Genetické varianty IL7RA vedou tedy k haplotypově specifické odpovědi na různé imunologické stimuly, které ovlivní vnímavost k RS (Jäger et al., 2013); také variabilita genů funkčně spjatých s IL7RA, např. TYK2 může také ovlivnit RS proces (Zuvich et al., 2010). Alela C rs6897932 polymorfismu se může uplatnit až u 30 % případů RS (Gregory et al., 2007).

Dále jsme se zaměřili na úlohu vitamínu D v imunopatogenezi RS. Vyšetřili jsme polymorfismy rs4516035, rs2228570, rs731236, rs7975232, rs1544410 v genu pro VDR a hodnotili jsme vliv na vnímavost k rozvoji RS, tíži postižení, průběh onemocnění a rozdíly mezi pohlavími v české populaci. V souvislosti s rizikem rozvoje RS byly dosud studovány zejména polymorfizmy TaqI, BsmI, FokI a ApaI vitamínu D. Výsledky jednotlivých studií jsou však kontroverzní. Některé asociaci s RS prokazují (Agliardi et al., 2011; Ben-Selma et al., 2015; Narooie-Nejad et al., 2015), jiné nikoli (García-Martín E et al., 2013; Huang et al., 2012; Tizaoui et al., 2015). V naší studii jsme po rozdělení souboru podle pohlaví prokázali asociaci s RS u polymorfismů EcoRV, TaqI, BsmI, and ApaI mezi skupinou zdravých a nemocných mužů (EcoRV,  $p_a = 0,02$ ; Taq,  $p_g = 0,02$ ,  $p_a = 0,02$ ; BsmI,  $p_g = 0,02$ ,  $p_a = 0,04$ ; ApaI,  $p_g = 0,008$ ,  $p_a = 0,005$ ). U žen byl prokázán významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypů ApaI u skupiny zdravých žen oproti kontrolám ( $p_g = 0,01$ ,  $p_a = 0,05$ ). V žádné studii však dosud nebyla zkoumána asociace polymorfizmu rs4516035 v genu pro VDR s RS, na který jsme se v naší práci zaměřili. Tento polymorfizmus se nachází v promotoru na pozici 1A-1012 v blízkosti polymorfizmu rs7139166, se kterým je v těsné vazbě- LD ( $D' = 0.968$ ;  $R^2 = 0.942$ ) (d'Alesio et al., 2005). V multicentrické studii, zahrnující téměř 3000 nemocných a 2500 kontrol, ve které bylo vyšetřeno 38 polymorfizmů, byla prokázána asociace alely C (G) rs4516035 (OR 1.25; 95%CI, 1.01-1.55) s rizikem rozvoje melanomu (Orlow et al.,

2012). Barrosos et al. dokumentoval asociaci s agresivnějším typem tumoru, lokalizovaným na hlavě, krku a trupu ve španělské populaci (Barrosos et al., 2008).

V naší práci jsme jako první prokázali signifikantně vyšší frekvenci alely C genetického polymorfismu rs4516035 u nemocných mužů oproti kontrolám (OR 1.8; 95% CI: 1.08- 2.24), podílí se na zvýšené vnímavosti k rozvoji RS u mužů. U žen genotyp CT zvyšuje riziko primární progresivní roztroušené sklerózy 5,5krát (CT vs. CC + TT  $p_{\text{corr}} = 0,01$ , senzitivita 0,833, specifická 0,525, síla testu 0,823).

Studie in vitro prokazují, že polymorfizmy rs4516035 a rs7139166 jsou funkční a záměna báze na pozici 1A-1012 či 1A-1521 vedla k výraznému ovlivnění exprese mRNA. U nosiče haplotypu rs4516035-G (C)/rs7139166-C došlo téměř k dvojnásobnému snížení promotorové aktivity VDR ve srovnání s haplotypem rs4516035-A (T)/rs7139166-G (Fang et al., 2005). Snížení exprese VDR může tedy následně nepříznivě ovlivnit antiproliferativní, prodiferenční a imunomodulační účinky vitamínu D3 a vést ke klinické manifestaci onemocnění. Úloha tohoto genetického polymorfismu v etiopatogenezi onemocnění musí být ještě ověřena v dalších klinických studiích. Vzájemnou interakci mezi genetickými polymorfismy rs4516035 a rs3135388 jsme v naší studii nenalezli.

V neposlední řadě jsme se také zabývali úlohou RAS u RS. Genetickým aspektem dané problematiky se před námi zabývala pouze jedna studie. Autoři vycházeli z práce Nakajima et al., ve které byly nalezeny zvýšené sérové hladiny angiotenzin-konvertujícího enzymu (ACE) u RS pacientů, kdy aktivita ACE korelovala s celkovým objemem plak na MR (Nakajima et al., 2002). Byl prokázán zvýšený výskyt alely D a genotypu DD pro ACE I/D polymorfismu u mužských pacientů s RS, jež je spojen s vyššími hladinami ACE (Lovrecić et al., 2006). Naše práce jako první zkoumala vztah mezi polymorfismy M235T a (-6) A/G v genu pro ATG a vnímavostí k RS. Neproklázali jsme, že by zkoumané polymorfismy byly asociovány s vnímavostí k RS. Nalezli jsme však signifikantní korelaci mezi genetickým polymorfismem M235T a tíží postižení. Homozygoti MM měli nejlehčí (3.8), homozygoti TT pak nejtěžší (5.4) stupeň postižení vyjádřený pomocí MSSS ( $p=0.02$ ). Polymorfizmus M235T může ovlivnit tíži postižení pravděpodobně aktivací zánětlivého procesu. V průběhu zánětu dochází působením interleukinu-1 a TNF alfa, které jsou produkovány makrofágy, k aktivaci transkripce ATG. Tyto cytokiny ovlivňují vazbu dvou skupin transkripčních faktorů, které se vážou na jedno regulační místo ATG promotoru (Yanai et al., 1997). Aktivace RAS má za následek pozitivní zpětnou vazbu a následnou stimulaci ATG syntézy (Brasier et al. 1996). Nabízí se ještě další otázka, zda k aktivaci RAS nedochází pouze sekundárně za již



změněných podmínek chronického zánětu a zkoumané polymorfismy nejsou asociovány s vnímavostí k dané chorobě, ale ovlivňují pouze míru postižení a průběh RS.

V srbské studii byla následně prokázána zvýšená frekvence genotypu AA v genu pro angiotenzinový receptor AT2 u nemocných žen ve srovnání se zdravými ženami. Tento genotyp může tedy být jedním z pohlavně vázaných predisponujících faktorů vnímavosti k RS (Živkovič et al., 2016).

V druhé části práce jsme se věnovali problematice stanovení hladin MMPs. Prokázali jsme změny profilu sérových hladin MMP-9, MMP-2 a jejich inhibitorů u nemocných s RS. MMPs napomáhají nejen objasnit patogenezu onemocnění, jsou také slibnými biomarkery k posouzení aktivity, průběhu onemocnění a umožňují monitoraci léčby. V současné době jsou řazeny spolu s IL12, IL 23, TNF, IL 17, alelami HLA II třídy, chemokiny, osteopontinem a dalšími mezi tzv. validované biomarkery (Comabella et al., 2014). Prokázali jsme zvýšenou hladinu MMP-9 v séru a zvýšení poměru MMP-9/TIMP-1 ve skupině pacientů s RS a u skupiny nemocných s RR RS a SP RS při srovnání s kontrolní skupinou. Potvrdili jsme nálezy, že MMP-9 je zvýšeně exprimovaná u RS a RR RS (Abraham et al., 2005; Avolio et al., 2003; Goodin et al., 2002; Lindberg et al., 2001; Waubant et al., 2003). Naše výsledky korelují s předchozími nálezy, které prokazují asociaci mezi zvýšenou hladinou MMP-9 mRNA v periferních mononukleárech, zvýšenou hladinou MMP-9 v séru, mozkomíšním moku s klinickou a pomocí MR zjištěnou aktivitou nemoci (Lee et al., 1999; Leppert et al., 1998; Liuzzi et al., 2002). Další nálezy prokazují také zvýšenou transkripci MMP-7 a MMP-9 ve všech lézích s výjimkou chronických, inaktivních lézí (Lindberg et al., 2001).

V naší práci jsme navíc mezi prvními prokázali zvýšenou hladinu MMP-2 v séru a MMP-2/TIMP-2 ratio zejména ve skupině PPMS, což je v souladu s výsledky předchozí studie (Avolio et al., 2003). Na základě nálezů řady experimentálních studií in vitro bylo zjištěno, že MMP-2 mRNA je produkována celým spektrem buněk (Chander et al., 1995); nejen T-lymfocyty (Abraham et al., 2005), monocyty, B-lymfocyty (Bar-Or et al., 2003), ale též makrofágy (Maeda et Sobel, 1996), mikroglií, endoteliálními buňkami (Birkedal-Hansen et al., 1993; Muir et al., 2002, Cunnea et al., 2010). Též ve studii in vitro, ve které byly stimulovány astrocyty a neurony lipopolysacharidy, došlo ke značnému zvýšení exprese pro-MMP-9 a pro-MMP-2 v astrocytech a pouze k lehkému zvýšení v neuronech (Liu et al., 2007). Při aktivaci astrocytů byla indukována exprese MMP-2 (Muir et al., 2002). Zvýšená exprese MMP-2 se spolupodílí na zvýšené hladině MMP-2 v séru a pravděpodobně lépe odráží stupeň destrukce nervové tkáně v chronických lézích, ve kterých hraje velmi důležitou

roli také B-lymfocytární subpiální infiltrace (*Magliozzi et al., 2007*). Zvýšení hladiny MMP-2 v séru bylo též asociováno s tíží onemocnění a se stupněm postižení, vyjádřené EDSS a MSSS v našem souboru nemocných. Kumulativní ztráta šedé a bílé hmoty, zejména postižení axonální je důležitým a pravděpodobně zásadním faktorem akumulace ireverzibilního postižení a konverze do progresivního průběhu (*Bruck et al., 2005*).

Řada dalších studií, které byly následně provedeny, potvrzuje naše nálezy a některé z nich naši práci citují. Prokazují význam MMPs, zejména MMP2/MMP9 v patofyziologii onemocnění a narušení HEB (*Acar et al., 2010; Mirshafiey et al., 2014; Shimizu et al., 2014; Szklarczyk et al., 2014*). Vzhledem k jejich potvrzenému významu v patofyziologii onemocnění se v současnosti vyvíjí nové, specifické, cílené techniky stanovení MMPs využívající např. spektroskopie (*Biela et al., 2015*).

Velmi významnou roli hraje také ovlivnění aktivity MMPs léčbou. Několik studií potvrzuje, že léčba interferony vedla ke snížení hladiny MMP-9 mRNA v séru u RS pacientů (*Galboiz et al., 2001; Waubant et al., 2003; Yushchenko et al., 2003*). Ve studii in vitro byla navíc prokázána inhibice exprese MMP-2 a MMP-9 v astrocytech a MMP-9 v mikroglii působením INF-beta (*Liuzzi et al., 2004*). V klinické studii s kombinovanou terapií INF beta-1a a doxycyklinem, silným inhibitorem MMPs, byla prokázána korelace mezi sníženou hladinou MMP-9 v séru a redukcí aktivity lézí sytících se gadoliniem u pacientů s RR RS (*Minagar et al., 2008*). Také léčba imunoglobuliny vedla ke snížení produkce MMP-9 v periferních mononukleárech u pacientů s RS a EAE (*Okada et al., 2015*). V dalším experimentálním modelu EAE byl prokázán také protizánětlivý efekt donezepilu, který inhibuje aktivitu MMPs u EAE (*Jiang et al., 2013*) či dasatinibu, který ihiboval aktivitu MMP-2 (*Azizi et al., 2015*). Ve studii EAE byla také prokázána inhibice MMP-2 v mozkomíšním moku minocyclinem (*Stoop et al., 2012*). Propustnost HEB je také ovlivněna dexamethasonem, který tlumí expresi MMP-9 v experimentálním myším modelu (*Blecharz et al., 2010*).

Nejnovější klinické studie prokazují, že specifické endogenními i syntetickými inhibitory MMPs by mohly být slibným lékem nejen v terapii RS, ale i ostatních neurodegenerativních onemocnění (*Barranger et al., 2014; Muroski et al., 2008; Minagar et al., 2008; Shimizu et al., 2014*). Z tohoto důvodu je stanovení hladin MMPs a jejich inhibitorů v séru velmi přínosné pro monitoraci efektu léčby u jednotlivých pacientů (*Hecker et al., 2013*), může selektovat nemocné, u kterých tento proces převažuje a přispět k rychlejšímu klinickému testování nových léčiv.

## 6 Souhrn

RS je multifaktoriální, multigenní onemocnění se značnou interindividuální variabilitou, ve které hraje významnou roli složka genetická. Metodou studia multigenních onemocnění jsou asociační studie vybraných kandidátních genů z hlediska jejich předpokládané účasti v patofyziologii daného onemocnění s nozologickými jednotkami. Naše výsledky potvrzují, že zjištění rizikových genetických polymorfismů v regulačních oblastech kandidátních genů může poskytnout důležité informace o patogeneze onemocnění. Zárodečné mutace genů, exprimujících zánětlivé proteiny může ovlivnit míru jejich exprese, stabilitu mRNA, vlastnosti daných proteinů a tím vlastní etiopatogenetický proces.

Práce významně přispívá k rozšíření současných znalostí a napomáhá objasnění genetické predispozice k rozvoji nemoci v české populaci, umožňující prokázat nejen míru individuálního rizika, ale také posoudit vliv na průběh nemoci a rozdíly mezi pohlavími. Přispívá také k prohloubení vědomostí o imunopatologických mechanismech RS, které podmiňují progresi choroby a ovlivňují individuální odpověď na terapii.

Nalezení rizikových alel a jejich kombinace a objasnění patofyziologických mechanismů může napomoci k vývoji nové, ještě účinnější, specifické, individualizované léčby, monitorovat její efekt a zlepšit prognózu tohoto invalidizujícího onemocnění.

## ABSTRAKT

**Úvod:** Roztroušená skleróza mozkomíšní (RS) je multifaktoriální onemocnění s polygenní dědičností. Vnímavost k rozvoji nemoci je podmíněna kombinací faktorů genetických, environmentálních a epigenetických. U geneticky predisponovaného jedince je onemocnění pravděpodobně spuštěno vlivem zevních faktorů, mezi které řadíme infekce, zejména herpetické, nedostatečnou koncentraci vitamínu D v séru a kouření.

Slibnými kandidáty jsou geny a jejich varianty, tzv. polymorfismy, které ovlivňují komplexní patogenetický proces. Jedná se o geny pro lidské leukocytární antigeny (HLA) II třídy, které hrají klíčovou roli ve zpracování antigenů myelinu a jejich prezentaci T-lymfocytům. Variabilita genu HLA-DRB1\*1501 může ovlivnit tento proces a následně iniciovat spuštění autoimunitního onemocnění. Dalším velmi významným časným faktorem, podmiňujícím rozvoj a progresi onemocnění je porušení hemato-encefalické bariéry (HEB), umožňující přestup zánětlivých buněk do CNS a navození zánětlivé reakce. Důležitou roli v tomto procesu hrají matrix metalloproteinázy (MMPs), které se významně podílí na infiltraci imunitních buněk do parenchymu CNS, degradaci myelinového bazického proteinu a přímé neurotoxicitě. Angiotensinogen (ATG) se také podílí na porušení HEB, aktivaci infiltrujících imunokompetentních buněk, expresi prozánětlivých a prooxidačních genů. Dále jsme se zaměřili na úlohu vitamínu D v imunopatogenezi RS. Vitamin D<sub>3</sub> prostřednictvím receptoru pro vitamin D (VDR) navozuje silné antiproliferativní, prodiferenční a imunomodulační účinky. VDR po své aktivaci slouží jako transkripční faktor regulující expresi více než devítiset 1.25 (OH) 2 D<sub>3</sub> responzivních genů, zároveň je také přítomen na buněčných membránách. Významnou roli hraje též interakce vitamínu D<sub>3</sub> s alelou HLA-DRB1\*15, neboť v proximální promotorové oblasti této alely je lokalizován responzivní element pro vitamin D.

**V předloženém souboru vlastních prací** byly analyzovány vybrané funkční kandidátní genetické polymorfismy lokalizované v genech pro HLA-DRB1\*1501, matrix metalloproteinázu-9 (MMP-9), matrix metalloproteinázu-2 (MMP-2) a její tkáňový inhibitor (TIMP-2), receptor vitamínu D (VDR), angiotensinogen (ATG) a  $\alpha$  řetězce receptoru pro IL-7 (IL7RA). Byla stanovena frekvence alel a genotypová distribuce ve studovaném souboru. Ve druhé části práce jsme se zabývali studiem hladin matrix metalloproteináz v séru.

**Cílem** těchto studií bylo určit asociační vztah kandidátních genetických polymorfismů s vnímavostí k RS; nalézt případné rozdíly mezi pohlavími a zjistit, zda ovlivňují průběh onemocnění v české populaci. Stanovit hladiny MMP-9, MMP-2 a jejich tkáňových inhibitorů v séru a vyhodnotit jejich vztah ke klinickému průběhu, stupni postižení a tíži onemocnění.

**Materiál a metodika:** Jedná se o studie typu case-control a genotypově fenotypové studie. Bylo do nich zařazeno celkem 306 nemocných s RS, diagnostikovanou dle Mc Donaldových kritérií a 135 zdravých jedinců. Ve studiích byla analyzována data pacientů sledovaných a léčených na Neurologické klinice FN Brno. Klinický stav byl hodnocen pomocí Expanded Disability Status Scale

(EDSS), stupeň postižení byl spočítán podle Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). Genotypizace byla provedena metodou polymerázové řetězové reakce (PCR) a restriční analýzou. Stanovení a kvantifikace hladin enzymů bylo provedeno metodou ELISA (enzyme-linked immunoassay). **Výsledky:** V genu pro HLA-DRB1\*1501 bylo prokázáno, že nosiči alely A vazebného genetického polymorfismu rs3135388 se vyskytovali frekventněji ve skupině nemocných s RS (OR= 3.69, 95% CI: 2,39-5,7) ve srovnání s kontrolním souborem. Jako první jsme prokázali signifikantní rozdíl také mezi nemocnými a zdravými ženami ( $P_g=1.3 \times 10^{-8}$ ). Frekvence alely A u nemocných žen činila 30.9% ve srovnání s 8% u kontrol ( $P_a=2.82 \times 10^{-9}$ ) (OR=5.11, 95 % CI: 2.86-9.15). U mužů signifikantní rozdíl nalezen nebyl.

V genu pro MMP-9 jsme prokázali signifikantní snížení frekvence T alely -1562 C/T polymorfismu ve skupině RS pacientů ve srovnání s kontrolami ( $P_a=0.01$ , OR -0.58, 95% CI:0.38-0.89) a ve skupině nemocných žen oproti zdravým ženám ( $P_a=0.01$ , OR-0.53, 95% CI:0.32-0.86). Bylo prokázáno, že nosiči -1562 T alely jsou méně frekventní u nemocných žen. Polymorfismus -1562 C>T je funkční a je asociován se zvýšenou produkcí MMP-9.

Dosud nebyla provedena žádná studie, zabývající se genetickými polymorfismy TIMP-2 ve vztahu k RS. V našem souboru jsme po jeho rozdělení na skupiny podle průběhu onemocnění prokázali asociaci TIMP-2 +853G/A genetického polymorfismu s vyšším rizikem rozvoje relaps remitentní (RR) RS ( $P_g = 0.04$ ), (OR 1.46; 95 % CI: 0.91–2.36). Alela G se pravděpodobně podílí na snížení aktivity TIMP-2 sekundárním ovlivněním struktury mRNA.

V genu pro ATG jsme v naší práci jako první zkoumali vztah mezi polymorfismy M235T a (-6) A/G a RS. Neprokázali jsme, že by zkoumané polymorfismy byly asociovány se zvýšeným rizikem rozvoje RS. Naše studie však prokázala, že variabilita M235T ATG může ovlivnit tíži postižení. Homozygoti TT měli nejtěžší stupeň postižení vyjádřený pomocí MSSS ( $p=0.02$ ). Polymorfismus M235T může ovlivnit tíži postižení pravděpodobně aktivací zánětlivého procesu.

V genu pro VDR byl u mužů zjištěn signifikantní rozdíl ve frekvenci alel a/nebo genotypové distribuci u polymorfismů TaqI, BsmI a ApaI mezi skupinou zdravých a nemocných mužů (Taq,  $p_g = 0,02$ ,  $p_a = 0,02$ ; BsmI,  $p_g = 0,02$ ,  $p_a = 0,04$ ; ApaI,  $p_g = 0,008$ ,  $p_a = 0,005$ ). U žen byl prokázán významný rozdíl ve frekvenci alel a genotypů ApaI u skupiny zdravých žen oproti kontrolám ( $p_g = 0,01$ ,  $p_a = 0,05$ ). Dále jsme se zaměřili na funkční genetický polymorfismus EcoRV (rs4516035) v genu pro VDR, který nebyl dosud v souvislosti s RS studován. V naší práci jsme jako první prokázali signifikantně frekventnější výskyt alely C u nemocných mužů ve srovnání s kontrolami (OR 1.8; 95% CI: 1.08-2.24),  $p_a = 0,02$ ; podílí se tedy na zvýšené vnímavosti k rozvoji RS u mužů. U žen je genotyp CT asociován s přibližně pětinasobně vyšší pravděpodobností rozvoje prognosticky nepříznivé primárně progresivní roztroušené sklerózy (CT vs. CC + TT  $p_{\text{corr}} = 0,01$ ). Studie in vitro prokazují, že polymorfismus rs4516035 je funkční, alela C je asociována se snížením exprese VDR.

Prokázali jsme zvýšenou hladinu MMP-9 v séru a zvýšení poměru MMP-9/TIMP-1 ve skupině pacientů s RS ( $P<0.001$ ), u skupiny nemocných s RR RS ( $P<0.001$ ) a sekundárně progresivní (SP) RS

( $P < 0.001$ ) při srovnání s kontrolní skupinou Odráží stupeň zánětlivého postižení a porušení HEB. Dále bylo prokázáno signifikantní zvýšení hladin MMP-2 v séru a MMP-2/TIMP-2 u progresivní formy onemocnění ( $P < 0.001$ ) při srovnání s relabující formou a toto zvýšení korelovalo s tíží onemocnění ( $P < 0.001$ ) a stupněm postižení ( $P < 0.05$ ). Odráží stupeň destrukce nervové tkáně v chronických lézích.

**Závěry:** Naše výsledky prokazují, že distribuce vazebného genetického polymorfismu (rs3135388) v genu pro HLA-DRB1\*1501 může determinovat genetickou vnímavost k rozvoji RS v české populaci a u žen. Byla nalezena signifikantní asociace polymorfismu (-1562 C/T) v genu pro MMP-9 s vyšším rizikem RS, zejména u žen a asociace TIMP-2 +853G/A polymorfizmu s vnímavostí k RR RS. Naše studie prokázala, že variabilita M235T ATG může ovlivnit tíží postižení. Bylo zjištěno, že variabilita vyšetřených polymorfismů v genu pro VDR by se mohla podílet na riziku rozvoje choroby u mužů, u žen ovlivňuje tíží a průběh onemocnění.

MMPs napomáhají objasnit patogenezu onemocnění a jsou slibnými biomarkery, které poskytují informace o klinické manifestaci, tíží a stupni postižení a umožňují monitoraci léčby. Jejich význam v patofyziologii RS a využití v klinické praxi však ještě musí být ověřeno v dalších studiích.

Objasnění faktorů, které se podílí na zvýšené vnímavosti a progresi nemoci může významně napomoci k vývoji nové, ještě účinnější, specifické farmakoterapie a podstatně zlepšit prognózu tohoto závažného onemocnění.

**Klíčová slova:** genetické polymorfismy; lidské leukocytární antigeny (HLA); matrix metalloproteinázy; roztroušená skleróza; receptor pro vitamin D

## ABSTRACT

**Background:** Multiple sclerosis (MS) is a multifactorial disease characterized by polygenic inheritance. Genetic, environmental and epigenetic factors contribute to susceptibility to the disease. In a genetically predisposed individual, the disorder seems to be triggered by environmental factors, including infections, mainly herpetic, insufficient serum concentrations of vitamin D and smoking.

Promising candidates are genes and their variants- polymorphisms that affect the complex aetiopathogenetic process. These are genes for the human leukocyte antigen (HLA) class II region, which play a key role in the recognition and presentation of myelin antigens to T- lymphocytes. The variability of the HLA-DRB1\*1501 gene may affect this process and subsequently trigger the autoimmune MS disease. Additionally, the blood-brain barrier (BBB) disruption is an early and central event in the immunopathogenesis of MS, allowing the transfer of inflammatory cells into the CNS, and the onset of neuro-inflammatory reactions. Matrix metalloproteinases (MMPs) play an important role in the breakdown of the BBB, invasion of immune cells into the CNS parenchyma, degradation of the myelin basic protein, and direct neurotoxicity. Angiotensinogen (ATG) is also involved in the process of BBB disruption, activation of infiltrating immunocompetent cells, expression of pro-inflammatory and pro-oxidant genes.

Furthermore, we have focused on the role of vitamin D in the immunopathogenesis of MS. Through the vitamin D receptor (VDR), vitamin D<sub>3</sub> induces strong antiproliferative, pro-differentiation and immunomodulatory effects. After activation, VDR serves as a transcription factor regulating the expression of more than nine hundred 1.25 (OH) <sub>2</sub> D<sub>3</sub> responsive genes and is also present on cell membranes. In addition, the vitamin D-responsive element (VDRE) has been identified in the promoter region of HLA-DRB1\*1501, which is the strongest genetic predictor of MS risk.

**Objective:** In the presented set of our own studies were analyzed candidate gene single nucleotide polymorphisms (SNPs) localized in the HLA-DRB1\*1501, matrix metalloproteinase-9 (MMP-9), matrix metalloproteinase-2 (MMP-2), tissue inhibitor of MMP-2 (TIMP-2), vitamin D receptor (VDR), angiotensinogen (ATG) and interleukin 7 receptor- $\alpha$  (IL7RA) genes. Genotype distributions and allele frequencies were determined in the studied groups. The second part of the thesis is focused on the determination of MMPs and their tissue inhibitors serum levels.

**The aim** of the present studies was to examine the association of genotypes/alleles given by these candidate SNPs with MS susceptibility; to find potential gender differences; and to investigate whether these polymorphisms influence disability in the Czech population. To determine the serum levels of MMP-9, MMP-2 and their tissue inhibitors and to investigate a possible relation to the clinical course and severity of MS.

**Material and methods:** The studies were designed as a case-control and phenotype-genotype studies. We enrolled 306 MS patients fulfilling McDonald's criteria for MS, the control group consisted of 135 healthy individuals. All patients and controls were recruited from the Department of Neurology at the



University Hospital, Brno. Disability was evaluated according to the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and disease severity was calculated using the Multiple Sclerosis Severity Score (MSSS). Polymerase chain reaction (PCR) methods and restriction analysis were used for genotyping in candidate genes. The DNA genotyping was performed using polymerase chain reaction (PCR) methods with restriction analyses. The serum levels of MMPs were measured by enzyme linked immunoassay (ELISA).

**Results:** In the HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 SNP a significant difference in genotype distribution ( $P_g=3.06 \times 10^{-9}$ ) and allele frequency ( $P_a=6.08 \times 10^{-10}$ ) (OR= 3.69, 95% CI: 2,39-5,7) between MS patients and controls was demonstrated. Also, we were the first to prove a significant difference between female MS patients and female controls in genotype distribution ( $P_g=1.3 \times 10^{-8}$ ) and allele frequency ( $P_a=2.82 \times 10^{-9}$ ); (OR- 5.11, 95% CI: 2.86-9.15). Allele A frequency in female patients with MS was 30.9% compared with 8% in female controls. No significant difference was found males. A significant decrease of the -1562T allele carriers in MS patients compared to controls ( $P_a=0.01$ ) in -1562C/T MMP-9 gene polymorphism was found ( $P_a=0.01$ , OR-0.58, 95% CI:0.38-0.89). Significant differences were also demonstrated between female patients and healthy females ( $P_a=0.01$ , OR-0.53, 95% CI:0.32-0.86). It has previously been described that the changes in the promoter region of the -1562C/T MMP-9 gene polymorphism influence transcription; the -1562 C>T polymorphism has been associated with increased MMP-9 expression.

To date, no genetic association study of TIMP-2 gene variability and MS has been carried out After dividing our studied group according to the disease form we found significant association of +853 G/A TIMP-2 SNP with relapsing remitting MS (RR) MS ( $P_g = 0.04$ ), (OR 1.46; 95 % CI: 0.91–2.36). Allele G is likely to contribute to downregulation of TIMP-2 activity by influence on the secondary structure of the mRNA, which inhibits the rate of translation and/or decreases the mRNA stability.

We first studied M235T and (-6) A/G gene polymorphisms in relation to MS. We did not find statistically significant association with increased susceptibility to MS. Our study demonstrated that variability of M235T ATG polymorphism can influence disease severity. The homozygotes TT had the highest (5.4) mean MSSS values ( $P=0.02$ ). M235T polymorphism represents the functional polymorphism where the T allele was connected with elevated expression of ATG and can influence the disease severity by activation of inflammatory proces.

In VDR gene, allele and/or genotype distributions differed in TaqI, BsmI, and ApaI polymorphisms in MS male as compared to controls (Taq,  $p_g = 0.02$ ,  $p_a = 0.02$ ; BsmI,  $p_g = 0.02$ ,  $p_a = 0.04$ ; ApaI,  $p_g = 0.008$ ,  $p_a = 0.005$ ). In MS female, differences in the frequency of alleles and genotypes were found to be significant in ApaI ( $p_g = 0.01$ ,  $p_a = 0.05$ ). We have also focused on the functional genetic polymorphism EcoRV (rs4516035) in the VDR gene, which has never been studied in connection with MS. We first demonstrated a significantly higher frequeention of allele C in MS male compared to controls (OR 1.8; 95% CI: 1.08-2.24),  $p_a = 0.02$ . Conclusive results were observed between MS female; CT genotype was found to increase the risk of primary progressive MS 5.5 times (CT vs

CC+TT  $p_{\text{corr}} = 0.01$ ). In vitro studies showed that the rs4516035 polymorphism is functional and the allele G is associated with decreased promoter activity and expression of VDR. A significant elevation in MMP-9 serum levels and in the MMP-9/TIMP-1 ratio was found in the whole MS group ( $P < 0.001$ ), in the RR MS ( $P < 0.001$ ), and secondary progressive MS (SPMS) ( $P < 0.001$ ) groups when compared with the controls. This reflects the degree of the inflammatory process and BBB disruption. A significant elevation in MMP-2 serum levels and in the MMP-2/TIMP-2 ratio was observed in the primary progressive ( $P < 0.001$ ) and the SPMS ( $P < 0.002$ ) groups when compared with the RRMS group, and this increase was also associated with the disability ( $P < 0.001$ ) and severity ( $P < 0.05$ ) of the disease. Increased expression of MMP-2 results in elevation of serum MMP-2 levels and may reflect a higher degree of destruction of nervous tissue in chronic lesions.

**Conclusion:** Our results indicate that the distribution of the tag SNP for HLA-DRB1\*1501, rs3135388, is a risk factor for susceptibility to MS in the Czech population and also in the female population. We demonstrated a significant association between the risk of MS, particularly in female, and MMP-9-1562C/T gene polymorphism. In addition, our study indicated an association between TIMP-2 +853G/A SNP and susceptibility to RR MS and proved that the variability of M235T ATG polymorphism can influence disease severity. The distribution of explored VDR polymorphisms was found to be a risk factor for susceptibility to MS in males and for progression of the disease in females in the Czech population.

We confirmed that metalloproteinases are useful biological markers in MS, providing information about the clinical type, disability, and severity of the disease. MMPs help to elucidate the pathogenesis of the disease and could contribute to an improvement in diagnostic standards and therapeutic interventions for this disease. Their impact on the understanding of the pathophysiology of MS and on the practical management of MS patients, remains, however, to be established.

Clarification of the factors that contribute to increased susceptibility to MS and disease progression may significantly facilitate the development of more effective, new and specific drug therapies, thus improving prognosis for the large numbers of sufferers.

**Key words:** gene polymorphism; human leukocyte antigen (HLA); multiple sclerosis; matrix metalloproteinases; vitamin D receptor

## 7 Seznam použitých zkratk

ADAM.....	membránově vázaná metalloproteináza
APC .....	antigen prezentující buňka
ATG.....	angiotenzinogen
CI.....	interval spolehlivosti
CIS .....	klinicky izolovaný syndrom
CCPGSM.....	Canadian Collaborative Project on Genetic Susceptibility to Multiple Sclerosis
CL.....	kolagenáza
CNS .....	centrální nervový system
DIS.....	diseminace v prostoru
DIT .....	diseminace v čase
DNA. ....	deoxyribonukleová kyselina
EAE .....	experimentální autoimunitní encefalomyelitida
EBV.....	Epsteina Barrové viroza
ECM. ....	extracelulární matrix
EDSS. ....	Expanded Disability Status Scale
ELISA.....	enzyme-linked immunoassay
GWAS .....	genome-wide asociační studie
HEB.....	hemato-encefalická bariéra
HLA.....	lidské leukocytární antigeny
HCl. ....	kyselina chlorovodíková
HHV 6.....	human herpesvirus type 6
HSP.....	heat shock protein
IFN.....	interferon
IL.....	interleukin
IL-1.....	interleukin-1
IL-2.....	interleukin-2
IL-4.....	interleukin-4
IL-5.....	interleukin-5
IL-6.....	interleukin-6
IL-7.....	interleukin-7
IL-8.....	interleukin-8
IL-10.....	interleukin-10
IL-12.....	interleukin-12

IL-13.....	interleukin-13
IL-17.....	interleukin-17
IL-18.....	interleukin-18
IL-21.....	interleukin-21
IL-22.....	interleukin-22
IL-35.....	interleukin-35
IL2RA.....	$\alpha$ řetězec receptoru pro IL-2
IL7RA.....	$\alpha$ řetězec receptoru pro IL-7
IU.....	mezinárodní jednotka
MAG.....	myelinová asociační glykoprotein
MBP.....	myelinový bazický protein
MHC.....	hlavní histokompatibilní systém
MHS.....	major histocompatibility complex
MMPs.....	matrix metalloproteinázy
MMP-1.....	intersticiální kolagenaza
MMP-2.....	matrix metalloproteináza-2, gelatináza A
MMP-7.....	matrilysin
MMP-9.....	matrix metalloproteináza-9, gelatináza B
MOG.....	myelinový oligodendrocytární glykoprotein
MR.....	magnetická resonance
MRZ.....	M-morbilli, R-rubella, Z-varicella zoster
MSSS.....	Multiple Sclerosis Severity Score
MT-MMPs.....	membránové metalloproteinázy
mRNA.....	messenger ribonukleová kyselina
např.....	například
NMSS.....	National Multiple Sclerosis Society
obr.....	obrázek
OR.....	relativní riziko
Pcorr.....	mnohočetné srovnání
PCR.....	polymerázová řetězová reakce
PLP.....	proteolipoprotein
PP RS.....	primárně progresivní RS
RNA.....	ribonukleová kyselina
RR RS.....	relabující-remitentní RS
RS.....	roztroušená skleróza

RXR.....	retinoidním X receptor
SD.....	směrodatná odchylka
SL.....	stromelysin
SP RS.....	sekundárně chronicko-progresivní RS
tab.....	tabulka
TACE.....	tumor necrosis factor alfa konvertující enzym
T-reg lymfocyt.....	T regulační lymfocyt
TGF.....	transformující růstový faktor
TIMP-1.....	tkáňový inhibitor metalloproteinázy-1
TIMP-2.....	tkáňový inhibitor metalloproteinázy-2
TIMP-3.....	tkáňový inhibitor metalloproteinázy-3
TIMP-4.....	tkáňový inhibitor metalloproteinázy-4
TNF.....	tumor nekrotizující factor
tzv.....	takzvaný
USA.....	Spojené státy americké
UVB.....	ultrafialové záření B
vitamin D3.....	cholecalciferol
VDR.....	receptor vitamínu D
VDRE.....	responzivní element pro vitamin D

## 8 Seznam použité literatury

**Ablashi DV, Eastman HB, Owen CB, Roman MM, Friedman J, Zabriskie JB, et al.** *Frequent HHV-6 reactivation in multiple sclerosis (MS) and chronic fatigue syndrome (CFS) patients.* J Clin Virol 2000; 16:179-91.

**Abraham M, Shapiro S, Karni A, Weiner HL, Miller A.** *Gelatinases (MMP-2 and MMP-9) are preferentially expressed by Th1 vs. Th2 cells.* J Neuroimmunol. 2005; 163: 157-64.

**Acar BA, Özetkin ZN, Özetkin MF, Acar T.** *Serum MMP-2, MMP-9, TIMP-1 and TIMP-2 levels in multiple sclerosis clinical subtypes and their diagnostic value in the progressive disease course.* Biomedical Research 2014; 25: 343-50.

**Achiron A.** *Predicting the course of relapsing-remitting MS using longitudinal disability curves.* J Neurol 2004; 251: 65–8.

**Agliardi C, Guerini FR, Saresella M, Caputo D, Leone MA, Zanzottera M et al.** *Vitamin D receptor (VDR) gene SNPs influence VDR expression and modulate protection from multiple sclerosis in HLA-DRB1\*15-positive individuals.* Brain Behav Immun. 2011; 25 (7): 1460-7.

**Agliardi C, Guerini FR, Saresella M, Caputo D, Leone MA, Zanzottera M. et al.** *Vitamin D receptor (VDR) gene SNPs influence VDR expression and modulate protection from multiple sclerosis in HLA-DRB1\*15-positive individuals.* Brain Behav Immun. 2011 Oct; 25 (7): 1460-7.

**Akkad DA, Lee DH, Bruch K, Haghikia A, Epplen JT, Hoffjan S, Linker RA.** *Multiple sclerosis in families: risk factors beyond known genetic polymorphisms.* Neurogenetics. 2016; 17: 131-5.

**Akkad DA, Olischewsky A, Reiner F, Hellwig K, Esser S, Epplen JT et al.** *Combinations of susceptibility genes are associated with higher risk for multiple sclerosis and imply disease course specificity.* PLoS One.2015; 10: e0127632.

**Alcina A, Abad-Grau Mdel M, Fedetz M, Izquierdo G, Lucas M, Fernández O et al.** *Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1\*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations.* PLoS One 2012; 7: e29819.

**Al-Temaimi RA, Al-Enezi A, Al-Serri A, Al-Roughani R, Al-Mulla F.** *The Association of Vitamin D Receptor Polymorphisms with Multiple Sclerosis in a Case-Control Study from Kuwait.* PLoS One. 2015; 10 (11): e0142265.

**and-9 promoter polymorphisms with colorectal cancer in Chine.** Mol Carcinog. 2007; 46: 924–29.

**Anthony DC, Ferguson B, Matyzak MK, Miller KM, Esiri MM, Perry VH.** *Differential matrix metalloproteinase expression in cases of multiple sclerosis and stroke.* Neuropathol Appl Neurobiol. 1997; 23: 406-15.

**Ascherio A, Munch M.** *Epstein-Barr virus and multiple sclerosis.* Epidemiol 2000; 11:220 - 24.



- Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, Spiegelman D, Hernán MA, Olek MJ, et al.** *Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study.* JAMA 2001 26; 286: 3083-88.
- Ascherio A, Munger KL, Simon KC.** Vitamin D and multiple sclerosis. Lancet Neurol 2010; 9: 599–612.
- Ascherio A, Munger KL, Simon KC.** Vitamin D and multiple sclerosis. Lancet Neurol 2010; 9: 599–612.
- Aung LL, Mouradian MM, Dhib-Jalbut S, Balashov KE.** *MMP-9 expression is increased in B lymphocytes during multiple sclerosis exacerbation and is regulated by microRNA-320a.* J Neuroimmunol 2015; 278: 185-9.
- Avolio C, Ruggieri M, Giuliani F, Liuzzi GM, Leante R, Riccio P et al.** Serum MMP-2 and MMP-9 are elevated in different multiple sclerosis subtypes. *J Neuroimmunol.* 2003; **136**: 46-53.
- Azizi G, Goudarzvand M, Afraei S, Sedaghat R, Mirshafiey A.** *Therapeutic effects of dasatinib in mouse model of multiple sclerosis.* Immunopharmacol Immunotoxicol. 2015; 37: 287-294.
- Azizi G, Haidari MR, Khorramizadeh M, Naddafi F, Sadria R, Javanbakht MH et al.** *Effects of Imatinib Mesylate in Mouse Models of Multiple Sclerosis and In vitro Determinants.* Iran J Allergy Asthma Immunol 2014; 13: 198-206.
- Ballerini C, Guerini FR, Rombolà G, Rosati E, Massacesi L, Ferrante P, Caputo D, Talamanca LF, Naldi P, Liguori M, Alizadeh M, Momigliano-Richiardi P, D'Alfonso S.** *HLA-multiple sclerosis association in continental Italy and correlation with disease prevalence in Europe.* J. Neuroimmunol. 2004; 150: 178-85.
- Baranger K, Rivera S, Liechti FD, Grandgirard D, Bigas J, Seco J et al.** *Endogenous and synthetic MMP inhibitors in CNS physiopathology.* Prog Brain Res. 2014; 214: 313-351.
- Bar-Or A, Nuttall RK, Duddy M, Alter A, Kim HJ, Ifergan I et al.** *Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as a major inflammatory mediators in multiple sclerosis.* Brain 2003; 126: 2738-49.
- Barrosos E, Fernandes LP, Milne RL, Pita G, Sendagorta E, Floristan U et al.** *Genetic analysis of the vitamin D receptor gene in two epithelial cancers: melanoma and breast cancer case-control studies.* BMC Cancer 2008; 23: 8:385.
- Bashinskaya VV, Kulakova OG, Boyko AN, Favorov AV, Favorova OO.** *A review of genome-wide association studies for multiple sclerosis: classical and hypothesis-driven approaches.* Hum Genet. 2015;134(11-12):1143-62
- Ben-Selma W, Ben-Fredj N, Chebel S, Frih-Ayed M, Aouni M, Boukadida J.** *Age- and gender-specific effects on VDR gene polymorphisms and risk of the development of multiple sclerosis in Tunisians: a preliminary study.* Int J Immunogenet. 2015; 42 (3): 174-81.
- Berrigan LI, Fisk JD, Patten SB, Tremlett H, Wolfson C, Warren S et al.** *Team in the Epidemiology and Impact of Comorbidity on Multiple Sclerosis (ECoMS). Health-related quality of life in multiple sclerosis: Direct and indirect effects of comorbidity.*

- Biela A, Watkinson M, Meier UC, Baker D, Giovannoni G, Becer CR et al.** *Disposable MMP-9 sensor based on the degradation of peptide cross-linked hydrogel films using electrochemical impedance spectroscopy.* Biosens Bioelectron. 2015; 68: 660-667.
- Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, DeCarlo A et al.** *Matrix metalloproteinases: a review.* Crit Rev Oral Biol Med. 1993; 4: 197–250.
- Black RA, Rauch CT, Kozlosky CJ, Peschon JJ, Slack JL, Wolfson MF.** *A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor- $\alpha$  from cells.* Nature 1997; 385: 729-33.
- Blecharz KG, Haghikia A, Stasiolek M, Kruse N, Drenckhahn D, Gold R et al.** *Glucocorticoid effects on endothelial barrier function in the murine brain endothelial cell line cEND incubated with sera from patients with multiple sclerosis.* Mult Scler 2010; 16: 293-302.
- Bos SD, Berge T, Celius EG, Harbo HF.** *From genetic associations to functional studies in multiple sclerosis.* European Journal of Neurology. 2016; 5: 847–53.
- Bos SD, Page CM, Andreassen BK, et al.** *Genome-wide DNA methylation profiles indicate CD8+ T cell hypermethylation in multiple sclerosis.* PLoS One 2015; 10: e0117403.
- Brasier AR, Li J.** *Mechanisms for inducible control of angiotensinogen gene transcription.* Hypertension 1996; 27: 465-75.
- Bray PF, Luka J, Bray PF, Culp KW, Schlicht JP.** *Antibodies against Epstein-Barr nuclear antigen (EBNA) in multiple sclerosis CSF, and two pentapeptide sequence identities between EBNA and myelin basic protein.* Neurology 1992; 42: 1798-804.
- Brinckerhoff CE, Matrisian LM.** *Matrix metalloproteinases: a tail of a frog that became a prince.* Nat Rev Mol Cell Biol. 2002; 3: 207–14.
- Brinckerhoff CE, Plucinska IM, Sheldon LA, O'Connor GT.** *Half-life of synovial cell collagenase mRNA is modulated by phorbol myristate acetate but not by all-trans-retinoic acid or dexamethasone.* Biochemistry 1986; 25: 6378–84.
- Brütting C, Emmer A, Kornhuber M, Staeger MS.** *A survey of endogenous retrovirus (ERV) sequences in the vicinity of multiple sclerosis (MS)-associated single nucleotide polymorphisms (SNPs).* Mol Biol Rep. 2016 May 12. [Epub ahead of print]
- Brück W.** *Inflammatory demyelination is not central to the pathogenesis of multiple sclerosis.* J Neurol. 2005; 252: 10–15.
- Brück W.** *New insights into the pathology of multiple sclerosis: towards a unified concept?* J Neurol. 2007; 254: 3–9.
- Brüls T, Weissenbach J.** *The human metagenome: our other genome?* Hum Mol Genet. 2011; 20: R 142–8.
- Burrell AM, Handel AE, Ramagopalan SV, Ebers GC, Morahan JM.** *Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis and the major histocompatibility complex (MHC).* Discov Med 2011; 11: 187–96.
- Cabre P, Signate A, Olindo S, Merle H, Caparros-Lefebvre D, Béra O, et al.** *Role of return migration in the emergence of multiple sclerosis in the French West Indies.* Brain 2005; 128: 2899-910.

- Cadden M, Arnett P.** *Factors Associated with Employment Status in Individuals with Multiple Sclerosis.* *Int J MS Care* 2015;17 (6):284–91.
- Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC et al.** *Epidemic influenza and vitamin D.* *Epidemiol Infect* 2006; 134: 1129-40.
- Cantorna MT, Hayes CE, DeLuca HF.** *1,25-Dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> reversibly blocks the progression of relapsing encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis.* *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 7861-4.
- Cantorna MT, Snyder L, Lin YD, Yang L.** *Vitamin D and 1,25(OH)<sub>2</sub>D regulation of T cells.* *Nutrients.* 2015; 7 (4): 3011-21.
- Carroll RJ, Bastarache L, Denny JC.** *R PheWAS: data analysis and plotting tools for phenome-wide association studies in the R environment.* *Bioinformatics.* 2014; 30: 2375-6.
- Cepok S, Zhou D, Srivastava R, Nessler S, Stei S, Büssow K, et al.** *Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis.* *J Clin Invest* 2005; 115: 1352-60.
- Chandler S, Coates R, Gearing A, Lury J, Wells G, Bone E.** *Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein.* *Neurosci Lett* 1995; 201:223–26.
- Christensen T.** *The role of EBV in MS pathogenesis.* *Int MS J* 2006; 13:52-7.
- Čierny D, Hányšová S, Michalik J, Kantorová E, Kurča E, Škereňová M et al.** *Genetic variants in interleukin 7 receptor  $\alpha$  chain (IL-7Ra) are associated with multiple sclerosis risk and disability progression in Central European Slovak population.* *J Neuroimmunol.* 2015; 282: 80-4.
- Cocco E, Murgia F, Lorefice L, Barberini L, Poddighe S, Frau J et al.** *(H)-NMR analysis provides a metabolomic profile of patients with multiple sclerosis.* *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm.* 2016; 3: e185.
- Comabella M, Montalban X.** *Body fluid biomarkers in multiple sclerosis.* *Lancet Neurol.* 2014; 13: 113-26.
- Compston A and Confavreux C.** In: McAlpine's Multiple Sclerosis 4th edn (Compston A, et al). London: Churchill Livingstone Elsevier 2006;71-111.
- Cordell HJ, Clayton DG.** Genetic association studies. *Lancet* 2005; **366**: 1121–31.
- Correale J, Gaitán MI.** *Multiple sclerosis and environmental factors: the role of vitamin D, parasites, and Epstein-Barr virus infection.* *Acta Neurol Scand* 2015; 132: 46–55.
- Handunnetthi L, Ramagopalan SV, Ebers GC.** *Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1\*15.* *Neurology* 2010; 74: 1905–10.
- Correale J, Ysrraelit MC, Gaitán MI.** *Immunomodulatory effects of vitamin D in multiple sclerosis.* *Brain* 2009; 132: 1146-60.
- Correale J, Ysrraelit MC, Gaitán MI.** *Immunomodulatory effects of vitamin D in multiple sclerosis.* *Brain* 2009; 132: 1146-60.
- Cox MB, Ban M, Bowden NA, Baker A, Scott RJ, Lechner-Scott J.** *Potential association of vitamin D receptor polymorphism Taq1 with multiple sclerosis.* *Mult. Scler.* 2012 18, 16-22.
- Cree B.** *The genetics of MS susceptibility and disease course. The changing face of MS: understanging populations, treating individuals.* 23–24 February 2008, Abstract book: 8.

- Cree BA.** *Multiple sclerosis genetics.* Handb Clin Neurol 2014; 122: 193-209.
- Cristiano E, Rojas J, Romano M, Frider N, Machnicki G, Giunta D et al.** *The epidemiology of multiple sclerosis in Latin America and the Caribbean: a systematic review.* Mult Scler 2013; 19: 844–54.
- Cunnea P, McMahon J, O'Connell E, Mashayekhi K, Fitzgerald U, McQuaid S.** *Gene expression analysis of the microvascular compartment in multiple sclerosis using laser microdissected blood vessels.* Acta Neuropathol. 2010; 119: 601-15.
- d'Alesio A, Garabedian M, Sabatier JP, Guaydier-Souquieres G, Marcelli C et. al.** *Two single-nucleotide polymorphisms in the human vitamin D receptor promoter change protein-DNA complex formation and are associated with height and vitamin D status in adolescent girls.* Hum Mol Genet. 2005; 14: 3539-48.
- Dang MN, Buzzetti R, Pozzilli P.** *Epigenetics in autoimmune diseases with focus on type 1 diabetes.* Diabetes Metab Res Rev 2013; **29**: 8–18.
- Davenport CB.** In: *Association for Research in Nervous and Mental Diseases (ARNMD),* New York Hoeber 1921;2:8-19.
- de Bakker PI, McVean G, Sabeti PC, Miretti MM, Green T, Marchini J et al.** *A high-resolution HLA and SNP haplotype map for disease association studies in the extended human MHC.* Nat Genet 2006; 38: 1166-72.
- De Jager PL, Simon KC, Munger KL, Rioux JD, Hafler DA, Ascherio A.** *Integrating risk factors: HLA-DRB1\*1501 and Epstein-Barr virus in multiple sclerosis.* Neurology 2008; 70: 1113-18.
- de Vries RR, Meera Khan P, Bernini LF, van Loghem E, van Rood JJ.** Genetic control of survival in epidemics. J Immunogenet. 1979; 6: 271-87.
- Dean G.** *Annual incidence, prevalence, and mortality of multiple sclerosis in white South-African-born and in white immigrants to South Africa.* Br Med J 1967; 2: 724-30.
- Ďurmanová V, Shawkatová I, Javor J, Párnická Z, Čopíková-Cundráková D, Turčáni P, et al.** *VLA4 Gene Polymorphism and Susceptibility to Multiple Sclerosis in Slovaks.* Folia Biol (Praha). 2015; 61: 8-13.
- Dusso AS, Brown AJ, Slatopolsky E.** Vitamin D. Am J Physiol renal Physiol 2005, 289 F8-28.
- Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD.** *Genetics of multiple sclerosis.* Lancet Neurol. 2004; 3: 104-10.
- Ebers G.** *Environmental factors in multiple sclerosis.* MS Forum 1998; Modern Management Workshop, Montréal.
- Ebers G.** *Genetic factors in multiple sclerosis.* MS Forum 1995; Modern Management Workshop, Boston.
- Ebers G.** *Multiple sclerosis: Epidemiology, Genetics and Environmental factors.* MS Forum 2007; Modern Management Workshop, Wiesbaden.
- Ebers GC, Sadovnick AD, Dyment DA, Yee IM, Willer CJ, Risch N.** *Parent-of-origin effect in multiple sclerosis: observations in half-siblings.* Lancet. 2004; 363: 1773-4.
- Egeblad M, Werb Z.** *New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression.* Nat Rev Cancer. 2002; 2: 161–74.

*expression of metalloproteinases in rat glial cell cultures: implications for multiple sclerosis*

**Fang Y, van Meurs JB, d'Alesio A, Jhamai M, Zhao H, Rivadeneira F et al.** *Promoter and 3'-untranslated-region haplotypes in the vitamin d receptor gene predispose to osteoporotic fracture: the Rotterdam study.* Am J Hum Genet. 2005; 77: 807–823.

**Fernandes KS, Brum DG, Sandrim VC, Guerreiro CT, Barreira AA, Tanus-Santos JE.** *Matrix metalloproteinase-9 genotypes and haplotypes are associated with multiple sclerosis and with the degree of disability of the disease.* J Neuroimmunol. 2009; 214: 128-31.

**Fernández O, Fernández V, Alonso A, Caballero A, Luque G, Bravo M et al.** *DQB1\*0602 allele shows a strong association with multiple sclerosis in patients in Malaga, Spain.* J. Neurol. 2004; 251: 440-44.

**Fiotti N, Zivadinov R, Altamura N, Nasuelli D, Bratina A, Tommasi MA.** *MMP-9 microsatellite polymorphism and multiple sclerosis.* J Neuroimmunol. 2004; 152:147-53.

**Fogdell-Hahn A, Ligers A, Grønning M, Hillert J, Olerup O.** *Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease.* Tissue Antigens. 2000 Feb;55 (2):140-8.

**Fonken LK, Weber MD, Daut RA, Kitt MM, Frank MG, Watkins LR et al.** *Stress-induced neuroinflammatory priming is time of day dependent.* Psychoneuroendocrinology. 2016; 66: 82–90.

**Fukazawa T, Yabe I, Kikuchi S, Sasaki H, Hamada T, Miyasaka K et al.** *Association of vitamin D receptor gene polymorphism with multiple sclerosis in Japanese.* J Neurol Sci. 1999; 166 (1): 47-52.

**Galboiz Y, Shapiro S, Lahat N, Rawashden R, Miller A.** *Matrix metalloproteinases and their tissue inhibitors as markers of disease subtype and response to interferon-beta therapy in relapsing and secondary progressive multiple sclerosis patients.* Ann Neurol 2001; 50: 443-51.

**García-Martín E, Agúndez JA, Martínez C, Benito-León J, Millán-Pascual J, Calleja P. et al.** *Vitamin D3 receptor (VDR) gene rs2228570 (Fok1) and rs731236 (Taq1) variants are not associated with the risk for multiple sclerosis: results of a new study and a meta-analysis.* PLoS One. 2013;8 (6): e65487.

**Garcion E, Wion-Barbot N, Montero Menei CN, Berger F, Wion D.** *New clues about vitamin D function in the nervous system.* Trends Endocrinol Metab 2002; 13:100-105.

**Gašparović I, Čizmarević NS, Lovrečić L, Perković O, Lavtar P, Sepčić J et al.** *MMP-2 -1575G/A polymorphism modifies the onset of optic neuritis as a first presenting symptom in MS?* J Neuroimmunol 2015; 286:13-15.

**Giordano A, Ferrari G, Radice D, Randi G, Bisanti L, Solari A, POSMOS study.** *Health-related quality of life and depressive symptoms in significant others of people with multiple sclerosis: a community study.* Eur J Neurol 2012; 19: 847–54.

**Gold SM, Mohr DC, Huitinga I, Flachenecker P, Sternberg EM, Heesen C.** *The role of stress-response systems for the pathogenesis and progression of MS.* Trends Immunol 2005; 26: 644–52.

- Goldberg GI, Manner BL, Grant GA, Eisen AZ, Wilhelm S, He C.** *Human 72-kilodalton type IV collagenase forms a complex with a tissue inhibitor of metalloproteases designated TIMP-2.* Proc Natl Acad Sci. USA 1989; 86: 8207–11.
- Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, Halper J, Likosky WH, Lublin FD et al.** *Disease modifying therapies in multiple sclerosis: Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines.* Neurol 2002;58: 169-78.
- Goodin DS, Frohman EM, Garmany GP, Halper J, Likosky WH, Lublin FD et al.** *Disease modifying therapies in multiple sclerosis: Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines.* Neurol 2002; 58: 169-78.
- Goris A, Walton A, Ban M, Dubois B, Compston A, Sawcer S.** A Taqman assay for high-throughput genotyping of the multiple sclerosis-associated HLA-DRB1\*1501 allele. Tissue Antigens. 2008; 72: 401-3.
- Gourraud PA, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE.** *The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review.* Immunol Rev. 2012 Jul;248(1):87-103.
- Graves M, Benton M, Lea R, et al.** *Methylation differences at the HLA-DRB1 locus in CD4+ T-cells are associated with multiple sclerosis.* Mult Scler 2013; 20: 1033–41.
- Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, Svendsen P, Madsen LS, Thomsen AR et al.** *Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis.* Nature. 2006; 443: 574-7.
- Gregory SG, Schmidt S, Seth P, Oksenberg JR, Hart J, Prokop A et al.** Multiple Sclerosis Genetics Group. *Interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) shows allelic and functional association with multiple sclerosis.* Nat Genet. 2007; 39: 1083–91.
- Griffiths AJ; Miller JH; Suzuki DT; Lewontin RC; Gelbart WM.** *An introduction to genetic analysis.* 7. vyd. New York: 2000.
- Grigorian A, Mkhikian H, Li CF, Newton BL, Zhou RW, Demetriou M et al.** *Pathogenesis of multiple sclerosis via environmental and genetic dysregulation of N-glycosylation.* Semin Immunopathol 2012; 34: 415-24.
- Hadgkiss EJ, Jelinek GA, Weiland TJ, Pereira NG, Marck CH, van der Meer DM.** *Methodology of an International Study of People with Multiple Sclerosis Recruited through Web 2.0 Platforms: Demographics, Lifestyle, and Disease Characteristics.* Neurol Res Int 2013; 2013: 580596.
- Hammack BN, Fung KY, Hunsucker SW, Duncan MW, Burgoon MP, Owens GP et al.** *Proteomic analysis of multiple sclerosis cerebrospinal fluid.* Mult Scler 2004; 10 (3): 245–260.
- Hartung HP, Bar-Or A, Zoukos Y.** *What do we know about the mechanism of action of disease-modifying treatments in MS?* J Neurol 2004; 251: 12–19.
- Hartung HP.** *Pathogenesis of multiple sclerosis: status of research.* Wien Med Wochenschr. 1996; 146: 520-27.
- Hashimoto H, Vertino PM, Cheng X.** *Molecular Coupling of DNA Methylation and Histone Methylation.* Epigenomics 2010 5: 657–69.
- Havrdová E.** *Roztroušená skleróza.* Triton, 2002.

- Heaney RP, Davies KM, Chen TC, Holick MF, Barger-Lux MJ.** *Human serum 25-hydroxycholecalciferol response to extended oral dosing with cholecalciferol.* Am J Clin Nutr. 2003 Jan; 77: 204–10.
- Hebbring SJ, Schrodi SJ, Ye Z, Zhou Z, Page D, Brilliant MH.** *A PheWAS approach in studying HLA-DRB1\*1501.* Genes Immun. 2013; 14:187-91.
- Hecker M, Hartmann C, Kandulski O, Paap BK, Koczan D, Thiesen HJ et al.** *Interferon-beta therapy in multiple sclerosis: the short-term and long-term effects on the patients' individual gene expression in peripheral blood.* Mol Neurobiol. 2013; 48: 737-56.
- Hecker M, Hartmann C, Kandulski O, Paap BK, Koczan D, Thiesen HJ et al.** *Interferon-beta therapy in multiple sclerosis: the short-term and long-term effects on the patients' individual gene expression in peripheral blood.* Mol Neurobiol. 2013; 48(3): 737-756.
- Hensiek AE, Sawcer SJ, Feakes R, Deans J, Mander A, Akesson E, et al.** *HLA-DR 15 is associated with female sex and younger age at diagnosis in multiple sclerosis.* J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 2002; 72: 184-87.
- Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, et al.** *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J 2001; 18: 748-52.
- Hirano K, Sakamoto T, Uchida Y, Morishima Y, Masuyama K, Ishii Y et al.** *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 gene polymorphisms in chronic obstructive pulmonary disease.* Eur Respir J 2001; 18: 748–52.
- Holick MF.** *Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease.* Am J Clin Nutr 2004;80(6 Suppl):1678S - 88S.
- Holick MF.** *Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis.* Am J Clin Nutr.200479: 362-71.
- Holick MF.** *Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis.* Am J Clin Nutr 2004; 79: 362-71.
- Holmøy T.** *Vitamin D status modulates the immune response to Epstein Barr virus: Synergistic effect of risk factors in multiple sclerosis.* Med Hypotheses. 2008;70(1):66-9.
- Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ.** *Interactions between the microbiota and the immune system.* Science 2012; 336: 1268–73.
- Hořejší V, Bartůňková J.** *Základy imunologie:* Triton, 2009; s. 146. <http://www.tcells.org/scientific/gdtcells/>.
- HR et al.** *Matrix metalloproteinase-9/gelatinase B is a putative therapeutic target of chronic obstructive pulmonary disease and multiple sclerosis.* Curr Pharm Biotechnol 2008; 9: 34–46. <http://www.emdbiosciences.com>
- Huang J, Xie ZF.** *Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and multiple sclerosis risk: a meta-analysis of case-control studies.* J Neurol Sci. 2012; 313 (1-2): 79-85.
- Huebner K, Isobe M, Gasson JC, Golde DW, Croce CM.** *Localization of the gene encoding human erythroid-potentiating activity to chromosome region Xp11.1-Xp11.4.* Am J Human Genet. 1986; 38: 819–26.
- Huhtala P, Eddy RL, Fan ZS, Byers MG, Show TB, Tryggvason K.** *Completion of the primary structure of the human type IV collagenase preproenzyme and assignment of the gene (CLG4) to the q21 region of chromosome 16.* Genomics 1990b; 6: 554–59.



- Huhtala P, Tuuttila A, Chow LT, Lohi J, Keski-Oja J, Tryggvason K.** *Complete structure of the human gene for 92-kDa type IV collagenase. Divergent regulation of expression for the 92- and 72-kilodalton enzyme genes in HT-1080 cells.* J Biol Chem 1991; 266:16485–90.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, et al.** *Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study.* N Engl J Med 2007; 357: 851–62.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium; Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer S, Hellenthal G, Pirinen M, Spencer CC, Patsopoulos NA, Moutsianas L, et al.** *Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis.* Nature 2011; 476: 214–19.
- Jablonski NG, Chaplin G.** *The evolution of human skin coloration.* J Hum Evol 2000; 39:57–106.
- Jäger J, Schulze C, Rösner S, Martin R.** *IL7RA haplotype-associated alterations in cellular immune function and gene expression patterns in multiple sclerosis.* Genes Immun. 2013; 14: 453–61.
- Jehan F, Voloc A, Esterle L, Warlant-Debray O, Nguyen TM, Garabedian M.** *Growth, calcium status and vitamin D receptor (VDR) promoter genotype in European children with normal or low calcium intake.* J Steroid Biochem Mol Biol 2010; 121 (1-2):117–20.
- Jersild C, Svejgaard A, Fog T.** *HLA antigens and multiple sclerosis.* Lancet 1972; 1:1240 – 41.
- Jiang Y, Zou Y, Chen S, Zhu C, Wu A, Liu Y et al.** *The anti-inflammatory effect of donepezil on experimental autoimmune encephalomyelitis in C57 BL/6 mice.* Neuropharmacology. 2013; 73:415–24.
- Joseph RW, Bayraktar UD, Kim TK, St John LS, Popat U, Khalili J et al.** *Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells.* Hum Immunol. 2012; 73 (7): 693–8.
- Kaliszewska A, De Jager PL.** *Exploring the role of the epigenome in multiple sclerosis: a window onto cell-specific transcriptional potential.* J Neuroimmunol 2012; 248: 2–9.
- Kantarci OH, Barcellos LF, Atkinson EJ, Ramsay PP, Lincoln R, Achenbach SJ, et al.** *Men transmit MS more often to their children vs women: the Carter effect.* Neurology 2006; 67: 305–10.
- Kongsbak M, Levring TB, Geisler C, von Essen MR.** *The vitamin D receptor and T cell function.* Front Immunol. 2013; 4: 148.
- Könnecke H, Bechmann I.** *The role of microglia and matrix metalloproteinases involvement in neuroinflammation and gliomas.* Clin Dev Immunol 2013; 2013: 914104.
- Korobko DS, Malkova NA, Bulatova EV, Babenko LA, Sazonov DV, Sokolova EA et al.** *The effect of genetic factors on the phenotypic expression of multiple sclerosis.* Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova. 2013; 113: 10–6.
- Kurtzke JF, Heltberg A.** *Multiple sclerosis in the Faroe islands. An epitomé.* J Clin Epidemiol 2001; 54: 1–22.
- Kurtzke JF.** *Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an Expanded Disability Status Scale (EDSS).* Neurology 1983; 33: 1444–52.

- Kurzepa J, Bartosik-Psujek H, Suchozebrska-Jesionek D, Rejdak K, Stryjecka-Zimmer M, Stelmasiak Z.** *Role of matrix metalloproteinases in the pathogenesis of multiple sclerosis.* *Neurol Neurochir Pol.* 2005; 39: 63-67.
- La Russa A, Cittadella R, De Marco EV, Valentino P, Andreoli V, Trecroci F et al.** *Single nucleotide polymorphism in the MMP-9 gene is associated with susceptibility to develop multiple sclerosis in an Italian case-control study.* *J Neuroimmunol.* 2010; 225: 175-79.
- Lalive PH, Burkhard PR, Chofflon M.** *TNF-alpha and psychologically stressful events in healthy subjects: potential relevance for multiple sclerosis relapse.* *Behav Neurosci* 2002; 116:1093-97.
- Lang HL, Jacobsen H, Ikemizu S, Andersson C, Harlos K, Madsen L, et al.** *A functional and structural basis for TCR cross-reactivity in multiple sclerosis.* *Nat Immunol* 2002; 3:940-43.
- Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Zhang JL.** *Incidence of multiple sclerosis in multiple racial and ethnic groups.* *Neurology* 2013; 80:1734-9.
- Langer-Gould A, Brara SM, Beaber BE, Zhang JL.** *The incidence of clinically isolated syndrome in a multi-ethnic cohort.* *J Neurol* 2014; 261: 1349-55.
- Larochelle C, Alvarez JI, Prat A.** *How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?* *FEBS Lett* 2011; 585: 3770-80.
- Latchman YE, Liang SC, Wu Y et al.** *PD-L1 deficient mice show that PD-L1 on T-cells, antigen presenting cells and host tissues negatively regulates T-cells.* *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101: 10691-99.
- Lee MA, Smith S, Palace J, Narayanan S, Silver N, Minicucci L et al.** *Spatial mapping of T2 and gadolinium-enhancing T1 lesion volumes in multiple sclerosis: evidence for distinct mechanisms of lesion genesis?* *Brain* 1999; 122: 1261-70.
- Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S et al.** *Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis.* *Brain* 1998; 121: 2327-34.
- Leppert D, Waubant E, Galandy R, Bunnett NW, Hauser SL. 1995.** *T cell gelatinases mediate basement membrane transmigration in vitro.* *J Immunol.* 1995; 154: 4379-89.
- Levin LI, Munger KL, O'Reilly EJ, Falk KI, Ascherio A.** *Primary infection with the Epstein-Barr virus and risk of multiple sclerosis.* *Ann Neurol* 2010; 67: 824-30.
- Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, et al.** *Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus.* *JAMA* 2003; 289: 1533-36.
- Levin LI, Munger KL, Rubertone MV, Peck CA, Lennette ET, Spiegelman D, Ascherio A.** *Temporal relationship between elevation of Epstein-Barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis.* *JAMA* 2005; 293: 2496-500.
- Ligers A, Dymant DA, Willer CJ, Sadovnick AD, Ebers G, Risch N, Hillert J; Canadian Collaborative Study Groups.** *Evidence of linkage with HLA-DR in DRB1\*15-negative families with multiple sclerosis.* *Am J Hum Genet.* 2001; 69: 900-3.
- Lim CK, Brew BJ, Sundaram G, Guillemin GJ.** *Understanding the roles of the kynurenine pathway in multiple sclerosis progression.* *Int J Tryptophan Res* 2010; 3:157-67.

- Lin Z, Li W.** *The Roles of Vitamin D and Its Analogs in Inflammatory Diseases.* Curr Top Med Chem. 2016; 16 (11):1242-61.
- Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymont DA, Tiislar M, et al.** *A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis.* Nat Genet 2005; 37: 1108–12.
- Lindberg RL, De Groot CJ, Montagne L, Freitag P, Valk P, Kappos L.** *The expression profile of matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs) in lesions and normal appearing white matter of multiple sclerosis.* Brain 2001; 124: 1743-53.
- Lindberg RL, Hoffmann F, Mehling M, Kuhle J, Kappos L.** *Altered expression of miR-17-5p in CD4+ lymphocytes of relapsing-remitting multiple sclerosis patients.* Eur J Immunol. 2010; 40:888–98.
- Hecker M, Thamilarasan M, Koczan D, Schröder I, Flechtner K, Freiesleben S, et al.** *MicroRNA Expression Changes during Interferon-Beta Treatment in the Peripheral Blood of Multiple Sclerosis Patients.* Int J Mol Sci. 2013; 14: 16087–110.
- Liotta LA, Abe S, Robey PG, Martin G.** *Preferential digestion of basement membrane collagen by an enzyme derived from a metastatic murine tumor.* Proc Natl Acad Sci. USA 1979; 76: 2268–72.
- Liu PT, Stenger S, Li H et al.** *Toll like receptor triggering of a vitamin D- mediated human antimicrobial response.* Science 2006; 311: 1170-73.
- Liu W, Furuichi T, Miyake M, Rosenberg GA, Liu KJ.** *Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in cultured astrocytes and neurons regulates the activation of matrix metalloproteinase-2.* J Neurosci Res. 2007; 85: 829–36.
- Liuzzi GM, Latronico T, Fasano A, Carlone G, Riccio P.** *Interferon-beta inhibits the synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis.* Multiple sclerosis 2002; 8: 222–28.
- Liuzzi GM, Trojano M, Fanelli M, Avolio C, Fasano A, Livrea P et al.** *Intrathecal synthesis of matrix metalloproteinase-9 in patients with multiple sclerosis: implication for pathogenesis.* Multiple sclerosis 2002; 8: 222–28.
- Lobentanz IS, Asenbaum S, Vass K, Sauter C, Klösch G, Kollegger H, et al.** *Factors influencing quality of life in multiple sclerosis patients: disability, depressive mood, fatigue and sleep quality.* Acta Neurol Scand 2004; 110: 6–13.
- Lossius A, Johansen JN, Vartdal F, et al.** *High-throughput sequencing of TCR repertoires in multiple sclerosis reveals intrathecal enrichment of EBV-reactive CD8 (+) T cells.* Eur J Immunol 2014; 44: 3439–52.
- Lovrecič L, Ristič S, Starcevič-Cizmarevič N, Jazbec SS, Sepcič J, Kapovič M et al.** *Angiotensin-converting enzyme I/D gene polymorphism and risk of multiple sclerosis.* Acta Neurol Scand. 2006; 114: 374-7.
- Luomala M, Elovaara I, Ukkonen M, Koivula T, Lehtimäki T.** *The combination of HLA-DR1 and HLA-DR53 protects against MS.* Neurology 2001; 56: 383-85.
- Maeda A, Sobel RA.** *Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions.* J Neuropathol Exp Neurol. 1996; 55: 300–9.

- Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, et al.** *Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology.* Brain 2007; 130: 1089-104.
- Mahon BD, Gordon SA, Cruz J, Cosman F, Cantorna MT.** *Cytokine profile in patients with multiple sclerosis following vitamin D supplementation.* J Neuroimmunol 2003;134: 128–32.
- Makhani N, Morrow SA, Fisk J, Evans C, Beland SG, Kulaga S, et al.** *MS incidence and prevalence in Africa, Asia, Australia and New Zealand: A systematic review.* Mult Scler Relat Disord 2014; 3: 48–60.
- Marrie RA.** *Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology.* Lancet Neurol 2004; 3: 709–18.
- Marrosu MG, Murru MR, Costa G, Cucca F, Sotgiu S, Rosati G.** *Multiple sclerosis in Sardinia is associated and in linkage disequilibrium with HLA-DR3 and -DR4 alleles.* Am J Hum Genet. 1997; 61: 454-57.
- Martin R, Bielekova B, Gran B, McFarland HF.** *Lessons from studies of antigen-specific T cell responses in Multiple Sclerosis.* J Neural Transm Suppl. 2000; 60: 361-73.
- Masterman T, Ligers A, Olsson T, Andersson M, Olerup O, Hillert J.** *HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis.* Ann Neurol 2000; 48: 211–19.
- Matejuk A, Dwyer J, Zamora A, Vandenbark AA, Offner H.** *Evaluation of the effects of 17 beta-estradiol (17beta-e2) on gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis using DNA microarray.* Endocrinology 2002; 143: 313-9.
- Matiello M, Schaefer-Klein J, Brum DG, Atkinson EJ, Kantarci OH, Kantarci OH et al. NMO genetics collaborators.** *HLA-DRB1\*1501 tagging rs3135388 polymorphism is not associated with neuromyelitis optica.* Mult. Scler. 2010; 16: 981-84.
- Matrix metalloproteases and their inhibitors are produced by overlapping populations of activated astrocytes.* Brain Res Mol Brain Res 2002; **100**: 103–17.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD et al.** *Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from International Panel on the Diagnosis of Multiple Sclerosis.* Ann. Neurol 2001; 50: 121–7.
- McDonnell GV, Mawhinney H, Graham CA, Hawkins SA, Middleton D.** *A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis.* J. Neurol. Sci. 1999; 165: 77-83.
- Minagar A, Alexander JS, Schwendimann RN, Kelley RE, Gonzalez-Toledo E, Jimenez JJ et al.** *Combination therapy with interferon beta-1a and doxycycline in multiple sclerosis: an open-label trial.* Arch Neurol 2008; 65:199–204.
- Mirowska-Guzel D, Gromadzka G, Czlonkowski A, Czlonkowska A.** *Association of MMP1, MMP3, MMP9, and MMP12 polymorphisms with risk and clinical course of multiple sclerosis in a Polish population.* J Neuroimmunol. 2009; 214: 113-7.
- Mirshafiey A, Asghari B, Ghalamfarsa G, Jadidi-Niaragh F, Azizi G.** *The significance of matrix metalloproteinases in the immunopathogenesis and treatment of multiple sclerosis.* Sultan Qaboos Univ Med J 2014;14 (1): e13-25.

- Miyadera H, Tokunaga K.** Associations of human leukocyte antigens with autoimmune diseases: challenges in identifying the mechanism. *J Hum Genet.* 2015; 60 (11): 697-702.
- Mkhikian H, Grigorian A, Li CF, Chen HL, Newton B, Zhou RW et al.** *Genetics and the environment converge to dysregulate N-glycosylation in multiple sclerosis.* *Nat Commun* 2011; 2: 334.
- Moss ML, Jin SL, Milla ME, Bickett DM, Burkhart W, Cartner H.** *Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumor-necrosis factor-alpha.* *Nature* 1997; 385: 733-36.
- Moussallieh FM, Elbayed K, Chanson JB, et al.** *Serum analysis by 1H nuclear magnetic resonance spectroscopy: a new tool for distinguishing neuromyelitis optica from multiple sclerosis.* *Mult Scler* 2014; 20:558–65.
- Muir EM, Adcock KH, Morgenstern DA, Clayton R, von Stillfried N, Rhodes K et al.**
- Munger K, Köchert K, Simon KC, Kappos K, Polman Ch, Freedman MS et al.** *Molecular mechanism underlying the impact of vitamin D on disease activity of MS* *Ann Clin Transl Neurol.* 2014; 1 (8): 605-17.
- Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A.** *Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis.* *Jama* 2006; 296: 2832–8.
- Muroski ME, Roycik MD, Newcomer RG, Van den Steen PE, Opdenakker G, Monroe Nakagawa K.** *Effect of vitamin D on the nervous system and the skeletal muscle.* *Clin Calcium* 2006,16:1182-87.
- Nakajima T, Jorde LB, Ishigami T, Umemura S, Emi M, Lalouel JM et al.** *Nucleotide diversity and haplotype structure of the human angiotensinogen gene in two populations.* *Am J Hum Genet.* 2002; 70: 108-23.
- Narooie-Nejad M, Moossavi M, Torkamanzehi A, Moghtaderi A, Salimi S.** *Vitamin D Receptor Gene Polymorphism and the Risk of Multiple Sclerosis in South Eastern of Iran.* *J Mol Neurosci.* 2015; 56 (3):572-6.
- Narooie-Nejad M, Moossavi M, Torkamanzehi A, Moghtaderi A.** *Positive association of vitamin D receptor gene variations with multiple sclerosis in South East Iranian population.* *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 427519.
- Nelissen I, Dubois B, Goris A, Donese I, Carton H, Opdenakker G.** *Gelatinase B-PECAM-1 and MCP-3 gene polymorphisms in Belgian multiple sclerosis.* *J Neurol Sci.* 2002; 200: 43-48.
- Nelissen I, Vandenbroeck K, Fiten P, Hillert J, Olsson T, Marrosu MG.** *Polymorphism analysis suggests that the gelatinase B gene is not susceptibility factor for multiple sclerosis.* *J Neuroimmunol.* 2000; 105, 58-63.
- Neurology* 2016; 9.pii: 10.1212/WNL.0000000000002564.
- Newman TA, Woolley ST, Hughes PM, Sibson NR, Anthony DC, Perry VH.** *T-cell and macrophage mediated axon damage in the absence of a CNS-specific immune response: involvement of metalloproteinases.* *Brain* 2001; 124: 2203–14.
- Nexø BA, Villesen P, Nissen KK, Lindegaard HM, Rossing P, Petersen T, et al.** *Are human endogenous retroviruses triggers of autoimmune diseases? Unveiling associations of three diseases and viral loci.* *Immunol Res* 2016;64: 55-63.

- Nicot A.** *Gender and sex hormones in multiple sclerosis pathology and therapy.* Front Biosci 2009; 14: 4477-515.
- Nielsen TR, Pedersen M, Rostgaard K, Frisch M, Hjalgrim H.** *Correlations between Epstein-Barr virus antibody levels and risk factors for multiple sclerosis in healthy individuals.* Mult Scler 2007; 13: 420-23.
- Nielsen TR, Rostgaard K, Nielsen NM, Koch-Henriksen N, Haahr S, Sørensen PS, et al.** *Multiple sclerosis after infectious mononucleosis.* Arch Neurol 2007; 64: 72-5.
- Niller HH, Wolf H, Ay E, Minarovits J.** *Epigenetic dysregulation of epstein-barr virus latency and development of autoimmune disease.* Adv Exp Med Biol 2011; 711: 82-102.
- Nussbaum RL, McInnes RR, Willard HF.** *Klinická genetika.* Nakladatelství Triton, 2004.
- Offner H.** *Neuroimmunoprotective effects of estrogen and derivatives in experimental autoimmune encephalomyelitis: therapeutic implications for multiple sclerosis.* J Neurosci Res 2004; 78: 603-24.
- Okada K, Adachi H.** *Human immunoglobulin G suppresses the production of matrix metalloproteinase-9 in peripheral blood mononuclear cells of patients with multiple sclerosis.* Clinical and Experimental Neuroimmunology 2015; 6:281-88.
- Oksenberg JR, Barcellos LF.** *Multiple sclerosis genetics: leaving no stone unturned.* Genes Immun. 2005; 6:375-87.
- Orlow I, Roy P, Reiner AS, Yoo S, Patel H, Paine S et. al.;** GEM Study Group. *Vitamin D receptor polymorphisms in patients with cutaneous melanoma.* Int J Cancer. 2012; 130 (2): 405-18.
- Ortiz GG, Pacheco-Moisés FP, Macías-Islas MÁ, Flores-Alvarado LJ, Mireles-Ramírez MA, González-Renovato ED et al.** *Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis.* Arch Med Res 2014; 45:687–97.
- Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al.** Canadian Collaborative Study Group. *Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study.* Lancet Neurol 2006; 5:932–36.
- Ottervald J, Franzen B, Nilsson K, Andersson LI, Khademi M, Eriksson B et al.** *Multiple sclerosis: Identification and clinical evaluation of novel CSF biomarkers.* J Proteomics 2010; 3(6): 1117-32.
- pathogenesis and treatment.* Mult Scler 2004; **10**: 290–7.
- Pender MP.** *Infection of autoreactive B lymphocytes with EBV, causing chronic autoimmune diseases.* Trends Immunol 2003; 24:584-88.
- Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle JC.** *Contribution of vitamin D insufficiency to the pathogenesis of multiple sclerosis.* Ther Adv Neurol Disord. 2013; 6: 81-116.
- Platten M, Youssef S, Hur EM, Ho PP, Han MH, Lanz TV et al.** *Blocking angiotensin-converting enzyme induces potent regulatory T cells and modulates TH1- and TH17-mediated autoimmunity.* Proc Natl Acad Sci USA 2009; 106 (35): 14948-953.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B, Clanet M, Cohen JA, Filippi M, et al.** *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria.* Ann Neurol. 2011; 69: 292–302.

- Polman CH, Reingold SC, Edan G, Filippi M, Hartung HP, Kappos L, et al.** *Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the „McDonald Criteria“.* Ann Neurol. 2005; 58: 840–6.
- Prat E, Tomaru U, Sabater L, Park DM, Granger R, Kruse N, et al.** *HLA-DRB5\*0101 and -DRB1\*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype.* J Neuroimmunol 2005;167: 108–19.
- Prat E, Tomaru U, Sabater L, Park DM, Granger R, Kruse N, et al.** *HLA-DRB5\*0101 and -DRB1\*1501 expression in the multiple sclerosis-associated HLA-DR15 haplotype.* J Neuroimmunol. 2005; 167: 108–19.
- Presthus J.** *Report on the multiple sclerosis investigations in West-Norway.* Acta Psychiatr Scand Suppl 1960; 35:88–92.
- Proost P, Van Damme J, Opdenakker G.** *Leukocyte gelatinase B cleavage releases encephalitogens from human myelin basic protein.* Biochem Biophys Res Commun. 1993; 192: 1175-81.
- Ram M, Sherer Y, Shoenfeld Y.** *Matrix Metalloproteinase-9 and Autoimmune Diseases.* J Clin Immunol 2006; 26:299-307.
- Ramagopalan SV, Maugeri NJ, Handunnetthi L, Lincoln MR, Orton SM, Dymment DA et al.** *Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1\*1501 is regulated by vitamin D.* PloS Genet. 2009;5: e1000369.
- Randerson-Moor JA, Taylor JC, Elliott F, Chang YM, Beswick S, Kukalich K et al.** *Vitamin D receptor gene polymorphisms, serum 25-hydroxyvitamin D levels, and melanoma: UK case-control comparisons and a meta-analysis of published VDR data.* Eur J Cancer. 2009; 45: 3271-81.
- Reinke S, Broadhurst D, Sykes B, et al.** *Metabolomic profiling in multiple sclerosis: insights into biomarkers and pathogenesis.* Mult Scler 2014; 20:1396–400.
- Ristori G, Cannoni S, Stazi MA, Vanacore N, Cotichini R, Alfò M, et al.** *Multiple sclerosis in twins from continental Italy and Sardinia: a nationwide study.* Ann Neurol 2006; 59:27–34.
- Robinson J, Waller MJ, Parham P, de Groot N, Bontrop R, Kennedy LJ, et al.** *IMGT/HLA and IMGT/MHC: sequence databases for the study of the major histocompatibility complex.* Nucleic Acids Res. 2003; 1:311-4.
- Roxburgh RH, Seaman SR, Masterman T, Hensiek AE, Sawcer SJ, Vukusic S et al.** *Multiple Sclerosis Severity Score: using disability and disease duration to rate disease severity.* Neurology 2005; 64, 1144-1151.
- Royal W 3rd, Mia Y, Li H, Naunton K.** *Peripheral blood regulatory T cell measurements correlate with serum vitamin D levels in patients with multiple sclerosis.* J Neuroimmunol 2009; 213:135-41.
- Sadovnick AD.** *Genetic background of multiple sclerosis.* Autoimmun Rev 2012; 11:163-66.
- Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H, Larjava H.** *Transforming growth factor- $\beta$ 1 up-regulates type IV collagenase expression in cultured human keratinocytes.* J Biol Chem. 1991; 266:11436–41.



- Sanders VJ, Felisan S, Waddell A, Tourtellotte WW.** *Detection of herpesviridae in postmortem multiple sclerosis brain tissue and controls by polymerase chain reaction.* J Neurovirol 1996; 2:249–58.
- Schmidt H, Williamson D, Ashley-Koch A.** *HLA-DR15 haplotype and multiple sclerosis: a HuGE review.* Am J Epidemiol 2007; 165:1097-109.
- Schmied MC, Zehetmayer S, Reindl M, Ehling R, Bajer-Kornek B, Leutmezer F et al.** *Replication study of multiple sclerosis (MS) susceptibility alleles and correlation of DNA-variants with disease features in a cohort of Austrian MS patients.* Neurogenetics. 2012; 13:181-7.
- Sellebjerg F, Sørensen TL.** *Chemokines and matrix metalloproteinase-9 in leukocyte recruitment to the central nervous system.* Brain Res Bull. 2003; 61: 347-55.
- Seltzer JL, Adams SA, Grant GA, Eisen AZ.** *Purification and properties of a gelatin-specific neutral protease from human skin.* J Biol Chem. 1981; 256: 4662–68.
- Seltzer JL, Eisen AZ, Bauer EA, Morfia NP, Glanville RW, Burgeson RE.** *Cleavage of type VII collagen by interstitial collagenase and type IV collagenase (gelatinase) derived from human skin.* J Biol Chem. 1989, 264: 3822–26.
- Shimizu F, Tasaki A, Sano Y, Ju M, Nishihara H, Oishi M et al.** *Sera from remitting and secondary progressive multiple sclerosis patients disrupt the blood-brain barrier.* PLoS One 2014;9: e92872.
- Shoenfeld Y, Fučíková T, Bartůňková J.** *Autoimunita -vnitřní nepřítel.* Grada 2007; ISBN: 8024720449.
- Simon KC, Munger KL, Ascherio A.** *Vitamin D and multiple sclerosis: epidemiology, immunology, and genetics.* Curr Opin Neurol. 2012; 25 (3): 246-51. Polymorphisms in vitamin D metabolism related genes and risk of multiple sclerosis. Simon KC, Munger KL, Xing Yang, Ascherio A Mult Scler. 2010 Feb; 16(2):133-8.
- Sioka C, Papakonstantinou S, Markoula S, Gkartziou F, Georgiou A, Georgiou I, et al.** *Vitamin D receptor gene polymorphisms in multiple sclerosis patients in northwest Greece.* J Negat Results Biomed. 2011; 10: 3. 42
- Smith KJ, Pyrdol J, Gauthier L, Wiley DC, Wucherpfennig KW.** *Crystal structure of HLA-DR2 (DRA\*0101, DRB1\*1501) complexed with a peptide from human myelin basic protein.* J Exp Med. 1998;188(8):1511-20.
- Smolders J, Damoiseaux J, Menheere P, Tervaert JW, Hupperts R.** *Association study on two vitamin D receptor gene polymorphisms and vitamin D metabolites in multiple sclerosis.* Ann N Y Acad Sci. 2009; 1173: 515-20.
- Smolders J, Thewissen M, Peelen E, Menheere P, Tervaert JW, Damoiseaux J et al.** *Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis.* PLoS One 2009 13;4: e6635.
- Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, et al.** *Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM response to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA.* Nat Med 1997; 3:1394–97.
- Soliven B, Szuchet S.** *Signal transduction pathways in oligodendrocytes: role of tumor necrosis factor-alpha.* Int J Dev Neurosci. 1995; 13: 351-67.

- Sombekke MH, Lukas C, Crusius JB, Tejedor D, Killestein J, Arteta D, et al.** *HLA-DRB1\*1501 and spinal cord magnetic resonance imaging lesions in multiple sclerosis.* Arch Neurol. 2009; 66: 1531-36.
- Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, et al.** *IL-10 signaling is essential for 1,25 dihydroxyvitamin D<sub>3</sub>- mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis.* J Immunol 2006; 177: 6030-37.
- Steelman AJ.** *Infection as an Environmental Trigger of Multiple Sclerosis Disease Exacerbation.* Front Immunol 2015; 6:520.
- Stegbauer J, Lee DH, Seubert S, Ellrichmann G, Manzel A, Kvakon H et al.** *Role of the renin-angiotensin system in autoimmune inflammation of the central nervous system.* Proc Natl Acad Sci U S A 2009; 106 (35): 14942-47.
- Šterzl Ivan, et al.** *Základy imunologie.* 1. vydání, Praha: Karolinum, 2005.
- Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto P, Levy AT, Liotta LA.** *Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues.* J Biol Chem. 1990, 265: 13933–38.
- Stoop MP, Dekker LJ, Titulaer MK, Lamers RJ, Burgers PC, Sillevius Smitt PA et al.** *Quantitative Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance (MALDI-FT-ICR) Peptide Profiling and Identification of Multiple-Sclerosis-Related Proteins.* J Proteome Res 2009; 8 (3): 1404-14.
- Stoop MP, Rosenling T, Attali A, Meesters RJ, Stingl C, Dekker LJ et al.** *Minocycline effects on the cerebrospinal fluid proteome of experimental autoimmune encephalomyelitis rats.* J Proteome Res 2012; 11: 4315-25.
- Sundström P, Juto P, Wadell G, Hallmans G, Svenningsson A, Nyström L, et al.** *An altered immune response to Epstein-Barr virus in multiple sclerosis: a prospective study.* Neurology 2004;62: 2277-82.
- Sundström P, Nyström M, Ruuth K, Lundgren E.** *Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1\*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis.* J Neuroimmunol. 2009 30; 215: 102-7.
- Szklarczyk A, Conant K.** *Matrix metalloproteinases, synaptic injury, and multiple sclerosis.* Front Psychiatry 2010; 1:130.
- Tajouri L, Ovcarić M, Curtain R, Johnson MP, Griffiths LR, Csurhes P et al.** *Variation in the vitamin D receptor gene is associated with multiple sclerosis in an Australian population.* J Neurogenet. 2005; 19 (1): 25-38.
- Tejada-Simon MV, Zang YC, Hong J, Rivera VM, Zhang JZ.** *Cross-reactivity with myelin basic protein and human herpesvirus-6 in multiple sclerosis.* Ann Neurol. 2003; 53: 189-97.
- Teutsch SM, Booth DR, Bennetts BH, Heard RN, Stewart GJ.** *Identification of 11 novel and common single nucleotide polymorphisms in the interleukin-7 receptor-alpha gene and their associations with multiple sclerosis.* Eur. J. Hum. Genet; 2003; 11: 509-15.
- Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A.** *Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis.* Ann Neurol 2006; 59:499-503.
- Thyroid. 2010; 20 (7): 715-25

- Thompson AJ, Banwell BL, Barkhof F, Carroll WM, Coetzee T, Comi G et al.** *Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria.* Lancet Neurol. 2018; 17(2): 162-73.
- Tizaoui T, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K.** *Association between vitamin D receptor polymorphisms and multiple sclerosis: systematic review and meta-analysis of case-control studies.* Cell Mol Immunol. 2015; 12: 243-52.
- Tomer Y.** *Genetic susceptibility to autoimmune thyroid disease: past, present, and future.*
- van Heemst J, Huizinga TJ, van der Woude D, Toes RE.** *Fine-mapping the human leukocyte antigen locus in rheumatoid arthritis and other rheumatic diseases: identifying causal amino acid variants?* Curr Opin Rheumatol. 2015; 27 (3): 256-61.
- van Sechel AC, Bajramovic JJ, van Stipdonk MJ, Persoon-Deen C, Geutskens SB, van Noort JM.** *EBV-induced expression and HLA-DR-restricted presentation by human B cells of alpha B-crystallin, a candidate autoantigen in multiple sclerosis.* J Immunol 1999; 162:129-35.
- Vachová M.** *Epidemie roztroušené sklerózy ve světě?* Cesk Slov Neurol N 2012;75/108:701-6.
- Vašků A, Goldbergová M, Izakovičová Hollá L, Šišková L, Groch L, Beránek M.** *A haplotype constituted of four MMP-2 promoter polymorphisms (-1575G/A, -1306C/T, -790T/G and -735C/T) is associated with coronary triple-vessel disease.* Matrix Biol. 2004; 22: 585-91.
- Vos CMP, van Haastert ES, de Groot CJA, van der Valk P, Vries HE.** *Matrix metalloproteinase-12 is expressed phagocytosis macrophages in active multiple sclerosis lesions.* J Neuroimmunol. 2003; 138: 106-14.
- Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C.** *Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in French farmers.* J Neurol Neurosurg Psychiatry 2007;78: 707-9.
- Wang PP, Nestel EP, Bordeau V et al.** *Cutting edge: 1.25 dihydroxyvitamin D3 is a direct inducer of antimicrobial peptide gene expression.* J Immunol 2004; 173: 2909-12.
- Wang TT, Tavera-Mendoza LE, Laperriere D, et al.** *Large-scale in silico and microarray-based identification of direct 1.25 dihydroxyvitamin D3 target genes.* Mol Endocrinol 2005;19: 2685-95.
- Wang X, Tromp G, Cole CW, Verloes A, Sakalihasan N, Yoon S et al.** *Analysis of coding sequences for tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP1) and (TIMP2) in patients with aneurysms.* Matrix Biol 1999;1n8:121–24.
- Waubant E, Goodkin D, Bostrom A, Bacchetti P, Hietpas J, Lindberg R et al.** *IFN beta lowers MMP-9/TIMP-1 ratio, which predicts new enhancing lesions in patients with SPMS.* Neurology 2003; 60: 52-57.
- Weatherby SJ, Thomson W, Pepper L, Donn R, Worthington J, Man CL, et al.** *HLA-DRB1 and disease outcome in multiple sclerosis.* J. Neurol. 2001; 248: 304-310.
- Weber F, Fontaine B, Cournu-Rebeix I, Kroner A, Knop M, Lutz S et al.** *IL2RA and IL7RA genes confer susceptibility for multiple sclerosis in two independent European.* Genes Immun. 2008; 9: 259-63.

**Weinstock GM.** *Genomic approaches to studying the human microbiota.* Nature. 2012; 489: 250–6.

**Wekerle H.** *Nature plus nurture: the triggering of multiple sclerosis.* Wekerle H. Swiss Med Wkly. 2015; 145: w14189.

**Welgus HG, Campbell EJ, Cury JD, Eisen AZ, Senior RM, Wilhelm SM.** *Neutral metalloproteinases produced by human mononuclear phagocytes. Enzyme profile, regulation, and expression during cellular development.* J Clin Invest. 1990; 86: 1496-502.

**Whitacre CC, Reingold SC, O'Looney PA.** *A gender gap in autoimmunity.* Science **1999**; 283:1277-8.

**Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC;** Canadian Collaborative Study Group. *Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis.* Proc Natl Acad Sci U S A 2003; 100:12877-82.

**Willer CJ, Herrera BM, Morrison KM, Sadovnick AD, Ebers GC;** Canadian Collaborative Study on Genetic Susceptibility to Multiple Sclerosis. *Association between microchimerism and multiple sclerosis in Canadian twins.* J Neuroimmunol 2006; 179:145-51.

**World Health Organization, Multiple Sclerosis International Federation.** *Atlas: Multiple Sclerosis Resources in the World.* Geneva, Switzerland: World Health Organization;2008.

**Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moundjian R et al.** *Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis.* J Neurosci 2007; 27:9032-42.

**Wu H, Zhao M, Yoshimura A, Chang C, Lu Q.** *Critical Link Between Epigenetics and Transcription Factors in the Induction of Autoimmunity: a Comprehensive Review.* Clin Rev Allergy Immunol 2016;11.

[www.allele-frequencies.net/test/default1.asp](http://www.allele-frequencies.net/test/default1.asp). Allele frequencies in worldwide populations.

**Xiao D, Ye X, Zhang N, Ou M, Guo C, Zhang B et al.** *A meta-analysis of interaction between Epstein-Barr virus and HLA-DRB1\*1501 on risk of multiple sclerosis.* Sci Rep 2015;5: 18083.

**Xu E, Xia X, Lu B, Xing X, Juany Q, Ma Y.** *Association of matrix metalloproteinase-2*

**Xu MQ, Cao HL, Wang WQ, Wang S, Cao XC, Yan F et al.** *Fecal microbiota transplantation broadening its application beyond intestinal disorders.* World J Gastroenterol 2015; 21: 102–11.

**Yanai K, Saito T, Hirota K, Kobayashi H, Murakami K, Fukamizu A.** *Molecular variation of the human angiotensinogen core promoter element located between the TATA box and transcription initiation site affects its transcriptional activity.* J Biol Chem 1997; 272: 30558–62.

**Yushchenko M, Mader M, Elitok E, Bitsch A, Dressel A, Tumani H et al.** *Interferon-beta-1b decreased matrixmetalloproteinase-9 serum levels in primary progressive multiple sclerosis.* J Neurol. 2003; 250: 1224-28.

**Zhang B, Ye S, Herrmann SM, Eriksson P, Maat M, Vand A.** *Functional polymorphism in the regulatory region of gelatinase B gene in relation to severity of coronary atherosclerosis.* Circulation 1999; 99: 1788-94.

**Zhou Y, Yu Ch, Miao X, Tan W, Liang G, Xiong P et al.** *Substantial reduction in risk of breast cancer associated with genetic polymorphisms in the promoters of the matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 genes.* Carcinogenesis 2004; 25: 399-404.

**Živković M, Djurić T, Dinčić E, Rajčević R, Alavantić D, Stanković A.** *Matrix metalloproteinase-9-1562C/T gene polymorphism in Serbian patients with multiple sclerosis.* J Neuroimmunol. 2007; 189: 147-50.

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

**Živković M, Stanković A, Dinčić E, Popović M, Popović S, Raicević R et al.** *The tag SNP for HLA-DRB1\*1501, rs3135388, is significantly associated with multiple sclerosis susceptibility: cost-effective high-throughput detection by real-time PCR.* Clin. Chim. Acta. 2009; 406: 27-30.

**Zoukos Y.** *Disease-modifying treatments: mode of action.* J Neurol 2004; 251: V/19-V/24.

**Zuvich RL, McCauley JL, Oksenberg JR, Sawcer SJ, De Jager PL; International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Aubin C, Cross AH, Piccio L, Aggarwal NT, Evans D, Hafler DA, et al.** *Genetic variation in the IL7RA/IL7 pathway increases multiple sclerosis susceptibility.* Hum Genet. 2010; 127:525-35.