

Tesis doctoral

2013

**Búsqueda de Biomarcadores Asociados
con la Respuesta al Tratamiento con
Interferón-beta en Pacientes con Esclerosis
Múltiple Remitente-Recurrente**

Manuel Comabella López

Servei de Neurologia-Neuroimmunologia. Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya (Cemcat). Institut de Recerca Vall d'Hebron (VHIR). Hospital Universitari Vall d'Hebron.

Programa Doctorat en Medicina. Departament de Medicina. Universitat Autònoma de Barcelona. Barcelona.

Búsqueda de Biomarcadores Asociados con
la Respuesta al Tratamiento con Interferón-
beta en Pacientes con Esclerosis Múltiple
Remitente-Recurrente

Manuel Comabella López

Director: Xavier Montalban Gairín



Tesi doctoral

Barcelona 2013

Cualquier persona que se ha visto seriamente comprometida en el trabajo científico de cualquier tipo se da cuenta de que en las puertas de entrada del templo de la ciencia están escritas las palabras: "debes tener fe". Es una virtud de la cual los científicos no pueden prescindir.

Max Planck

Agradecimientos

Mi primer y gran agradecimiento es para Xavier Montalban, director de tesis, y motor del grupo, por su continuo apoyo en el trabajo que hace posibles todos los proyectos que se llevan a cabo. Eres un referente para mí del trabajo bien hecho y de calidad, ejemplo de motivación y energía en tus objetivos, y personas como tú, con sus logros, permiten el avance de la ciencia. Por encima de todo, y más importante, te considero un gran amigo.

Mis agradecimientos también para Mar Tintoré, Jordi Ríó, Carlos Nos, y Jaume Sastre-Garriga, grandes neurólogos y compañeros de fatigas, con quienes mantengo una importante amistad ya forjada desde los inicios de mi residencia en Neurología.

Agradezco a todos y cada uno de los investigadores y técnicos del laboratorio, tanto los actualmente presentes como los que formaron parte del grupo en años anteriores. Su trabajo tanto individual como colectivo ha sido primordial para el desarrollo de los estudios que componen la tesis en su formato actual.

Agradezco a Marta Fernández y Sunny Malhotra, quienes han continuado de una forma brillante y productiva esta línea de investigación relacionada con la respuesta al tratamiento, y cuyo esfuerzo se traducirá prontamente en sendas tesis doctorales.

Agradezco también a las enfermeras María José Vicente y Rosalía Horno por su trabajo, no siempre tan visible pero igualmente importante, en las extracciones de sangre a personas candidatas. De forma similar, agradezco a Josep Graells y Dunia Muñoz, quienes permiten, por sus tareas, el progreso en el trabajo diario.

Mis agradecimientos también van para Roland Martin, por iniciarme en el fascinante mundo de las *omics*; Jan Lünemann, que llevó a cabo parte de los experimentos del estudio de transcriptómica; Lara Nonell, que analizó los datos de *microarrays* de expresión; y David Craig, que analizó los datos de *microarrays* de polimorfismos durante mi corta estancia en TGen, Phoenix.

Quiero expresar mis más afectuosos agradecimientos a padres, hermanos, tíos, y abuelos (por desgracia no presentes), porque de una forma u otra siempre me han apoyado y ayudado en mi desarrollo profesional. Algunos de ellos, tras años de incesante interrogatorio con la pregunta: ¿cuándo presentarás la tesis?, podrán felizmente exclamar: ¡por fin!

Y mis más cariñosos agradecimientos son para mi mujer, Cristina, y mi hija, Ariadna, quienes sufren de una forma más directa mi dedicación por el trabajo, en detrimento en muchas ocasiones de tiempo que podría estar con ellas. Pese a ello, siempre están a mi lado, me apoyan, y son sin duda el motor que genera inspiración y motivación en mi trabajo. ¡Os quiero!

Lista de abreviaciones

APC	Alofococianina
APC-Cy7	Alofococianina-cianina 7
ARNm	ARN mensajero
BHE	Barrera hemato-encefálica
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica
DPBS	Buffer salino fosfato
EDSS	Escala de discapacidad ampliada de Kurtzke
ELISA	Análisis de inmunoadsorción ligado a enzimas
EMRR	Esclerosis múltiple remitente-recurrente
EMPP	Esclerosis múltiple primariamente progresiva
EMSP	Esclerosis múltiple secundariamente progresiva
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC	Dispersión de luz frontal
GED	Genes expresados diferencialmente
GWAS	Estudio de asociación del genoma completo
HHV-6	Herpes virus 6 humano
HLA	Complejo mayor de histocompatibilidad
IC	Intervalo de confianza
IFN β	Interferón-beta
IFN γ	Interferón gamma
IFNAR1	Receptor 1 del interferón-beta
IFNAR2	Receptor 2 del interferón-beta
LPS	Lipopolisacárido
NABs	Anticuerpos neutralizantes contra el interferón-beta
OR	Odds ratio
PE	Ficoeritrina
PerCP	Peridinin clorofil proteína
PIAS1	Inhibidor proteico de STAT1
PMA	Acetato de forbol miristato
RAS	Señales relativas de los alelos
RM	Resonancia magnética

RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
SNC	Sistema nervioso central
SNP	Polimorfismo de un sólo nucleótido
SOCS1	Supresor de la señalización de citocinas 1
SOCS3	Supresor de la señalización de citocinas 3
SSC	Dispersión de luz lateral
STAT1	Transductor de señal y activador de la transcripción 1
TLR	Receptor de tipo Toll
VEB	Virus de Epstein Barr

Índice

1. Resumen.....	1
2. Abstract.....	2
3. Introducción general.....	3
3.1 ¿Qué es la esclerosis múltiple?.....	4
3.2 Etiología: factores genéticos y ambientales.....	4
3.3 Patogenia.....	7
3.4 Tratamiento de la esclerosis múltiple: el interferón-beta (IFN β).....	10
3.5 Respuesta al tratamiento con IFN β : marcadores clínicos.....	10
3.6 Respuesta al tratamiento con IFN β : marcadores biológicos.....	12
3.6.1 Biomarcadores inmunológicos.	12
3.6.2 Biomarcadores basados en expresión génica a gran escala.....	15
3.6.3 Biomarcadores genéticos ..	16
3.7 Nuevas metodologías en la búsqueda de biomarcadores.....	18
3.8 Justificación del estudio	19
4. Hipótesis.....	20
5. Objetivos.....	22
6. Métodos.....	24
6.1 Metodología relacionada con el Objetivo 1.....	26
6.2 Metodología relacionada con el Objetivo 2.....	27
6.3 Metodología relacionada con el Objetivo 3.....	39
7. Resultados.....	46
7.1 Resultados en relación con el Objetivo 1.....	47
7.2 Resultados en relación con el Objetivo 2.....	52
7.3 Resultados en relación con el Objetivo 3.....	80
8. Discusión general.....	88
8.1 HLA y respuesta al IFN β	89
8.2 Respuesta al IFN β y transcriptómica.....	90
8.3 Respuesta al IFN β y GWAS.....	94
9. Conclusiones.....	98
10. Comentario final.....	100
11. Bibliografía.....	102
12. Anexos.....	126

1. Resumen

El interferón-beta (IFN β) es un tratamiento parcialmente efectivo en pacientes con esclerosis múltiple remitente-recurrente (EMRR). Disminuye el número de brotes y reduce la actividad y carga lesional de la enfermedad medidas por resonancia magnética. Sin embargo, el coste del IFN β es elevado, el tratamiento tiene efectos secundarios y, sobretodo, existe una proporción relativamente importante de pacientes que no responden al mismo. En la actualidad, no disponemos de biomarcadores que se puedan asociar de forma fiable con la respuesta al IFN β . En este contexto, el objetivo principal de esta tesis doctoral es la identificación de biomarcadores moleculares de respuesta al tratamiento con IFN β en pacientes con EMRR. Mediante la aplicación de tecnologías denominadas “ómicas”, principalmente genómica y transcriptómica, se ha identificado un grupo de biomarcadores que presentan un denominador funcional común, su inducción predominante por los IFNs de tipo 1. De esta forma, las células de sangre periférica de pacientes con EMRR que no responden al tratamiento con IFN β se caracterizan por una huella de expresión génica formada por genes de inducción predominante o selectiva por los IFNs de tipo 1, que ya se encuentra presente antes del tratamiento con IFN β . También se observó que algunos polimorfismos de genes que pertenecen a la vía de los IFNs de tipo 1 fueron los que mejor discriminaron entre pacientes con buena y mala respuesta al IFN β . Los resultados de la presente tesis doctoral permiten concluir que la vía de los IFNs de tipo 1 se encuentra alterada en células de sangre periférica, posiblemente monocitos, de pacientes con mala respuesta al IFN β , y propone un conjunto de biomarcadores con potencial uso en la práctica clínica para predecir la respuesta al tratamiento con IFN β en el paciente con EM.

2. Abstract

Interferon-beta (IFN β) is a partially effective treatment for patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). IFN β has been shown to decrease clinical relapses and reduce brain magnetic resonance imaging activity. However, the cost of IFN β is significant, the drug is associated with a number of adverse reactions, and there is a relatively large proportion of patients who do not respond to therapy. At present, there is a lack of biomarkers reliably associated with the response to IFN β . In this context, the main objective of this doctoral thesis is the identification of IFN β -treatment response molecular biomarkers in patients with RRMS. By applying omic technologies, particularly genomics and transcriptomics, we identified a group of biomarkers that had in common their predominant induction by type 1 IFNs. In this way, peripheral blood cells from RRMS patients who will not respond to IFN β are characterized by a gene expression signature composed of genes predominantly or selectively induced by type 1 IFNs, which is already present before treatment with IFN β . Furthermore, some polymorphisms of genes belonging to the type 1 IFN pathway discriminated well between responders and non-responders to IFN β . The results from this doctoral thesis point to a dysregulation of the type 1 IFN pathway in peripheral blood cells, most likely monocytes, from patients who will show a lack of response to IFN β , and propose molecular biomarkers that may potentially be used in clinical practice to predict the response to IFN β in MS patients.

Introducción general

3. Introducción general

3.1 ¿Qué es la esclerosis múltiple?

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica y desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) de probable etiología autoinmune, que afecta principalmente a adultos jóvenes entre 20-40 años de edad, y constituye una causa importante de discapacidad de origen neurológico. Su incidencia es mayor en el sexo femenino, detectándose un hombre por cada dos mujeres afectadas. La prevalencia de la enfermedad en España es aproximadamente de 70-90 casos por 100.000 habitantes, y la incidencia oscila entre 4-6 casos por 100.000 habitantes y año (*Aladro y cols., 2005; Ares y cols., 2007; Otero-Romero y cols., 2013*). El coste socioeconómico derivado de la enfermedad es elevado, ocupando el segundo lugar tras los traumatismos para ese mismo rango de edades (*Naci y cols., 2010; Gustavsson y cols., 2011*). Clásicamente se describen tres formas clínicas de la EM: una forma remitente-recurrente (EMRR) que cursa con brotes, otra forma secundariamente progresiva (EMSP) que tras una fase de brotes cursa con progresión, y finalmente una forma primariamente progresiva (EMPP) que cursa con progresión desde el inicio de la enfermedad sin brotes acompañantes (*Lublin y Reingold, 1996*). Los pacientes que han tenido un único síntoma de la enfermedad, pero no se han diagnosticado todavía de EM, se definen clínicamente como síndromes clínicos aislados, y se considera que es la manifestación más temprana de la enfermedad. Las formas de EMRR y EMSP representan aproximadamente el 80-85% de los pacientes y las formas de EMSP evolucionan a partir de las formas RR.

3.2 Etiología: factores genéticos y ambientales

La etiología de la EM no se conoce bien, sin embargo, se asume que tanto un componente genético complejo como desencadenantes ambientales, como por ejemplo las infecciones virales, contribuyen a las manifestaciones de la enfermedad (*Sospedra y Martin, 2005*).

Factores genéticos

Estudios epidemiológicos y de agregación familiar sugieren que la predisposición a la EM está determinada genéticamente. La tasa de concordancia entre gemelos monozigotos es mayor que entre gemelos dizigotos (25-30% y 2-5% respectivamente), proporcionando una evidencia adicional del componente genético de la EM (*Dyment y cols., 2004; Oksenberg y Hauser, 2005*).

Desde hace tiempo se conoce que el principal *locus* asociado de forma consistente con la EM es el complejo mayor de histocompatibilidad (HLA). La mayor parte de los estudios del HLA en pacientes con EM se han llevado a cabo en población caucasiana descendiente de noreuropeos, en la cual la predisposición para la enfermedad se ha asociado con el haplotipo de clase II *HLA-DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02* (que corresponde a la designación molecular del haplotipo “DR2” definido serológicamente)(*Olerup y Hillert, 1991; Haines y cols., 1998*). La presencia de este haplotipo determina un riesgo relativo de casi 4 para el desarrollo de la EM, y además se observa un efecto dosis, de tal forma que los individuos homocigotos tienen mayor riesgo de EM y posiblemente un curso más agresivo de la enfermedad. Según las series estudiadas, se estima que el HLA contribuye entre un 10-50% al riesgo genético de la EM, indicando que posiblemente existan otros genes que expliquen el restante 50-90% del riesgo genético de desarrollar la enfermedad.

Durante muchos años, la búsqueda de genes candidatos de riesgo para la enfermedad fuera de la región del HLA resultó bastante infructuosa. No ha sido hasta recientemente que, merced al desarrollo de nuevas tecnologías de genotipado como los *microarrays* de polimorfismos de un sólo nucleótido (SNP), nuevos genes se han propuesto de forma consistente como sólidos candidatos para la susceptibilidad de la EM, aunque con un riesgo genético claramente inferior comparado con el HLA (medido por la *odds ratio*, que indica la fuerza de asociación). Algunos ejemplos de genes asociados recientemente con la enfermedad son *IL7R* (*interleukin 7 receptor*), *IL2RA* (*interleukin 2 receptor, alpha*), *CD6*, *CD58*, *CLEC16A* (*C-type lectin domain*

family 16, member A), *TNFRSF1A* (*tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1A*), e *IRF8* (*interferon regulatory factor 8*) (*Internacional MS Genetics Consortium, 2007; International MS Genetics Consortium 2008; International MS Genetics Consortium 2009; De Jager y cols., 2009*). Un estudio de asociación del genoma completo (GWAS) publicado recientemente (*Internacional MS Genetics Consortium, 2011*) en un elevado número de pacientes con EM y controles sanos permitió la identificación de 29 nuevas regiones genéticas asociadas con la EM y la confirmación de otras 23 regiones que se conocían previamente asociadas con la enfermedad. Es importante mencionar que la mayoría de los genes que se han encontrado asociados con la EM están relacionados con el sistema inmunitario, y muy pocos con el órgano diana de la enfermedad, el SNC, hallazgo que otorga al sistema inmunitario un papel primordial en el riesgo genético de la EM.

A modo de resumen, los estudios genéticos realizados hasta la actualidad permiten concluir que el componente genético de la EM es poligénico, en el cual encontramos varios genes, en un número indeterminado, que contribuyen con un riesgo diferente, habitualmente bajo ó moderado, en el desarrollo de la enfermedad. Además, la EM es una enfermedad multifactorial, es decir, se va a producir una interacción de este conjunto de genes con factores ambientales.

Factores ambientales

La exposición a agentes infecciosos durante la infancia y/ó adolescencia se ha considerado un factor de riesgo importante para el desarrollo de la EM (*Giovannoni y Ebers, 2007*). Durante las últimas décadas, se ha postulado que diferentes agentes patógenos como los retrovirus, herpesvirus (virus de Epstein Barr – VEB y el virus del herpes humano tipo 6 – HHV-6), coronavirus, y bacterias como *Clamydia pneumoniae*, podrían constituir un factor etiológico importante en la patogenia de la enfermedad (*Giovannoni y cols., 2006; Christensen, 2007; Ascherio y Munger, 2007*). Las evidencias de un agente infeccioso en la etiología de la EM proceden de estudios epidemiológicos observando el patrón geográfico de distribución de la enfermedad; estudios serológicos que muestran un incremento del título de

anticuerpos en suero y líquido cefalorraquídeo contra diferentes agentes infecciosos; estudios patológicos demostrando, en algunos casos, la presencia del genoma viral en el SNC; estudios en modelos animales, como la desmielinización que se observa en el SNC tras la inoculación intracerebral del virus de Theiler; y finalmente de la observación clínica de que hasta un 25% de los brotes de la enfermedad se preceden de infecciones víricas de las vías respiratorias superiores.

Uno de los agentes infecciosos de mayor peso en la etiología de la enfermedad es la infección por el VEB (revisado en *Kakalacheva y Comabella, 2010*), en base a: (i) las similitudes epidemiológicas existentes entre la EM y la mononucleosis infecciosa; (ii) la elevada y casi universal seropositividad para el virus que se observa en los pacientes con EM; (iii) el riesgo aumentado de desarrollar EM en individuos con antecedentes de mononucleosis infecciosa comparado con individuos que adquirieron el VEB de forma asintomática (*Warner and Carp, 1981; Ascherio y cols., 2001; Thacker y cols., 2006*).

Entre los factores ambientales no infecciosos, destacar el efecto protector de la vitamina D en la enfermedad, donde los niveles séricos de 25-hidroxivitamina D determinados en adultos sanos constituyen un predictor importante del riesgo de desarrollar EM (*Munger y cols., 2006*). Finalmente, otro agente ambiental no infeccioso que está surgiendo como factor de riesgo importante en la susceptibilidad para la EM es el tabaco (*Handel y cols., 2011*).

3.3 Patogenia

En la EM se pueden diferenciar varios eventos patogénicos que conducirán finalmente al proceso inflamatorio y de desmielinización característico de la enfermedad (revisado en *Comabella y Khoury, 2011*):

Los sujetos con susceptibilidad genética para la EM presentan células T autorreactivas en sangre periférica con especificidad para antígenos presentes en el SNC como la proteína mielínica básica, la proteína

proteolipídica, y la glicoproteína mielínica de los oligodendrocitos. En algún momento de la enfermedad, estas células T autorreactivas se activarán en la periferia por diferentes mecanismos (*Wucherpfennig y Strominger, 1995; Furtado y cols., 2008; Münz y cols., 2009*), y producirán citocinas proinflamatorias tales como el TNF- α , IL-1 β e IL-6 que activarán las células endoteliales, las cuales aumentarán la expresión de moléculas de adhesión y mediarán la extravasación de las células inflamatorias de sangre periférica hacia el SNC.

En el paso de los leucocitos de sangre periférica a través de la barrera hemato-encefálica (BHE), moléculas tales como las selectinas, integrinas, y quimiocinas jugarán un papel importante. El primer contacto, de baja afinidad y disociación rápida, entre los leucocitos de sangre periférica y las células endoteliales de la BHE está mediado por moléculas de adhesión de la familia de las selectinas. La unión fuerte y transmigración de los leucocitos a través del endotelio está mediado por moléculas de adhesión de la familia de las integrinas (*Archelos y cols., 1999; Greenwood y cols., 2011*). Otras moléculas que también favorecerán la migración de leucocitos hacia el interior del SNC son las metaloproteasas de la matriz extracelular (*Lee y cols., 1999; Waubant y cols., 1999*) y las quimiocinas y sus receptores (*Baggiolini, 1998; Holman y cols., 2011*).

En el interior del SNC, las células T autorreactivas reconocerán de nuevo el antígeno que las activó al principio, e iniciarán una respuesta inflamatoria mediada por un amplio espectro de citocinas y quimiocinas de tipo Th1, que por una parte inducirán la activación de otras células T, macrófagos, y células B, y por otra parte permitirán un segundo reclutamiento de células inflamatorias desde la periferia hacia el SNC, facilitado por la ruptura de la BHE. Los macrófagos y las células T activadas liberarán mediadores citotóxicos, como el TNF- α , el óxido nítrico, y los radicales de oxígeno, que dañarán la vaina de mielina. Las células B se diferenciarán en células plasmáticas y secretarán anticuerpos desmielinizantes, contribuyendo en el proceso de desmielinización con o sin mediación del complemento (*Hemmer y cols., 2002; O'Connor y cols., 2005; Bar-Or, 2008*).

Además de las células T CD4+ de fenotipo Th1 productoras de citocinas proinflamatorias como el IFN γ , otros tipos celulares como las células T CD8+ también participarán activamente en la respuesta inflamatoria que se produce en la EM. Su importancia radica principalmente en el mayor número de células CD8+ que se observa en los infiltrados inflamatorios del SNC en comparación con las células T CD4+ (*Babbe y cols., 2000*), y en la mayor correlación existente entre daño axonal y número de linfocitos T CD8+ que infiltran las lesiones (*Bitsch y cols., 2000*). Otra subpoblación celular a tener en cuenta, por su reciente caracterización e implicación en la EM, son las células Th17 productoras de IL-17 y con fenotipo altamente proinflamatorio diferente de las células Th1 (*Langrish y cols., 2002; Bettelli y cols., 2007; Brucklacher-Waldert y cols., 2009*).

Finalmente, otros dos procesos importantes que tienen lugar en la patogenia de la enfermedad son el daño axonal y la remielinización. La pérdida axonal es el principal determinante de la discapacidad neurológica progresiva que presentan los pacientes con EM (*Trapp, y cols., 1998*); puede observarse independientemente de la desmielinización activa; está presente en las fases precoces de la enfermedad; y se observa también en la sustancia blanca de apariencia normal. En las lesiones de EM también se produce remielinización a través de los progenitores endógenos de los oligodendrocitos, y está mediada por citocinas y factores favorecedores del crecimiento liberados por la microglía y astrocitos reactivos como parte del proceso inflamatorio agudo. En muchos casos, la remielinización va a permitir que los axones desmielinizados recuperen su capacidad de conducir potenciales de acción (*Murray y cols., 2001*).

3.4 Tratamiento de la esclerosis múltiple: el interferón-beta (IFN β)

La historia natural de la enfermedad demuestra que un porcentaje elevado de pacientes con EM desarrollará una importante discapacidad neurológica en los años posteriores al diagnóstico (*Weinshenker y cols., 1989*). Actualmente hay disponibilidad de tratamientos que son capaces de cambiar, al menos a corto plazo, la historia natural de la enfermedad. El IFN β fue el primer fármaco inmunomodulador aprobado en nuestro país para el tratamiento de la EM, y es hoy día el más utilizado para el tratamiento de la EM. El IFN β es efectivo en la enfermedad, y varios estudios han demostrado que el tratamiento disminuye la tasa anual de brotes en aproximadamente un 30%, y reduce la actividad y la carga lesional de la enfermedad medidas por resonancia magnética (RM) (*The IFNB Multiple Sclerosis Study Group, 1993; Jacobs y cols., 1996; PRISMS Study Group, 1998*). Aunque no tan claro, el tratamiento con IFN β también podría tener un efecto beneficioso sobre la progresión de la discapacidad neurológica. Hay 3 formulaciones diferentes de IFN β aprobadas en España para el tratamiento de la EMRR activa: IFN β -1b subcutáneo, IFN β -1a subcutáneo, e IFN β -1a intramuscular.

A pesar de que el IFN β se empleó en un principio en la EM por sus propiedades antivirales, hoy día no se conoce con exactitud su mecanismo de acción, aunque se postula que el fármaco podría actuar a través de la inhibición en la proliferación de linfocitos T; la alteración en el balance entre citocinas proinflamatorias y antiinflamatorias; y la reducción en la trans migración de leucocitos de sangre periférica hacia el SNC mediante la disminución en la expresión de moléculas de adhesión y metaloproteasas de la matriz extracelular (revisado en *Dhib-Jalbut y Marks, 2010*).

3.5 Respuesta al tratamiento con IFN β : marcadores clínicos

Aunque el tratamiento con IFN β es beneficioso para el paciente con EM, su eficacia es parcial, y además existe un porcentaje no despreciable de pacientes que presentarán respuestas no óptimas al tratamiento.

Existen datos en la literatura que demuestran que alrededor de un 20% de los pacientes que inician tratamiento con IFN β presentarán una mala respuesta al mismo, evidencia que implica un incremento progresivo de la discapacidad en el transcurso de 2 a 4 años de tratamiento (*Río y cols., 2002*). Una proporción importante de estos pacientes presentará un grado de discapacidad que se traducirá en dificultades marcadas para la deambulaci3n. Los datos de estudios de historia natural demuestran que el 3nico factor cl3nico predictor de discapacidad a largo plazo es el estado de discapacidad basal (*Weinshenker y cols., 1991*).

En un estudio realizado por *Río y cols. (2002)* empleando medidas 3nicamente cl3nicas, los autores demostraron que es posible identificar con elevada sensibilidad y especificidad los pacientes que tras 2 a3os de tratamiento con IFN β presentarán una importante discapacidad tras 4 a3os de seguimiento. Dichas medidas cl3nicas est3n basadas en la confirmaci3n de la progresi3n de la discapacidad (evaluada como un incremento de puntuaci3n en la escala de discapacidad ampliada de Kurtzke - EDSS) en un periodo de tiempo igual o superior a 6 meses. En un estudio posterior por los mismos autores (*Río y cols., 2006*), se analizaron diferentes criterios de respuesta cl3nica basados en variables cl3nicas como presencia de brotes y/o progresi3n de la discapacidad. El analisis incluy3 10 definiciones de respuesta diferentes que se confirmaron tras 6 a3os de seguimiento. De nuevo se corrobor3 que las definiciones que incluyeron la progresi3n de la discapacidad neurol3gica como variable fueron las que presentaron mayor rendimiento diagn3stico para detectar los pacientes con mala respuesta al tratamiento con IFN β . Es importante destacar que una de las definiciones de respuesta que present3 mejores 3ndices de sensibilidad, especificidad, valores predictivos positivos y negativos, y exactitud diagn3stica fue la que incluy3 como criterios las dos variables, progresi3n de la discapacidad neurol3gica y presencia de brotes (*Río y cols., 2006*).

Es relevante mencionar que la actividad radiol3gica observada durante el tratamiento es un par3metro que se est3 empleando cada vez m3s, de forma aislada o en combinaci3n con los criterios cl3nicos, para evaluar la respuesta al tratamiento con IFN β (revisado en *Río, Comabella, y Montalban,*

2010). En un estudio por *Río y cols.* (2009), se observó que la combinación de medidas de actividad de la enfermedad (presencia o ausencia de brotes / progresión o no progresión de la discapacidad / presencia o ausencia de nuevas lesiones activas en la RM) evaluadas durante el primer año de tratamiento tienen valor pronóstico, y permiten identificar los pacientes que presentarán mayor actividad de la enfermedad en el segundo y tercer años de tratamiento con IFN β .

3.6 Respuesta al tratamiento con IFN β : marcadores biológicos

Diversos estudios han perseguido la identificación de biomarcadores moleculares asociados con la respuesta al tratamiento con IFN β . Según su naturaleza, los biomarcadores moleculares se pueden clasificar en tres grandes grupos: inmunológicos, basados en expresión génica, y genéticos. Los principales estudios publicados son los siguientes:

3.6.1 Biomarcadores inmunológicos

Anticuerpos neutralizantes (NABs) y respuesta al IFN β

Al igual que sucede con otras proteínas, el uso continuado de tratamientos con citocinas recombinantes humanas tales como el IFN β puede inducir la síntesis de anticuerpos con posibles efectos neutralizantes (NABs). Numerosos estudios han demostrado que la presencia de anticuerpos neutralizantes causa una reducción en la biodisponibilidad del IFN β , evidenciada mediante una disminución en los niveles de marcadores de bioactividad del IFN β tales como la proteína MxA, como ejemplo de marcador de bioactividad más empleado (*Pachner y cols.*, 2003; *Deisenhammer y cols.*, 2004). A pesar de las discrepancias existentes en la literatura sobre la relación NABs y respuesta al tratamiento con IFN β , parece claro que la presencia y persistencia de títulos elevados de NABs (por encima de 100 unidades neutralizantes) se asocia con una reducción en la eficacia del IFN β en los pacientes tratados (*Malucchi y cols.*, 2004; *Sorensen y cols.*, 2005; *Sorensen y cols.*, 2006; *Polman y cols.*, 2010).

Marcadores de bioactividad del IFN β

Tal y como se ha comentado anteriormente, la proteína MxA es el marcador de bioactividad del IFN β más estudiado por su inducción específica por los IFNs de tipo 1, aunque dicho marcador no ha estado exento de críticas por su falta de relación con la respuesta al IFN β . Se han propuesto otros marcadores de bioactividad del IFN β como *TRAIL* ó *XAF-1* (Gilli y cols., 2006), e *IFI6*, *IFI27*, *IFI44L*, *IFIT1*, *HERC5*, *LY6E*, *RSAD2*, *SIGLEC1*, y *USP18* (Malhotra y cols., 2011). En un estudio reciente, *USP18* se asoció con la respuesta al IFN β (Malhotra y cols., 2013).

Otros estudios

Petereit y cols. (2002) investigaron los niveles de IFN γ antes de iniciar tratamiento con IFN β y observaron que la presencia de niveles basales bajos de IFN γ se asoció con una buena respuesta al IFN β evaluada a los 2 años de tratamiento.

Killestein y cols. (2002) analizaron las respuestas proliferativas de células T frente a diferentes estímulos y observaron que la presencia de una respuesta proliferativa elevada frente al mitógeno fitohemaglutinina (PHA) antes de iniciar tratamiento con IFN β se asoció con una buena respuesta al mismo.

Wandinger y cols. (2003) propusieron TRAIL como marcador pronóstico de la respuesta al tratamiento con IFN β . Los pacientes que tuvieron una buena respuesta al tratamiento con IFN β se caracterizaron por una inducción temprana y mantenida en la expresión de TRAIL medida por PCR a tiempo real, que no se observó en los pacientes con mala respuesta. Además, los niveles de TRAIL soluble detectados por ELISA en el suero de los pacientes antes de iniciar el tratamiento predecían la respuesta al tratamiento durante el primer año.

Fainardi y cols. (2004) determinaron por ELISA los niveles en suero de moléculas del HLA de clase I solubles en pacientes con EMRR tratados con IFN β , y observaron que durante los 3 primeros meses de tratamiento los niveles de HLA soluble fueron superiores en los pacientes que presentaron una buena respuesta al IFN β .

Soilu-Hanninen y cols. (2004) midieron la expresión mediante citometría de flujo y los niveles séricos por ELISA de un panel de moléculas de adhesión en células T de pacientes tratados con IFN β durante 4 años. Estos autores observaron que los pacientes que presentaron una buena respuesta al tratamiento tuvieron una menor expresión de VLA-4 y unos niveles de VCAM-1 superiores a lo largo del tratamiento.

Graber y cols. (2007) observaron que los niveles séricos de IL-10 determinados por ELISA disminuyeron en los pacientes que presentaron una mala respuesta al IFN β , mientras que no sufrieron cambios en los pacientes que tuvieron una buena respuesta al tratamiento.

Minagar y cols. (2007) estudiaron la relación entre los niveles en saliva de moléculas del HLA de clase II solubles y la respuesta al IFN β , y observaron que el incremento en los niveles de moléculas del HLA solubles inducidos por el IFN β se asociaron con un curso clínico estable y un menor número de lesiones captadoras de contraste en la RM.

Comabella y cols. (2009) determinaron mediante ELISA los niveles de un panel de metaloproteasas de la matriz extracelular y sus inhibidores a lo largo del tratamiento con IFN β , y observaron que los pacientes respondedores presentaron un incremento temprano y mantenido en los niveles séricos del inhibidor TIMP-1 comparado con los no respondedores.

Axtell y cols. (2010) observaron que un subgrupo de pacientes con mala respuesta al IFN β se caracterizó por presentar a tiempo basal niveles en suero de IL-17F e IFN β endógeno aumentados respecto a los pacientes con buena respuesta. Sin embargo, estos hallazgos no se replicaron en un estudio posterior con un mayor número de pacientes (*Bushnell y cols.*, 2012; *Hartung y cols.*, 2013).

Bosca y cols. (2010) determinaron las bandas oligoclonales IgM en pacientes tratados con IFN β y observaron que el tiempo al primer brote tras iniciar tratamiento fue menor en pacientes con bandas oligoclonales IgM lípido-específicas positivas.

Martínez-Rodríguez y cols. (2011) encontraron que la expansión de la población de células NK CD56bright fue superior en los pacientes que presentaron una respuesta clínica positiva al IFN β .

Domínguez-Mozo y cols. (2012) observaron que el incremento en los niveles de expresión del transactivador del HLA de clase II (*MHC2TA*) se asoció con una buena respuesta clínica al IFN β .

3.6.2. Biomarcadores basados en expresión génica a gran escala

Sturzebecher y cols. (2003) analizaron el perfil de expresión génica mediante tecnología de *microarrays* en pacientes tratados con IFN β . En los pacientes que tuvieron una buena respuesta al tratamiento se observó una marcada reducción en la expresión de IL-8. Los pacientes con mala respuesta al tratamiento presentaron una falta de inhibición de IL-8 inducida por el IFN β .

Baranzini y cols. (2005) determinaron la expresión de 70 genes con funciones en la regulación del IFN β y en el proceso de apoptosis mediante PCR a tiempo real en 52 pacientes tratados con IFN β . Se analizaron todas las combinaciones posibles de 3 genes (54.740 combinaciones) con la finalidad de encontrar el triplete de genes que a tiempo basal predecía con mayor exactitud la respuesta tras dos años de tratamiento. Se encontraron 9 tripletes de genes que predecían la respuesta al IFN β con más del 86% de exactitud. La mejor combinación de genes estaba formada por genes relacionados con el proceso de apoptosis (*CASP2*, *CASP10*, y *FLIP*).

van Baarsen y cols. (2008), empleando la tecnología de *microarrays* de expresión génica, encontraron una correlación inversa entre la expresión antes del tratamiento de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 y las respuestas farmacológicas a los 3 y 6 meses de tratamiento con IFN β (cuanto mayor era la expresión basal de estos genes, menor era el grado de inducción en su expresión por los IFNs de tipo 1).

Rudick y cols. (2011) emplearon *macroarrays* a medida conteniendo genes inducidos por los IFNs de tipo 1 y observaron respuestas exageradas en los no respondedores a las 12 horas de la administración intramuscular de IFN β -1a.

3.6.3. Biomarcadores genéticos

HLA y respuesta al IFN β

Varios estudios tuvieron por objetivo investigar una posible asociación entre alelos del HLA de clase II y la respuesta al IFN β . En este contexto, *Fusco y cols.* (2001) observaron una falta de asociación entre el alelo *HLA-DRB1*15:01* y la respuesta al IFN β en una cohorte de 22 respondedores y 17 no respondedores al tratamiento. En otro estudio, *Villoslada y cols.* (2002) analizaron la distribución del haplotipo *HLA-DR2* en una cohorte de 77 respondedores y 57 no respondedores al IFN β , no encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los dos grupos. Finalmente, *Fernández y cols.* (2005) investigaron el efecto de los alelos de clase II *-DRB1*, *-DQA1*, y *-DQB1* en 66 respondedores y 30 no respondedores al IFN β , no observándose ninguna asociación significativa con la respuesta al tratamiento.

Estudios de genes candidatos

Sriram y cols. (2003) no encontraron asociación entre variantes alélicas de los genes de los receptores 1 y 2 del IFN (*IFNAR1* e *IFNAR2*) y la respuesta al tratamiento con IFN β .

Leyva y cols. (2005), en un estudio similar, no observaron asociación entre polimorfismos localizados en los genes que codifican los receptores *IFNAR1* e *IFNAR2* y la respuesta al tratamiento.

Cunningham y cols. (2005) encontraron asociaciones significativas entre la respuesta al IFN β y polimorfismos localizados en los siguientes genes: *IFNAR1* (dinucleótido de repetición *GT* localizado en el promotor), *CTSS* (rs1136774), *PSMB8* (rs2071543), y *MX1* (rs2071430, rs17000900).

Wergeland y cols. (2005) estudiaron el gen de la *IL-10* con 3 polimorfismos (rs1800896, rs1800871, rs1800872) y aunque no encontraron asociación con la actividad clínica de la enfermedad, sí observaron que los portadores de algunos haplotipos del gen presentaron menor actividad radiológica en la RM.

Martínez y cols. (2006) encontraron asociación de un dinucleótido de repetición *CA* localizado en el primer intrón del gen del *IFN γ* con la respuesta al IFN β .

O'Doherty y cols. (2009) observaron que combinaciones de variantes alélicas pertenecientes a los genes *JAK2*, *IL-10*, *IL10RB*, *GBP1*, *PIAS1*, *CASP3* diferían de forma significativa entre respondedores y no respondedores al IFN β .

Vandenbroeck y cols. (2011) genotiparon 2 polimorfismos del gen *IRF5* asociados con la susceptibilidad para la EM (rs4728142, rs3807306), y evaluaron su efecto en la respuesta al IFN β en dos cohortes independientes de pacientes. Aunque los resultados no fueron estadísticamente significativos, sí se observó una mayor frecuencia del alelo de riesgo T del SNP rs3807306 en la población de pacientes con buena respuesta al IFN β .

Vosslamber y cols. (2011) también investigaron el gen *IRF5* como candidato en la respuesta al IFN β . Los pacientes homocigotos TT y AA para los SNPs rs2004640 y rs4728142 se asociaron con una respuesta farmacológica al IFN β deficiente comparado con los portadores del alelo G. Los homocigotos TT presentaron un mayor número de lesiones en T2 en la RM. El genotipo TT del SNP rs2004640 se asoció con un tiempo al primer brote menor tras tratamiento en una cohorte independiente.

Malhotra y cols. (2011) no encontraron asociación entre polimorfismos del gen *IL28B* (rs8099917, rs12979860) y la respuesta al IFN β en 588 pacientes con EM clasificados en respondedores (n=281) y no respondedores (n=307) tras 2 años de tratamiento con IFN β .

Kulakova y cols. (2012) observaron que las combinaciones alélicas de diferentes genes relacionados con el sistema inmunitario (*TGFB1*, *CCR5*, *IFNAR1*, *IFNG*, *IFNB1*) se asociaron con respuestas óptimas al tratamiento con IFN β .

López-Gómez y cols. (2013) encontraron una asociación entre un polimorfismo del gen que codifica el receptor 1 de TRAIL (*TRAILR1*; rs20576) y la respuesta al IFN β .

Estudios de tipo GWAS

Byun y cols. (2008) llevaron a cabo el primer GWAS en relación con la respuesta al IFN β en *pools* de ADN de pacientes clasificados en respondedores y no respondedores tras dos años de tratamiento. Los autores emplearon los *microarrays* de SNPs para identificar en los *pools* variantes

alélicas asociadas con la respuesta al IFN β . Los polimorfismos que presentaron una mayor asociación con la respuesta al IFN β se encontraron localizados en los siguientes genes: *HAPLN1* (rs4466137), *GPC5* (rs10492503, rs9301789), *COL25A1* (rs794143), *NPAS3* (rs4128599), *ERC2* (rs10510779), *FAM19A1* (rs4855469), *LOC442331* (rs6944054). Es importante subrayar que en este estudio, el análisis de vías celulares mostró que, entre los SNPs que mejor discriminaron entre respondedores y no respondedores, existía una representación elevada de genes que codificaban receptores de neurotransmisores como el glutamato o el GABA, hallazgo que sugería una interesante y a la vez sorprendente relación entre excitabilidad neuronal y respuesta al IFN β . También es relevante mencionar que uno de los genes candidatos propuestos en este estudio, *GPC5* (rs10492503), se validó recientemente en un estudio independiente por otro grupo (*Cénit y cols.*, 2009).

3.7 Nuevas metodologías en la búsqueda de biomarcadores

Los últimos años han vivido el desarrollo de metodologías que permiten la identificación, de forma no sesgada (*hipótesis free*), de marcadores biológicos implicados en los procesos patológicos (*Comabella y Racke, 2012*). Dichas metodologías se denominan “ómicas” (del inglés *omics*) y reciben diferentes nombres según estudien el ADN (genómica), ARN (transcriptómica), proteínas (proteómica), ó las respuestas celulares (metabolómica y citómica). En cada una de estas “ómicas” se van a emplear diferentes tecnologías para la identificación de biomarcadores, algunas de las cuales ya fueron mencionadas en las secciones previas de esta introducción. A modo de ejemplo, los *microarrays* de polimorfismos o SNPs se utilizarán para caracterizar el componente genético de las enfermedades; los *microarrays* de expresión se emplearán para investigar los perfiles de expresión génica presentes en muestras biológicas; y la espectrometría de masas se usará para identificar proteínas diferencialmente expresadas en las diferentes condiciones de estudio.

Entre sus muchas aplicaciones, dichas tecnologías también van a poder emplearse para la identificación de biomarcadores asociados con la

respuesta a los tratamientos. Este es el campo de la farmacogenómica, que podría definirse como la aplicación de tecnologías del tipo de las “ómicas” para predecir la respuesta del paciente o los efectos adversos a fármacos, con el objetivo último de facilitar el tratamiento personalizado del paciente con EM (Comabella y Montalban, 2009; Comabella y Montalban, 2012).

3.8 Justificación del estudio

El escenario de tratamiento de la EM ha cambiado ostensiblemente en los últimos años, y actualmente el neurólogo dispone de diferentes opciones terapéuticas para tratar el paciente con EM. Sin embargo, el riesgo potencial de falta de respuesta o de efectos adversos asociados con los tratamientos hace necesario la individualización del tratamiento en la EM. Será importante administrar a cada paciente el tratamiento al cual va a responder y frente al cual no va a tener efectos adversos.

En este contexto, el presente estudio persigue la identificación de biomarcadores asociados con la respuesta al fármaco más empleado para el tratamiento de la EMRR, el IFN β . Los criterios actuales de respuesta al IFN β requieren de un mínimo de 1 ó 2 años de tratamiento para identificar los pacientes que presentarán una mala respuesta al mismo, tiempo excesivamente largo si tenemos en cuenta que, tal y como se ha comentado anteriormente, estos pacientes podrían beneficiarse de otras alternativas terapéuticas para su enfermedad. Por este motivo, será importante encontrar biomarcadores de respuesta al IFN β que permitan identificar los pacientes que no responderán al tratamiento, bien en las fases iniciales del tratamiento o antes de que el paciente comience el IFN β .

A pesar de todos los biomarcadores de respuesta al IFN β propuestos en los diferentes estudios y resumidos brevemente en la sección 3.6, se puede concluir que a fecha de hoy no existe ningún biomarcador que se asocie de forma fiable con la respuesta al tratamiento con IFN β .

El estudio empleará en gran parte la tecnología de los *microarrays* para identificar biomarcadores de respuesta en pacientes tratados con IFN β y clasificados en respondedores y no respondedores tras 2 de tratamiento en base a criterios clínicos de respuesta estrictos.

Hipótesis

4. Hipótesis

Las hipótesis conceptuales del presente estudio son las siguientes:

- Determinados alelos del HLA de clase I y II influyen en la respuesta al IFN β en pacientes con EM.
- El perfil de expresión génica presente en las células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de los pacientes con EM antes de iniciar tratamiento con IFN β , o en los primeros meses del mismo, permitirá por una parte diferenciar entre pacientes que presentarán una buena y mala respuesta al IFN β , y por otra parte predecir la respuesta que tendrán los pacientes tras 2 años de tratamiento.
- Los *microarrays* de SNPs permitirán identificar variantes alélicas asociadas con la respuesta al IFN β y pertenecientes a vías celulares funcionalmente relacionadas con los genes expresados diferencialmente.

Objetivos

5. Objetivos

Objetivo 1:

Estudiar la relación entre genes del HLA de clase I y clase II y la respuesta al tratamiento con IFN β .

Objetivo 2:

Identificar genes expresados diferencialmente asociados con la respuesta al tratamiento con IFN β mediante *microarrays* de expresión génica.

Objetivo 3:

Identificar variantes alélicas asociadas con la respuesta al tratamiento con IFN β mediante *microarrays* de SNPs.

Métodos

6. Métodos

Cada uno de los tres objetivos expuestos en la sección 5 de la tesis corresponde a estudios diferentes. Sin embargo, podemos diferenciar una parte común de métodos y otra parte de metodología más específica de cada estudio.

La parte de métodos común a los tres estudios incluye el diseño y los criterios de respuesta al IFN β empleados para identificar pacientes con buena y mala respuesta al tratamiento:

Diseño y evaluación clínica

Se trata de estudios prospectivos de pacientes con EMRR que recibieron tratamiento con IFN β en la Unitat de Neuroimmunología Clínica. Los pacientes formaron parte de un protocolo de seguimiento en el que se recogieron datos clínicos basales (antes del tratamiento) y longitudinales (durante el tratamiento), incluyendo el número de brotes y las puntuaciones en el EDSS. Los estudios se aprobaron por el Comité Ético del Hospital y todos los pacientes dieron su consentimiento informado.

Definición de la respuesta al tratamiento con IFN β

Los criterios clínicos de respuesta al IFN β se aplicaron tras dos años de tratamiento:

- Los pacientes se clasificaron en “respondedores” cuando no se observó incremento en la puntuación del EDSS ni presencia de brotes durante los 2 años de seguimiento.
- Los pacientes se clasificaron en “no respondedores” cuando experimentaron uno o más brotes y un incremento de al menos 1 punto en la puntuación del EDSS confirmado en 2 visitas consecutivas separadas por un intervalo de 6 meses.

Estos criterios estrictos de respuesta se aplicaron para discriminar bien entre respondedores y no respondedores al tratamiento. Los pacientes con fenotipos intermedios de respuesta, por ejemplo, (i) presencia de brotes sin incremento en el EDSS o con incrementos inferiores a un punto, ó (ii)

ausencia de brotes pero con incremento en el EDSS, no se incluyeron en el estudio.

6.1 Metodología relacionada con el Objetivo 1

“Estudiar la relación entre genes del HLA de clase I y clase II y la respuesta al tratamiento con IFN β ”

Pacientes

En el estudio se incluyeron 149 pacientes con EMRR, de los cuales 74 se clasificaron como respondedores y 75 como no respondedores en base a los criterios de clasificación mencionados en el apartado anterior. Las características demográficas y clínicas basales de los pacientes del estudio figuran en la tabla siguiente:

Tabla 1

Características	Respondedores	No respondedores
n (%)	74 (49,7)	75 (50,3)
Edad (años)	32,0 (7,5)	32,3 (9,3)
Mujer/hombre (% mujeres)	52 / 22 (70,3)	58 / 17 (77,3)
Duración de la enfermedad (años)	5,9 (5,7)	5,6 (5,1)
EDSS ^a	2,0 (1,5-3,5)	2,5 (1,5-2,5)
Número de brotes en los dos años previos	2,9 (1,0)	2,8 (2,0)
Tipo de IFN β administrado [n (%)]		
IFN β 1a IM	22 (29,7)	26 (34,7)
IFN β 1b SC	33 (44,6)	27 (36,0)
IFN β 1a SC	19 (25,7)	22 (29,3)

Leyenda. Datos expresados como valores medios (desviación estándar). ^aDatos expresados como mediana (rango intercuartil). EDSS: escala de estado de la discapacidad ampliada. IFN β : interferón-beta. IM: intramuscular. SC: subcutáneo.

Genotipado del HLA de clase I y clase II

El ADN genómico de los pacientes se obtuvo a partir de muestras de sangre periférica mediante métodos estándar. El genotipado del HLA de clase I para los genes *HLA-A*, *-B*, y *-C*, y del HLA de clase II para los genes *HLA-DRB1*, *-DQA1*, y *-DQB1* se realizó mediante PCR seguida de hibridización por oligonucleótidos específicos de secuencia (PCR-SSO) según las recomendaciones del fabricante (Tepnel Lifecodes Corp, Stamford, CT USA).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el paquete estadístico SPSS 15.0 (SPSS Inc, Chicago, IL) para MS-Windows. Las diferencias en las frecuencias alélicas para el *HLA-A*, *-B*, *-C*, *-DRB1*, *-DQA1* y *-DQB1* entre respondedores y no respondedores al IFN β se compararon mediante la prueba exacta de Fisher. Los valores de $p < 0,05$ se consideraron estadísticamente significativos.

6.2 Metodología relacionada con el Objetivo 2

“Identificar genes expresados diferencialmente asociados con la respuesta al tratamiento con IFN β mediante microarrays de expresión génica”

Pacientes – cohorte original

Se incluyeron en el estudio 47 pacientes con EMRR, de los cuales 29 pacientes (61,7%) se clasificaron como respondedores y 18 pacientes (38,3%) como no respondedores tras dos años de tratamiento (Tabla 2). Ninguno de estos pacientes recibió tratamiento con IFN β ó fármacos inmunosupresores antes del estudio. Tampoco, ninguno de los pacientes presentó brotes o recibió tratamiento con corticosteroides en el mes previo a su entrada en el estudio.

Tabla 2

Características	Respondedores	No respondedores
n (%)	29 (61,7)	18 (38,3)
Edad (años)	34,1 (5,9)	35,1 (9,0)
Mujer/hombre (% mujeres)	20 / 9 (69,0)	13 / 5 (72,2)
Duración de la enfermedad (años)	6,0 (5,9)	6,4 (4,8)
EDSS ^a	2,0 (1,3-2,8)	2,5 (1,9-3,0)
Número de brotes en los dos años previos	2,6 (1,2)	2,9 (1,7)
Tipo de IFN β administrado [n (%)]		
IFN β 1a IM	10 (34,5)	6 (33,3)
IFN β 1b SC	10 (34,5)	6 (33,3)
IFN β 1a SC	9 (31,0)	6 (33,3)

Leyenda. Datos expresados como valores medios (desviación estándar). ^aDatos expresados como mediana (rango intercuartil). EDSS: escala de estado de la discapacidad ampliada. IFN β : interferón-beta. IM: intramuscular. SC: subcutáneo.

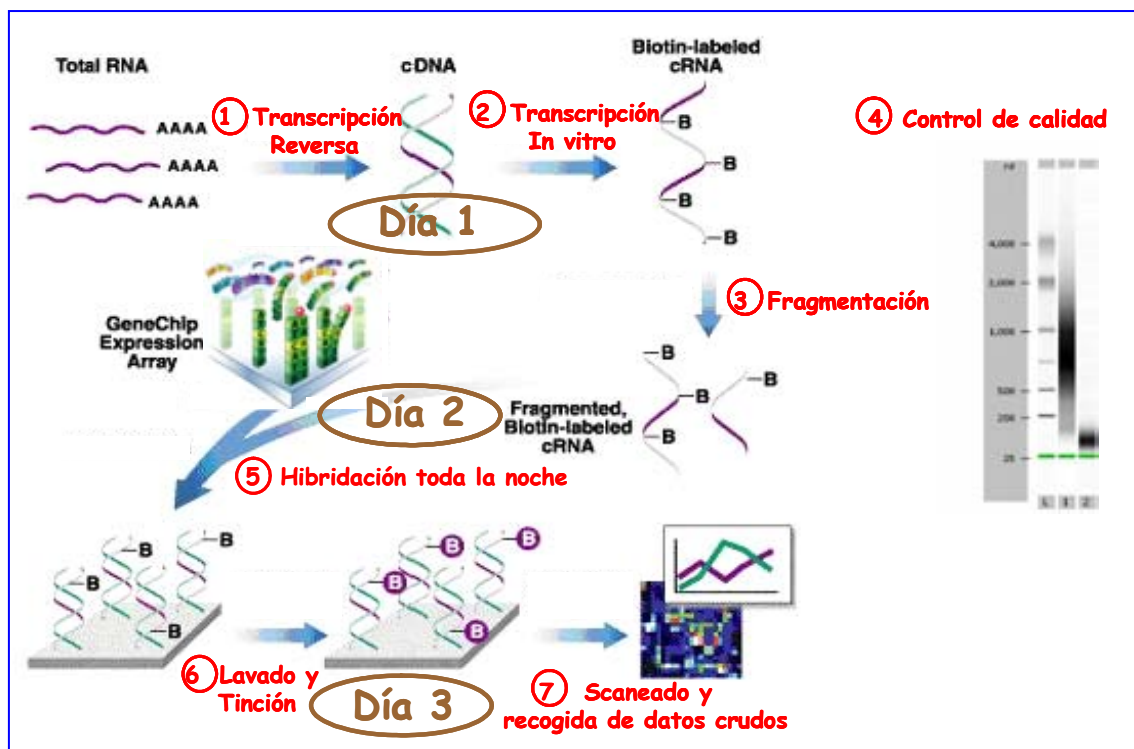
Extracción de las muestras

Se realizaron extracciones de sangre periférica antes y tras 3 meses de tratamiento con IFN β y las CMSP se obtuvieron mediante un gradiente de densidad de Ficoll-Isopaque (Gibco BRL, Life Technologies LTD, GB). Las CMSP se almacenaron en nitrógeno líquido hasta su uso.

Estudio del perfil de expresión génica con microarrays de oligonucleótidos (Human Genome U133 Plus 2.0)

Los pasos que se siguieron en el procesamiento de las muestras con los *microarrays* se ilustran en la siguiente figura:

Figura 1



Leyenda. Descripción de las diferentes etapas incluidas en el procesamiento de los arrays de Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0

La técnica de *microarrays* de expresión génica se lleva a cabo en 3 días tal y como se detalla a continuación:

Primer día. Se realiza la extracción de ARN total a partir de los *pellets* de CMSP congelados usando el *RNeasy Kit* (Quiagen). A partir de 2 μg de ARN total se sintetiza ADN complementario de doble cadena (ADNc) mediante el *One Cycle cDNA Synthesis Kit* (Affymetrix, Inc.) que incorpora el promotor de la polimerasa ARN T7 (proceso denominado transcripción reversa). El ARN complementario antisentido marcado con biotina (ARNc) se obtiene usando el mismo kit (proceso denominado transcripción in vitro), partiendo de 2 μg de ARN total y usando el siguiente oligo dT como cebador: 5' GGCCAGTGA-ATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGGCGG-(dT)₂₄. Los ARNc se purifican mediante las columnas incluidas en el *GeneChip® Sample Cleanup Module* (Affymetrix, Inc.) y 20 μg de ARNc se fragmentan a 94°C durante 30 minutos en 40 μl de 40 mM Tris-acetato, pH 8.1, 100 mM KOAc, 30

mM Mg(OAc)₂. Los productos de fragmentación se comprueban en un *Bioanalyzer 2100* (Agilent Technologies) para verificar su calidad (control de calidad).

Segundo día. Los productos de la fragmentación se añaden a un *cocktail* de hibridación que contiene: oligonucleótido de control B2 (50 pM) y controles de hibridación eucarióticos (BioB, BioC, BioD, cre) a concentraciones finales de 1,5, 5, 25 y 100 pM respectivamente, contenidos en el *GeneChip Eukaryotic Hybridization Control Kit* (Affymetrix, Inc.), ADN de esperma de arenque (0,1 mg/ml), y BSA acetilada (0,5 mg/ml). Los biochips de ADN se equilibran a temperatura ambiente y se pre-hibridan con buffer de hibridación 1X (100mM MES, 1M [Na⁺], 20mM EDTA, 0,01% Tween 20) a 45°C durante 10 minutos con rotación. El cocktail de hibridación se calienta a 99°C durante 5 minutos en un bloque térmico, se transfiere a otro bloque térmico a 45°C durante 5 minutos y se centrifuga a máxima velocidad en una microcentrífuga durante 5 minutos. Doscientos µl de la mezcla de hibridación se inyectan en el biochip de Affymetrix tras quitar el buffer de hibridación, y los biochips se hibridan a 60°C durante 16 horas con rotación en un horno de hibridación (*Affymetrix GeneChip Hyb Oven 640*).

Tercer día. Los biochips se lavan y tiñen con estreptavidina-ficoeritrina (PE) en una estación de lavado (*Affymetrix Fluidics Station 450*) usando el protocolo EukGE-WS2-v5 proporcionado por la compañía Affymetrix. Una vez lavados y teñidos con estreptavidina-PE, los biochips se escanean (*Agilent G3000 GeneArray Scanner*) y los datos de señal crudos obtenidos se procesan usando el software de Affymetrix GCOS.

Análisis estadístico de los datos de microarrays

En la figura que se muestra al final de esta sección (Figura 2) se encuentran resumidos de forma gráfica los principales pasos que se siguieron en el análisis de los datos de *microarrays* de expresión génica.

El análisis de los datos se realizó con el programa de código abierto R y las librerías de *Bioconductor*. Primero de todo se llevó a cabo un control de calidad de cada uno de los arrays del estudio. A continuación, los datos obtenidos a partir de ficheros *.CEL* se preprocesaron empleando el método

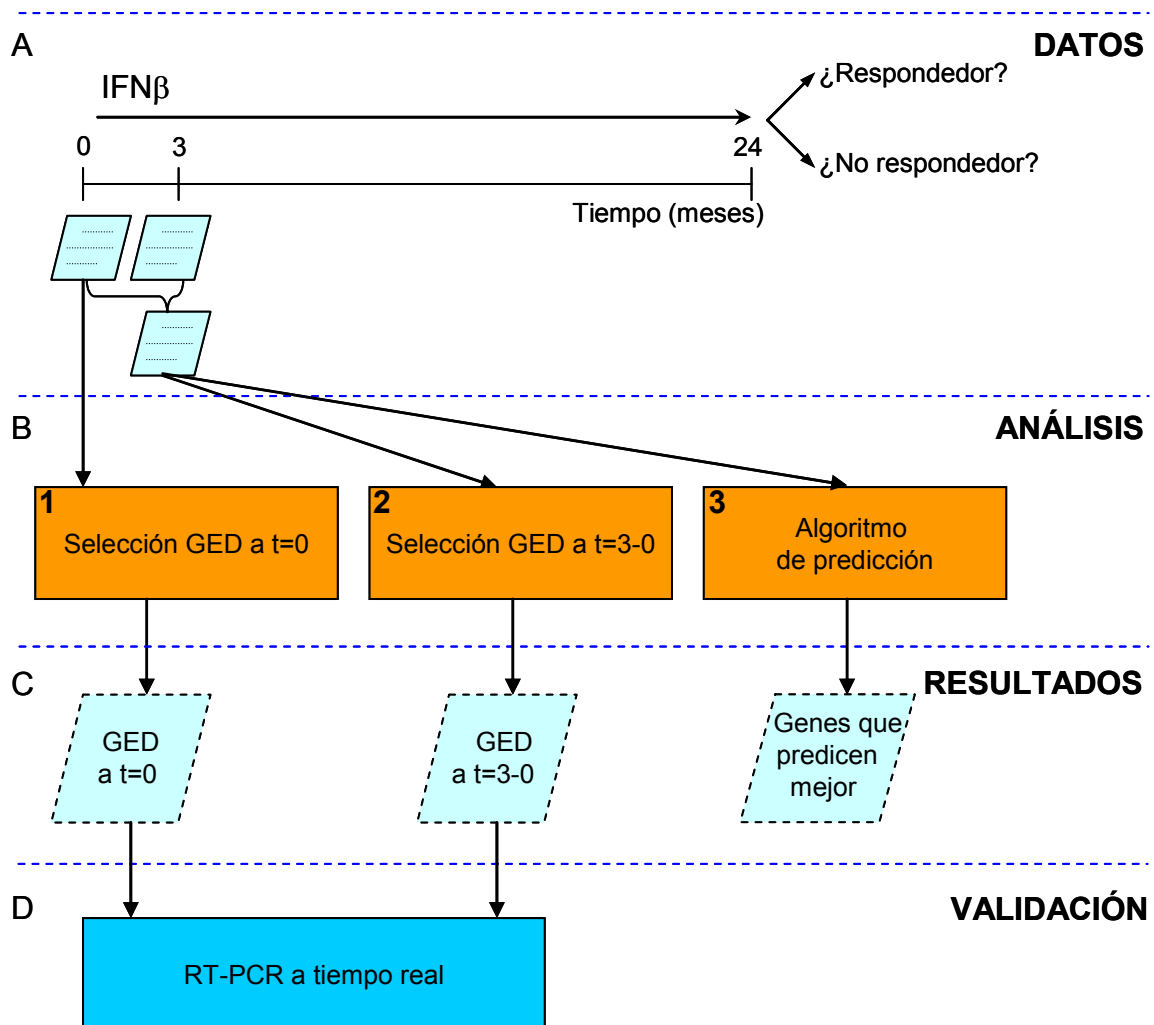
RMA (*Irizarry y cols., 2003*), un proceso de tres pasos que integra (i) la corrección de la señal de fondo, (ii) normalización y (iii) resumen con la finalidad de obtener un único valor para cada conjunto de sondas. Los valores preprocesados constituyeron la base para el resto del análisis. Para evitar genes con baja señal y escasa variación en su expresión entre todos los pacientes, se llevó a cabo un filtrado inespecífico formado por dos pasos: primero, los genes que no alcanzaron una señal media mínima en todos los grupos se excluyeron del análisis; segundo, de los genes seleccionados, únicamente aquéllos con una variabilidad (la desviación estándar se eligió como parámetro de comparación) entre todos los arrays superior a un percentil prefijado se seleccionaron para el análisis posterior. Dichos criterios de selección se eligieron tras evaluar el comportamiento de los datos de expresión para cada paso del análisis. La selección de los genes expresados diferencialmente entre respondedores y no respondedores a tiempo basal y tras 3 meses de tratamiento con IFN β se basó en un análisis de modelos lineales con moderación de Bayes empírica de las estimaciones de la variancia siguiendo el método desarrollado por *Smyth y cols. (2004)*. Este método expande el análisis con modelos lineales tradicionales y emplea métodos de Bayes empíricos para combinar la información de todo el array y de cada gen individual, con la finalidad de obtener unas estimaciones de los errores mejores, aspecto que es muy útil en el análisis de los datos con *microarrays*. El análisis ofrece tests estadísticos estándar tales como diferencias en expresión génica, valores de p ó t moderados que pueden usarse para ordenar los genes de más a menos expresados diferencialmente. Para abordar el aspecto de las comparaciones múltiples derivadas del hecho de que se realizan muchos tests simultáneamente, dado que un modelo lineal se genera para cada gen, los valores de p se ajustaron para conseguir un control fuerte sobre la tasa de descubrimientos falsos (FDR), que se define como la proporción esperada de Tipo 1 o falsos positivos entre las hipótesis rechazadas usando el método de *Benjamini y Hochberg (1995)*.

Los estudios de predicción de respuesta al tratamiento se realizaron en base a los cambios en la expresión génica inducidos por el IFN β en los 3 primeros meses de tratamiento. De esta forma, la diferencia en los niveles de

expresión entre los 3 meses y el tiempo basal se calculó para cada gen en respondedores y no respondedores. Se generó un algoritmo de predicción construyendo y comparando varios predictores en un proceso iterativo con validación cruzada para evitar los bien conocidos problemas de “*overfitting*” ó sesgo de selección (*Barrier y cols., 2005*). De esta forma, los datos se dividieron de forma aleatoria en 10 particiones de igual tamaño y sucesivamente una de las particiones se consideró como conjunto de validación y las nueve restantes como conjunto de entrenamiento. Para cada conjunto de entrenamiento se construyeron predictores que se aplicaron en los respectivos conjuntos de validación. Este procedimiento se repitió varias veces con un subgrupo cada vez mayor de genes comprendidos entre 2 y 100. En este proceso, se consideró como número máximo 100 genes, debido a que nuestro objetivo fue encontrar una lista reducida de genes que pudiera ayudar a predecir la respuesta al tratamiento. Los genes que iban a formar parte de los predictores se seleccionaron mediante un test F (*Dudoit y cols., 2002*). Se evaluaron los siguientes predictores candidatos: (i) análisis discriminante lineal diagonal (DLDA); (ii) el método del k-vecino más cercano (kNN) con 1, 3, 5, y 7 vecinos; (iii) máquinas con vectores de soporte (SVM) con varios parámetros; (iv) el método de los centroides reducidos más cercanos (*Nearest Shrunken Centroids*); (v) y el método de árboles aleatorios (*Random Forest*). La selección de los genes más predictivos se llevó a cabo cogiendo el subgrupo con el número de genes que tuvo asociado el error de clasificación estimado más pequeño. A partir de aquí, la lista definitiva de genes se calculó usando todos los datos y seleccionando otra vez el mejor número de genes encontrado en el paso de selección.

Finalmente, la identificación de las vías celulares de interés en los genes expresados diferencialmente entre respondedores y no respondedores se llevó a cabo con el paquete *sigPathway* implementado en R (*Tian y cols., 2005*).

Figura 2



Leyenda. (A) Los pacientes se siguieron clínicamente durante un mínimo de 24 meses tras comenzar tratamiento con IFN β , y tras este período de tiempo se clasificaron en respondedores y no respondedores en base a criterios clínicos estrictos. Los datos de *microarrays* de los pacientes se obtuvieron a tiempo basal (t=0) y a los 3 meses de tratamiento (t=3). (B) El análisis se llevó a cabo antes del tratamiento (t=0) comparando los genes expresados diferencialmente entre respondedores y no respondedores (1), y tras 3 meses de tratamiento comparando las diferencias en los niveles de expresión génica entre 3 meses y las muestras a tiempo basal (t=3-0) en respondedores y no respondedores (2). De forma adicional, se aplicó un algoritmo de predicción para analizar si los cambios en la expresión génica inducidos por el IFN β en los 3 primeros meses de tratamiento podía predecir la respuesta al tratamiento tras 24 meses (3). (C) Los genes que mejor discriminaron entre respondedores y no respondedores se obtuvieron a tiempo basal y tras 3 meses de tratamiento. Finalmente, también se obtuvieron los genes que mejor

predijeron la respuesta al tratamiento. (D) Los genes expresados diferencialmente obtenidos a tiempo basal y los cambios en la expresión génica inducidos por el IFN β en los 3 primeros meses de tratamiento se validaron mediante RT-PCR a tiempo real. IFN β : interferón-beta. GED: genes expresados diferencialmente. RT-PCR: PCR con transcripción inversa.

Validación de los datos de microarrays mediante RT-PCR a tiempo real

La RT-PCR a tiempo real se empleó para validar los genes expresados diferencialmente obtenidos con los *microarrays* a tiempo basal y a los 3 meses de tratamiento con IFN β . Se extrajo ARN total a partir de las mismas muestras que se emplearon para los *microarrays* de expresión. Se sintetizó ADN complementario a partir de 150 ng de ARN total usando el *High Capacity cDNA Archive Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A), combinado con *TaqMan® Universal PCR Master Mix* y se cargó por duplicado en los *Taqman® Low-density Arrays* que contienen *TaqMan® Gene Expression Assays* específicos para los genes seleccionados para validar los datos de los *microarrays*. El gen *18S rRNA* se empleó como control endógeno. Los *Taqman® arrays* se procesaron en un sistema *ABI PRISM® 7900HT system* (Applied Biosystems). Las condiciones de PCR fueron las siguientes: un ciclo inicial de 2 minutos a 50°C, desnaturalización a 95°C durante 10 minutos seguido de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 15 segundos y anillamiento ó extensión a 60°C durante 1 minuto. El valor del ciclo umbral (*threshold cycle* - C_T) para cada reacción y el nivel relativo de expresión génica para cada muestra se calculó usando el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak y cols., 2001). Brevemente, el gen *18S rRNA* se empleó para la normalización de la cantidad de ARN usado. Su valor de C_T se sustrajo al obtenido en los genes específicos para calcular el valor ΔCT . A continuación se determinó la diferencia ($\Delta\Delta CT$) entre los valores de ΔCT obtenidos en los respondedores (calibradores) y los valores de ΔCT de los no respondedores. Esta diferencia relativa se expresó como $2^{-\Delta\Delta CT}$, y representa el cambio en la expresión génica (*fold change*) normalizado con el control endógeno y relativo a los calibradores.

Detección de la fosforilación de STAT1 basal e inducida por IFN β mediante citometría de flujo en diferentes poblaciones de CMSP

La metodología para la detección de la fosforilación de STAT1 (transductor de señal y activador de la transcripción 1) mediante citometría de flujo se adaptó a partir de la descripción de *Lesinski y Dhodapkar (Lesinski y cols., 2004; Dhodapkar y cols., 2007)*. Las CMSP obtenidas a tiempo basal se trataron con ó sin IFN β -1a recombinante (10.000 UI/ml) en condiciones libres de suero a 37°C durante 20 minutos. Las células se fijaron inmediatamente y se permeabilizaron con metanol al 90% durante 30 minutos en hielo. Las células se lavaron y tiñeron con un anticuerpo de ratón anti-humano específico para fosfo-STAT1 acoplado a PE (BD Biosciences, San Jose, CA, U.S.A) y un anticuerpo isotipo control IgG1-PE, junto con anticuerpos monoclonales conjugados directamente y específicos para CD3, CD14, y CD19 (todos de BD Biosciences). Los datos se adquirieron en un citómetro de flujo *BD-LSRII* y se analizaron con el software *FlowJo* (TreeStar, Ashland, OR, U.S.A). La intensidad media de fluorescencia geométrica del anticuerpo isotipo control IgG1-PE se sustrajo a la intensidad media de fluorescencia geométrica del anticuerpo fosfo-STAT1, con la finalidad de cuantificar la fosforilación de STAT1 basal e inducida por IFN β en las diferentes poblaciones celulares.

Determinación de los niveles de ARNm de reguladores negativos de la vía de señalización JAK/STAT inducida por los IFNs de tipo I

Los niveles de ARNm de *PIAS1* (inhibidor proteico de STAT1), *SOCS1* (supresor de la señalización de citocinas 1) y *SOCS3* (supresor de la señalización de citocinas 3) se determinaron mediante RT-PCR a tiempo real usando sondas *TaqMan*® y *18S rRNA* como control endógeno en un sistema *ABI Prism 7000 Sequence Detection* (Applied Biosystems). La cuantificación relativa se llevó a cabo con el método del $2^{-\Delta\Delta CT}$ tal y como se describió anteriormente.

Inmunofenotipado de superficie para detectar la expresión de marcadores de activación y de los receptores 1 y 2 del IFN (IFNAR1 e IFNAR2) en diferentes poblaciones celulares

Los siguientes anticuerpos monoclonales se obtuvieron de Pharmingen (San Diego, CA, U.S.A): anticuerpos de ratón anti-CD64, anti-CD86, y anti-CD38 humanos conjugados con isotiocianato de fluoresceína (FITC), ratón anti-CD80, anti-HLA-ABC, anti-CD25, anti-CD83, y anti-CD14 humanos conjugados con PE, ratón anti-CD14, anti-CD19, y anti-CD11c humanos conjugados con alofococianina (APC), y ratón anti-CD4 humano conjugado con alofococianina-cianina 7 (APC-Cy7). Los siguientes anticuerpos monoclonales se obtuvieron de Becton Dickinson (Mountain View, CA, U.S.A): anticuerpos de ratón anti-CD3 y anti-HLA-DR humanos conjugados con peridinin clorofil proteína (PerCP), y un cocktail anti-CD3, anti-CD14, anti-CD16, anti-CD19, anti-CD20, y anti-CD56 (cóctel de linaje) conjugados con FITC. El anticuerpo de ratón anti-CD86 humano conjugado con PE se obtuvo de Caltag Laboratories (Burlingame, CA, U.S.A). Los anticuerpos de ratón anti-IFNAR1 y anti-IFNAR2 humanos conjugados con FITC se compraron en R&D Systems (Gaithersburg, MD, U.S.A) y PBL InterferonSource (Piscataway, NJ, U.S.A.) respectivamente. Los anticuerpos isotipo control de ratón IgG1-FITC, IgG2a-FITC, IgG1-PE, IgG1-APC, y IgG1-APC-Cy7 se obtuvieron de Pharmingen. Los anticuerpos isotipo control de ratón IgG1-PerCP y IgG2a- PerCP se compraron en Becton Dickinson.

Para determinar la expresión de marcadores de activación a tiempo basal, las CMSP se tiñeron con anticuerpos monoclonales contra CD14, CD64, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC, y HLA-DR para monocitos; CD19 y CD38 para células B; CD3, CD4, y CD25 para células T; CD11c, HLA-DR, CD80, CD83, CD86, y cóctel de linaje para las células dendríticas; ó con los correspondientes anticuerpos isotipo control durante 25 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células teñidas se lavaron dos veces en buffer salino fosfato (DPBS) sin Mg^{2+} ó Ca^{2+} , y resuspendidas en el mismo buffer.

Las células se analizaron en un citómetro de flujo *FACSCanto* (Becton Dickinson) equipado con el software *FACSDiva*. Las poblaciones de linfocitos y monocitos se seleccionaron en base a los parámetros de dispersión de luz frontal (FSC) y lateral (SSC). Para analizar las células dendríticas las células se seleccionaron primero en base al FSC y SSC. Las células dendríticas mieloides se identificaron como células linaje⁻HLADR⁺CD11c⁺, mientras que las células dendríticas plasmacitoides se identificaron como células linaje⁻HLADR⁺CD11c⁻. Los resultados se presentan como porcentaje de células positivas tras sustraer la señal del anticuerpo isotipo control a la señal del anticuerpo específico, y como intensidad media de fluorescencia.

La expresión de IFNAR1 e IFNAR2 se determinó a tiempo basal en células T, células B, monocitos, células dendríticas mieloides, y células dendríticas plasmacitoides. La tinción de superficie y el análisis de los datos se llevó a cabo tal y como se describió anteriormente.

Estimulación con agonistas de los TLR y cuantificación de los IFNs

La producción de IFNs de tipo 1 y 2 se estudió a tiempo basal en respondedores y no respondedores tras estimulación con agonistas de los receptores de tipo Toll (TLR). Las CMSP se sembraron a una concentración de 2×10^5 por pocillo en placas de 96 pocillos con 10% de suero humano AB y se estimularon por duplicado con agonistas de los TLR3 (Poly(I:C); 25 μ g/ml), TLR4 (LPS; 1 μ g/ml), TLR7 (3M-13; 1 μ g/ml), TLR8 (3M-2; 1 μ g/ml), y TLR9 (CpG-C; 500mM) durante 48 horas. Las concentraciones de los IFNs de tipo 1 (IFN-alfa 2) y tipo 2 (IFN γ) se analizaron en sobrenadantes mediante un ELISA estándar según las recomendaciones de los fabricantes (Mabtech, Cincinatti, OH, U.S.A).

Cuantificación de la bioactividad de los IFNs de tipo 1

La bioactividad de los IFNs de tipo 1 se determinó en muestras de suero a tiempo basal mediante el iLite™ Human Interferon Alpha Kit (Neutekbio, Galway, Ireland) siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Este bioensayo emplea una línea celular transfectada de forma estable, derivada de una línea celular humana pro-monocítica, y detecta la intensidad de bioluminiscencia generada por la luciferasa, que es proporcional

a la actividad de los IFNs de tipo 1 (UI/ml) presente en la muestra. Para la cuantificación de la bioactividad de los IFNs de tipo 1 se empleó una curva estándar con diferentes diluciones de IFN-alfa-2b. Aunque el IFN-alfa se usa como estándar, la bioactividad de otros IFNs de tipo 1 que se unen y activan el receptor de tipo 1, como por ejemplo el IFN β ó el IFN-omega, también se detectará.

Determinación de serologías para los virus de Epstein-Barr (VEB) y herpes virus 6 humano (HHV-6) y detección del genoma viral

La replicación del VEB y HHV-6 se determinó a tiempo basal en los pacientes del estudio. Las serologías IgG e IgM para VEB se llevaron a cabo con métodos de inmunofluorescencia estándar para detectar anticuerpos contra el antígeno del cápside viral. Los anticuerpos contra el HHV-6 (IgG e IgM) se determinaron mediante un ELISA comercial (Panbio, Brisbane, Australia).

En los pacientes seropositivos para VEB y HHV-6 la detección del genoma viral se llevó a cabo por PCR en un *SmartCycler II Real Time PCR System* (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, U.S.A). Brevemente, se aisló ADN a partir de 1×10^6 de CMSP mediante el sistema automático *NucliSens® easyMAG™* (Biomerieux, Boxtel, The Netherlands). Se empleó un ensayo de PCR cuantitativa para la detección de la carga viral para el VEB. El *Artus® EBV RG PCR Kit* (Qiagen, Hamburg, Germany) se utilizó para la amplificación específica del genoma del VEB siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para cuantificar la carga viral del VEB, se construyó una curva estándar con 4 controles positivos de 50000, 5000, 500, y 50 copias/ μ l (EBV RG QS 1-4, Qiagen). La detección del genoma del HHV-6 se llevó a cabo con un ensayo de PCR cualitativo no comercial empleando cebadores y sondas *TaqMan®* específicos (*Watzinger y cols., 2004*).

Inducción de la diferenciación de monocitos en células dendríticas

Monocitos CD14+ se purificaron a partir de CMSP frescas de controles sanos mediante selección negativa usando el *Monocyte Isolation Kit II* (Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, Germany) según el protocolo de los fabricantes. La pureza de los monocitos CD14+ aislados fue superior al

90% en todas las separaciones. Tras la separación celular, los monocitos se cultivaron durante 3 días en placas de 6 pocillos (1×10^6 células/pocillo) con medio de cultivo conteniendo un 25% de suero obtenido a tiempo basal de respondedores, no respondedores, ó donantes sanos. Como controles positivos ó negativos se emplearon monocitos incubados con IFN-alfa-2b (100 UI/ml) ó con 25% de suero autólogo, respectivamente. Al tercer día, las células se tiñeron para citometría de flujo con anticuerpos monoclonales contra HLA-DR, CD80, CD86, y CD83. Las intensidades medias de fluorescencia para cada marcador se compararon entre grupos.

Presencia de anticuerpos neutralizantes

La presencia de anticuerpos neutralizantes contra el IFN β se determinó en todos los pacientes en muestras de suero a tiempo basal y a los 12 y 24 meses de tratamiento mediante el bioensayo de inducción del myxovirus A – MxA (*Gneiss y cols., 2006*). Títulos de unidades neutralizantes iguales o superiores a 20 a los 12 ó 24 meses de tratamiento se consideraron resultados positivos.

6.3 Metodología relacionada con el Objetivo 3

“Identificar variantes alélicas asociadas con la respuesta al tratamiento con IFN β mediante microarrays de SNPs”

Pacientes – cohorte original

Se incluyeron en el estudio 106 pacientes con EMRR, 53 (50%) respondedores y 53 (50%) no respondedores al IFN β . Las características demográficas y clínicas basales se resumen en la siguiente tabla:

Tabla 3

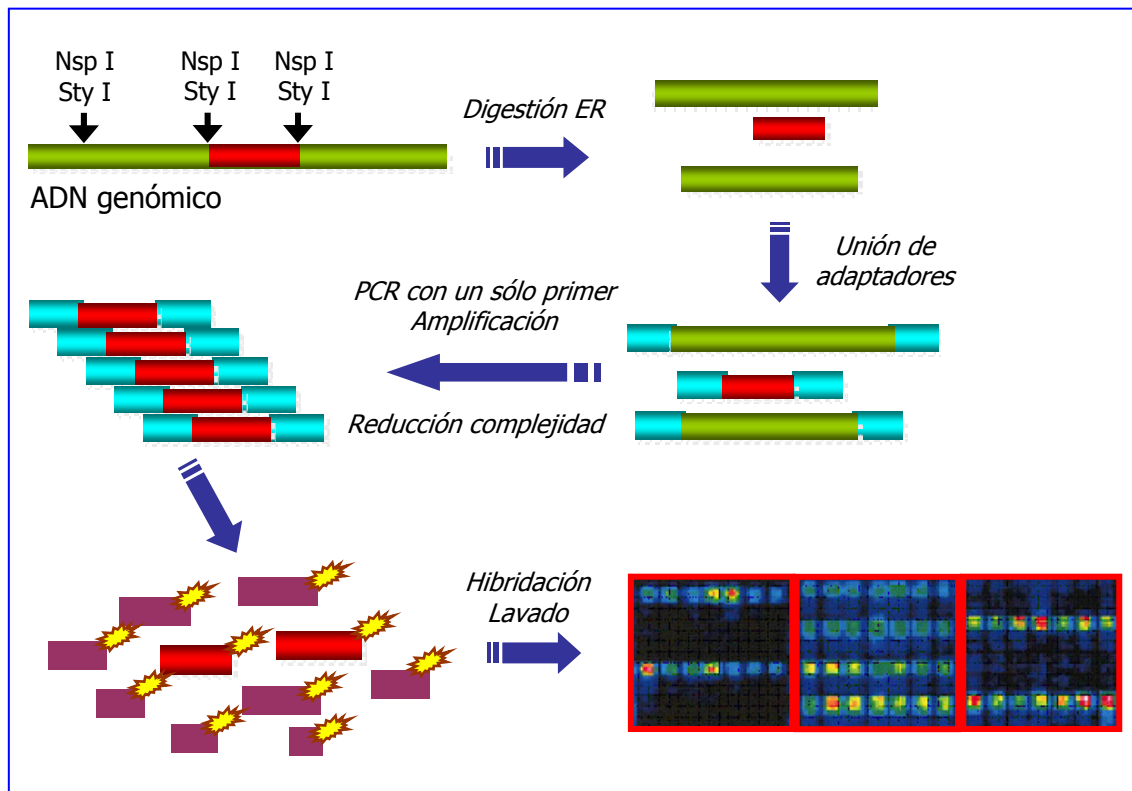
Características	Respondedores	No respondedores
<i>Cohorte original*</i>		
n (%)	53 (50,0)	53 (50,0)
Edad (años)	33,5 (8,5)	35,5 (8,5)
Mujer/hombre (% mujeres)	37 / 16 (69,8)	37 / 16 (69,8)
Duración de la enfermedad (años)	6,2 (6,3)	7,1 (5,6)
EDSS ^a	2,1 (1,0-2,8)	2,7 (1,5-3,5)
Número de brotes en los dos años previos	2,6 (1,0)	2,9 (1,4)
Tipo de IFN β administrado [n (%)]		
IFN β 1a IM	11 (20,7)	10 (18,9)
IFN β 1b SC	25 (47,2)	26 (49,0)
IFN β 1a SC	17 (32,1)	17 (32,1)
<i>Cohorte de validación**</i>		
n (%)	49 (52,1)	45 (47,9)
Edad (años)	34,5 (8,0)	35,0 (9,7)
Mujer/hombre (% mujeres)	33 / 16 (67,3)	37 / 8 (82,2)
Duración de la enfermedad (años)	5,5 (5,1)	5,4 (5,3)
EDSS ^a	2,2 (1,5-2,5)	2,6 (2,0-3,5)
Número de brotes en los dos años previos	2,9 (1,0)	2,6 (2,2)
Tipo de IFN β administrado [n (%)]		
IFN β 1a IM	17 (34,7)	18 (40,0)
IFN β 1b SC	20 (40,8)	14 (31,1)
IFN β 1a SC	12 (24,5)	13 (28,9)

Leyenda. *Se refiere a los pacientes que formaron parte de los *pool*es de ADN. **Se refiere a los pacientes que formaron parte del genotipado en muestras de ADN individuales. Los datos se expresaron como media (desviación estándar). ^aDatos expresados como media (rango intercuartil). EDSS: escala de estado de la discapacidad ampliada. IFN β : interferón-beta. IM: intramuscular. SC: subcutáneo

Generación de pools de ADN y genotipado en arrays de SNPs de alta densidad en respondedores y no respondedores al IFN β

La calidad de las muestras de ADN se comprobó mediante electroforesis en geles de agarosa del 2%. Las muestras degradadas se excluyeron del análisis de los *pools*. La concentración media de ADN genómico de cada sujeto del estudio se determinó por triplicado mediante el ensayo de *PicoGreen* (*Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit* - Invitrogen, Carlsbad, CA) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Las muestras de ADN individuales se añadieron a continuación a sus respectivos *pools* en cantidades molares equivalentes. Una vez generados y previo al genotipado, cada *pool* se diluyó a una concentración de 50 ng/ μ l con agua estéril. Cada una de las muestras se incluyó en 3 *pools* diferentes con la finalidad de controlar el error de pipeteo, y cada *pool* se genotipó en 3 arrays diferentes (réplicas técnicas) a fin de controlar la variabilidad del ensayo y de los arrays. Finalmente, los arrays (*GeneChip® Human Mapping 500K Array*, Affymetrix) se procesaron en *TGen* (*Translational Genomics Research Institute*; Phoenix, AZ) tal y como se describe a continuación y se ilustra en la siguiente figura:

Figura 3



Leyenda. Fases del procesamiento de los arrays de SNPs *GeneChip® Human Mapping 500K* de Affymetrix. *Nsp I* y *Sty I* corresponden a los nombres de los enzimas de restricción (ER).

El chip se compone de dos *arrays*, y cada uno permite genotipar unos 250.000 SNPs de media. Uno de los arrays emplea el *Nsp I* como enzima de restricción (~262,000 SNPs), mientras que el otro array usa *Sty I* como enzima de restricción (~238,000 SNPs). Se hizo una digestión del ADN genómico total (250 nanogramos) con 10 unidades de *Nsp I* ó *Sty I* (New England Biolabs, Beverly, MA) durante 2 horas a 37°C. Tras la digestión, se emplearon unos adaptadores *Nsp I* ó *Sty I* (Affymetrix, Santa Clara, CA) que reconocen las zonas de corte de los enzimas de restricción para unirse a los extremos de ADN digeridos merced a la enzima T4 ADN ligasa, durante 3 horas a 16°C. Todos los fragmentos de ADN, independientemente de su tamaño, son sustratos para la ligación. Tras diluir en agua, las muestras se amplificaron mediante PCR empleando un sólo primer que es específico para la secuencia de los adaptadores (Affymetrix) con las siguientes condiciones de amplificación: desnaturalización inicial a 95°C durante 3 minutos, 35 ciclos de 95°C durante 30 segundos, 60°C durante 30 segundos, y 68°C durante 15 segundos, seguido de una extensión final de 68°C durante 7 minutos. Estas condiciones de PCR permiten la amplificación preferencial de fragmentos de ADN de tamaño comprendido entre 200 y 1100 pares de bases. Los productos de la PCR se purificaron y a continuación se fragmentaron con 0,25 unidades de *DNasa I* (Affymetrix) a 37°C durante 35 minutos. Los productos de PCR fragmentados se corrieron en un gel de agarosa con 4% TBE para comprobar que el tamaño de los productos fuese inferior a 180 pares de bases (comprobación de la fragmentación). El ADN fragmentado se marcó con biotina empleando 105 unidades del enzima terminal *deoxynucleotidyl transferase* (Affymetrix) a 37°C durante 4 horas. Finalmente, el ADN marcado se hibridó en los arrays a 49°C durante 16-18 horas a 60 rpm. Los arrays hibridados se lavaron, tiñeron para detectar las sondas hibridadas, y escanearon para obtener la imagen.

Análisis de los datos de pools generados a partir de los arrays de SNPs

Los datos de intensidad de las sondas se leyeron directamente de los ficheros *.CEL*, y los valores de las señales relativas de los alelos (RAS) se calcularon para cada “*quartet*” de sondas. Los valores de RAS corresponden al cociente entre la sonda A y la suma de las sondas A y B (donde A es el alelo mayor y B el alelo menor), y proporcionan un índice cuantitativo que correlaciona con las frecuencias de alelos en los *pools* de ADN. El control de calidad se evaluó mediante la determinación de los coeficientes de correlación de los valores de RAS entre las réplicas, seguido de un análisis de grupos (*clusters*) jerárquico no supervisado. También se emplearon en el análisis los coeficientes de correlación de Pearson, mostrando todos los arrays valores superiores al 0,95. El análisis se llevó a cabo de forma idéntica a otros estudios que también usaron *pools* de ADN genómico (*Pearson y cols., 2007; Homer y cols., 2008*). El coeficiente silueta (*silhouette*), que representa la distancia media de un punto a todos los demás puntos de su misma clase (por ejemplo, *pool* de pacientes respondedores) frente a los puntos en la otra clase (por ejemplo, *pool* de pacientes no respondedores), se utilizó para obtener un *ranking* de todos los SNPs genotipados. Dicho coeficiente ha demostrado funcionar bien para identificar SNPs que presentan diferencias grandes en sus frecuencias alélicas. El coeficiente silueta varía desde 1, cuando se observa una completa separación entre los grupos (respondedores y no respondedores) hasta -1, cuando no es posible distinguir los grupos. La fórmula para calcular el coeficiente silueta se muestra en la siguiente ecuación:

$$S = \frac{\sum_{i=1..N} s(i)}{N}, s(i) = \frac{b(i) - a(i)}{\max\{a(i), b(i)\}}, b(i) = \min\{b(i)\}$$

S corresponde a la puntuación global del coeficiente silueta, y representa la media de todos los valores individuales de dicho coeficiente [s(i)] para cada una de las medidas. N representa el número de réplicas empleadas en el estudio. El cálculo de cada coeficiente individual, s(i), está en función de b(i),

que representa la distancia media de un punto a todos los otros puntos que no pertenecen a su clase, y $a(i)$, que se refiere a la distancia dentro de su clase.

Análisis de ontología génica

El análisis de categorías funcionales se llevó a cabo en los SNPs que formaron parte del 2% de marcadores que mejor discriminaron entre respondedores y no respondedores mediante el software *MetaCore* (GeneGo, Inc, St. Joseph, MI).

Validación de los SNPs candidatos mediante genotipado individual en una cohorte independiente de respondedores y no respondedores al IFN β

Se aplicaron dos criterios para seleccionar los SNPs candidatos para validación en una nueva cohorte de respondedores y no respondedores. Un primer criterio fue seleccionar las 100 primeros SNPs que obtuvieron mejor puntuación tras aplicar el coeficiente silueta, como se describe anteriormente. El segundo criterio fue identificar grupos de dos o más SNPs localizados en proximidad (*clusters* de SNPs) dentro del 2% de SNPs que mejor discriminaron entre respondedores y no respondedores, y posteriormente seleccionar de cada grupo los SNPs con puntuación más alta.

Aplicando dichos criterios se escogió un total de 383 SNPs para genotipar individualmente en una cohorte independiente formada por 94 pacientes con EMRR tratados con IFN β y clasificados en respondedores (N=49) y no respondedores (N=45) en base a los mismos criterios clínicos usados en la cohorte original (ver Tabla 3). Ninguno de los pacientes integrantes de la cohorte de validación formó parte de la cohorte original. Las características demográficas y clínicas basales de estos pacientes se resumieron en la Tabla 3.

Las muestras de ADN de la cohorte de validación se cuantificaron y genotiparon en el Centro Nacional de Genotipado (CEGEN, Madrid) utilizando el ensayo de *PicoGreen*. El genotipado de los 383 SNPs seleccionados se llevó a cabo en una plataforma diferente (Illumina) mediante el ensayo *GoldenGate*. Tras llevar a cabo un control de calidad, 18 SNPs se descartaron, 17 por problemas en el proceso de genotipado, y 1 por

desviación significativa del equilibrio de Hardy-Weinberg. Los tests de asociación alélica y genotípica se realizaron con el paquete de análisis SNPator (www.snpator.com)(*Morcillo-Suárez y cols., 2008*).

Análisis de interacción entre los principales SNPs

Las interacciones entre genotipos se estudiaron a partir de todas las combinaciones posibles de 2 y 3 SNPs mediante la versión 1.2.5 del software MDR (<http://www.epistasis.org>) (*Moore y cols., 2006*).

Resultados

7. Resultados

Los resultados son específicos para cada estudio, y por tanto, al igual que se hizo con la metodología, se presentarán por separado acorde a los diferentes objetivos.

7.1 Resultados en relación con el Objetivo 1

“Estudiar la relación entre genes del HLA de clase I y clase II y la respuesta al tratamiento con IFN β ”

HLA de clase I y respuesta al IFN β

En primer lugar, se compararon las frecuencias alélicas para el *HLA-A*, *-B*, y *-C* entre respondedores y no respondedores al IFN β . Tal y como se muestra en las siguientes tablas (Tablas 4-6), la distribución de las frecuencias para los diferentes alelos fue similar entre los dos grupos, y no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Únicamente se observó una tendencia hacia una mayor frecuencia de portadores del alelo *HLA-C*15* en los pacientes no respondedores ($p=0,064$). Sin embargo, estos resultados deben interpretarse con precaución debido a la baja representación de pacientes *HLA*15* ($n=8$).

Tabla 4

HLA-A	Respondedores [n (%)]	No respondedores [n (%)]	P valor
01	13 (18,3%)	12 (16,2%)	0,827
02	30 (42,3%)	30 (40,5%)	0,867
03	14 (19,7%)	21 (28,4%)	0,249
11	12 (16,9%)	10 (13,5%)	0,647
23	6 (8,5%)	7 (9,5%)	1,000
24	10 (14,1%)	11 (14,9%)	1,000
25	3 (4,2%)	3 (4,1%)	1,000
26	10 (14,1%)	9 (12,2%)	0,808
29	10 (14,1%)	9 (12,2%)	0,808
30	9 (12,7%)	5 (6,8%)	0,269
31	1 (1,4%)	4 (5,4%)	0,367
32	5 (7,0%)	8 (10,8%)	0,564
33	2 (2,8%)	1 (1,4%)	0,615
34	0 (0%)	1 (1,4%)	1,000
62	0 (0%)	1 (1,4%)	1,000
66	2 (2,8%)	0 (0%)	0,238
68	8 (11,3%)	5 (6,8%)	0,394
69	1 (1,4%)	0 (0%)	0,490
74	1 (1,4%)	0 (0%)	0,490
80	1 (1,4%)	0 (0%)	0,490

Leyenda. Distribución de las frecuencias alélicas del *HLA-A* en respondedores y no respondedores al IFN β

Tabla 5

HLA-B	Respondedores [n (%)]	No respondedores [n (%)]	P valor
07	24 (34,3%)	17 (23,3%)	0,195
08	7 (10%)	4 (5,5%)	0,360
13	0 (0%)	4 (5,5%)	0,120
14	11 (15,7%)	10 (13,7%)	0,815
15	5 (7,1%)	6 (8,2%)	1,000
18	13 (18,6%)	14 (19,2%)	1,000
27	4 (5,7%)	3 (4,1%)	0,715
35	12 (17,1%)	14 (19,2%)	0,830
37	0 (0%)	1 (1,4%)	1,000
38	1 (1,4%)	2 (2,7%)	1,000
39	2 (2,9%)	5 (6,8%)	0,442
40	8 (11,4%)	8 (11%)	1,000
41	1 (1,4%)	1 (1,4%)	1,000
44	11 (15,7%)	17 (23,3%)	0,296
45	1 (1,4%)	1 (1,4%)	1,000
49	6 (8,6%)	4 (5,5%)	0,527
50	4 (5,7%)	7 (9,6%)	0,533
51	11 (15,7%)	12 (16,4%)	1,000
53	1 (1,4%)	2 (2,7%)	1,000
55	1 (1,4%)	1 (1,4%)	1,000
56	1 (1,4%)	0 (0%)	0,490
57	5 (7,1%)	6 (8,2%)	1,000
58	2 (2,9%)	0 (0%)	0,238

Leyenda. Distribución de las frecuencias alélicas del *HLA-B* en respondedores y no respondedores al IFN β

Tabla 6

HLA-C	Respondedores [n (%)]	No respondedores [n (%)]	P valor
01	2 (2,9%)	3 (4,1%)	1,000
02	8 (11,8%)	6 (8,2%)	0,578
03	11 (16,2%)	9 (12,3%)	0,631
04	15 (22,1%)	18 (24,7%)	0,843
05	10 (14,7%)	11 (15,1%)	1,000
06	9 (13,2%)	13 (17,8%)	0,494
07	41 (60,3%)	37 (50,7%)	0,310
08	11 (16,2%)	9 (12,3%)	0,631
12	3 (4,4%)	8 (11,1%)	0,210
14	5 (7,4%)	3 (4,1%)	0,482
15	1 (1,5%)	7 (9,6%)	0,064
16	7 (10,3%)	9 (12,3%)	0,794
18	1 (1,5%)	1 (1,4%)	1,000

Leyenda. Distribución de las frecuencias alélicas del *HLA-C* en respondedores y no respondedores al IFN β

HLA de clase II y respuesta al IFN β

El siguiente paso en el análisis fue la comparación de las frecuencias de los alelos de clase II entre respondedores y no respondedores al tratamiento con IFN β . Como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 7), la distribución de los alelos para el *HLA-DRB1*, *-DQA1*, y *-DQB1* también fue similar entre los dos grupos de pacientes, y ninguno de los alelos del HLA de clase II se asoció de forma estadísticamente significativa con la respuesta al tratamiento.

Tabla 7

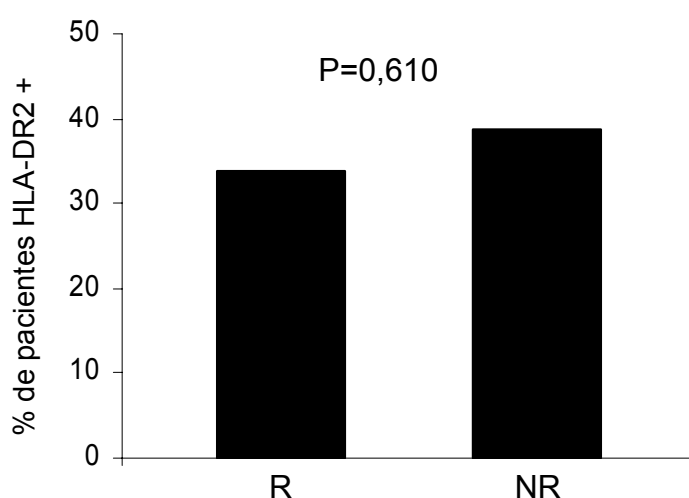
HLA-II	Respondedores [n (%)]	No respondedores [n (%)]	P valor
<i>DRB1</i>			
01	12 (16,2 %)	7 (9,3%)	0,229
03	17 (23%)	15 (20%)	0,694
04	22 (29,7%)	17 (22,7%)	0,356
07	15 (20,3%)	23 (30,7%)	0,188
08	9 (12,2%)	8 (10,7%)	0,802
09	1 (1,4%)	2 (2,7%)	1,000
10	1 (1,4%)	1 (1,3%)	1,000
11	9 (12,2%)	16 (21,3%)	0,188
13	16 (21,6%)	12 (16,0%)	0,409
14	6 (8,1%)	5 (6,7%)	0,765
15	29 (39,2%)	32 (42,7 %)	0,740
16	2 (2,7%)	3 (4,0%)	1,000
<i>DQA1</i>			
01	48 (65,8%)	52 (70,3%)	0,599
02	15 (20,5%)	23 (31,1%)	0,187
03	21 (28,8%)	19 (25,7%)	0,714
04	9 (12,3%)	8 (10,8%)	0,802
05	27 (37,0%)	30 (40,5%)	0,736
<i>DQB1</i>			
02	30 (41,1%)	36 (48,0%)	0,413
03	33 (45,2%)	38 (50,7%)	0,516
04	9 (12,3%)	8 (10,7%)	0,801
05	20 (27,4%)	16 (21,3%)	0,446
06	37 (50,7%)	39 (52,0%)	1,000

Leyenda. Distribución de las frecuencias alélicas del *HLA-DRB1*, *-DQA1* y *-DQB1* en respondedores y no respondedores al IFN β

Distribución del haplotipo HLA-DR2 en respondedores y no respondedores al IFN β

Finalmente, se analizó la distribución del haplotipo *HLA-DR2* (*DRB1*15:01-DQA1*01:02-DQB1*06:02*) en los pacientes del estudio. Tal y como se muestra en la Figura 4, de los 54 pacientes portadores del HLA-DR2, 25 pacientes (33,8%) respondieron y 29 pacientes (38,7%) no respondieron al tratamiento, diferencias que no fueron estadísticamente significativas.

Figura 4



Leyenda. Distribución de las frecuencias del haplotipo *HLA-DR2* en respondedores (R) y no respondedores (NR) al IFN β . P: p valor resultante de la comparación entre ambos grupos

7.2 Resultados en relación con el Objetivo 2

“Identificar genes expresados diferencialmente asociados con la respuesta al tratamiento con IFN β mediante microarrays de expresión génica”

Respuesta al IFN β y NABs

Con el objetivo de descartar una posible relación entre la respuesta al IFN β y el desarrollo de NABs, éstos se midieron en todos los pacientes del estudio a tiempo basal y tras 12 y 24 meses de tratamiento. Ninguno de los pacientes fue positivo para NABs a tiempo basal. Dos pacientes en el grupo de no respondedores (11,1%) y un paciente en el grupo de respondedores

(3,4%) desarrollaron NABs a los 12 ó 24 meses, diferencia que no fue estadísticamente significativa tras aplicar un test exacto de Fisher ($p=0,549$). Debido a que el análisis del estudio se centró en el tiempo basal y 3 meses de tratamiento, y dado que la presencia de NABs no se asoció con la respuesta al IFN β ($P>0,05$), en el estudio con *microarrays* todos los pacientes se analizaron sin hacer distinción entre pacientes positivos y negativos para NABs.

El análisis de microarrays a tiempo basal revela una mayor expresión de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 en los no respondedores al IFN β

Con la finalidad de identificar diferencias en la expresión génica entre respondedores y no respondedores preexistentes antes de iniciar tratamiento con IFN β , primero se analizaron los genes expresados diferencialmente en las CMSP de pacientes con EMRR antes del tratamiento. La tabla del Anexo 1 muestra los 47 genes que se encontraron expresados de forma diferencial entre respondedores y no respondedores antes de iniciar tratamiento con IFN β . Como se puede ver en la tabla, la gran mayoría de los genes se encuentran más expresados en no respondedores al tratamiento (valor negativo del logFC o cambio del logaritmo medio), y se observa una elevada representación de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 (genes mostrados en negrita). También es interesante resaltar que un porcentaje elevado de estos genes se induce de forma predominante o selectiva por los IFNs de tipo 1 (genes mostrados con asterisco) (*Der y cols., 1998; Leszczyniecka y cols., 2003; Barnes y cols., 2004; Kirou y cols., 2004; Helbig y cols., 2005*).

A continuación se llevó a cabo un estudio de vías celulares con la finalidad de identificar las categorías funcionales a las que pertenecen los genes diferencialmente expresados. El estudio de categorías funcionales mostró que la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 fue la que se asoció de forma más significativa con el fenotipo de no respuesta (Tabla 8). Otras vías celulares más representadas en el grupo de no respondedores y relacionadas con el sistema inmunitario son: (i) las vías de señalización de los receptores de tipo Toll; (ii) vías de actividad de citocinas; y (iii) vías de células presentadoras de antígenos y células dendríticas.

Tabla 8

Categoría de conjunto de genes	Vías celulares	Tamaño del conjunto	NTk Stat	NTk q-valor	NTk Rank	NEk* Stat	NEk* q-valor	NEk* Rank
humanpaths	Interferon a,b Response	37	-7,64	<0,0001	1,0	-2,89	0,0109	1,0
humanpaths	Nitric Oxide	21	-6,45	<0,0001	2,0	-2,17	0,0815	2,0
KEGG	Toll-like_receptor_signaling_pathway	21	-5,02	<0,0001	3,0	-1,80	0,0783	5,0
humanpaths	Stress / Toxicity PathwayFinder	21	-4,33	<0,0001	6,0	-1,96	0,0906	3,0
humanpaths	Dendritic / Antigen Presenting Cell	37	-4,86	<0,0001	4,0	-1,60	0,0747	7,5
GO:0006954	inflammatory response	27	-4,25	<0,0001	7,0	-1,67	0,0851	6,0
humanpaths	Glucocorticoid Signaling I	20	-3,09	0,0028	11,5	-1,84	0,0897	4,0
GO:0005125	cytokine activity	22	-4,68	<0,0001	5,0	-1,39	0,0743	12,0
humanpaths	Toll-Like Receptor Signaling Pathway	20	-4,16	<0,0001	8,0	-1,47	0,0772	9,5
humanpaths	cAMP / Ca2+ Signaling PathwayFinder	26	-3,09	0,0028	11,5	-1,60	0,0747	7,5
humanpaths	Cardiovascular Disease	20	-3,69	<0,0001	10,0	-1,47	0,0772	9,5
humanpaths	G-Protein Coupled Receptors Signaling PathwayFinder	22	-4,04	<0,0001	9,0	-1,28	0,0844	13,0
humanpaths	Signal Transduction in Cancer	22	-2,88	0,0052	13,0	-1,42	0,0771	11,0
humanpaths	JAK / STAT Signaling Pathway	20	-2,14	0,0389	14,0	-0,90	0,1429	14,0

Leyenda. Las vías estadísticamente significativas se encuentran a través del contraste de una hipótesis estadística básica propuesta por *Tian y cols. (2005)* para determinar si un conjunto determinado de genes pertenecientes a una vía presenta una asociación coordinada con el fenotipo de interés. Las dos hipótesis nulas que se contrastan son las siguientes: los genes de un conjunto determinado muestran los mismos patrones de asociación con el fenotipo respuesta comparado con el resto de los genes (*Q1*). El conjunto de genes no contiene ningún gen cuyos niveles de expresión se asocian con el fenotipo de interés (*Q2*). De esta forma, dos estadísticos se desarrollan, uno por cada hipótesis, y para conseguir una significación estadística cada estadístico se compara contra la distribución bajo la hipótesis nula. *Tamaño del conjunto* es el número de genes en la lista original comprendido en la vía correspondiente. *NTk Stat* es el valor del estadístico correspondiente a la hipótesis *Q1*. *NTk q-valor* es el p valor ajustado correspondiente a la hipótesis *Q1*. *NTk Rank* es la posición correspondiente a la hipótesis *Q1*. *NEk* Stat* es el valor del estadístico correspondiente a la hipótesis *Q2*. *NEk* q-valor* es el p valor ajustado correspondiente a la hipótesis *Q2*. *NEk* Rank* es la posición correspondiente a la hipótesis *Q2*. La posición global se obtiene sumando la posición correspondiente a las hipótesis *Q1* y *Q2*.

Estos resultados con *microarrays* sugieren una activación de la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 en los no respondedores al IFN β , que parece estar presente antes de iniciar tratamiento.

Validación de los resultados con microarrays a tiempo basal mediante RT-PCR a tiempo real

Dada la tasa elevada de falsos positivos asociada con la tecnología de *microarrays*, el siguiente paso en el estudio fue la validación de los genes expresados diferencialmente obtenidos con los *microarrays* mediante una técnica alternativa de mayor sensibilidad como la RT-PCR a tiempo real.

Tal y como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 9), la mayoría de los genes expresados diferencialmente obtenidos con los *microarrays* se validaron por PCR, observándose una mayor expresión en no respondedores con diferencias en la expresión que variaron entre 1,6 y 5.

Tabla 9

Nombre del gen	$\Delta\text{Ct R}$	$\Delta\text{Ct NR}$	$2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$	P valor
RASGEF1B	15,66	14,69	1,95	0,0119
IRF5	16,69	16,42	1,21	0,2056
IFIT3*	21,10	19,59	2,86	0,0042
IL1RN	17,77	16,68	2,13	0,0006
IFIT1*	20,86	18,95	3,75	0,0006
EGR3	20,50	18,41	4,25	0,0003
ATXN1	18,84	18,72	1,09	0,5306
MARCKS	16,20	15,46	1,68	0,0012
CXCL10	23,19	20,90	4,87	0,0005
OASL*	19,64	18,45	2,28	0,0025
H1FO	14,41	14,16	1,19	0,4461
STAT1	15,51	14,67	1,80	0,0026
IFIT2*	19,66	18,01	3,14	0,0022
TNF	18,12	16,92	2,30	0,0069
APOL6	17,16	16,53	1,55	0,0067
IL1B	18,79	16,73	4,16	0,0041
CCR1	17,28	16,43	1,80	0,0003
OAS2	20,41	20,01	1,32	0,3325
RSAD2*	20,55	19,25	2,46	0,0060
CXCL2	22,12	20,35	3,41	0,0035
DDX58	18,82	18,19	1,55	0,0673
IL8	13,93	13,79	1,10	0,8851
IER3	17,11	15,99	2,17	0,0017
PPP1R15A	16,44	15,52	1,90	0,0367
PBEF1	17,26	16,19	2,10	0,0162
PTX3	19,88	18,94	1,91	0,0061
HERC5	19,82	18,76	2,09	0,0106
PNPT1*	19,95	19,20	1,68	0,0035
CD83	16,98	16,36	1,53	0,1425
NFKBIZ	17,22	16,32	1,86	0,0180
ATF3	21,18	19,87	2,49	0,0259
OAS3*	17,56	16,67	1,85	0,0092

Tabla 9 (continuación)

Nombre del gen	$\Delta\text{Ct R}$	$\Delta\text{Ct NR}$	$2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$	P valor
PTGDS	18,05	18,24	0,88	0,6303
CDC42	15,46	15,27	1,13	0,3600
IFI44*	19,49	18,24	2,39	0,0009
PARP9	19,59	18,99	1,52	0,0507
ISG15*	19,09	18,04	2,08	0,0059
LILRA5	19,85	19,34	1,43	0,1507

Leyenda. La RT-PCR a tiempo real se llevó a cabo en muestras de ARN total obtenidas a tiempo basal en 24 respondedores y 16 no respondedores al IFN β . Entre los genes validados por RT-PCR, aquéllos que se inducen por los IFNs de tipo 1 por literatura ó que se encontraron regulados de forma significativa por el IFN β en el presente estudio se representan en negrita. Los genes inducidos de forma preferente o selectiva por los IFNs de tipo 1 se representan con un asterisco. Los ΔCt (delta Ct) se calcularon como el valor medio de todos los ΔCt obtenidos para cada gen en cada grupo. $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ representa el cambio de expresión génica normalizado con el control endógeno y relativo a los respondedores. P valor: se refiere a los p valores obtenidos tras comparar los ΔCt medios entre respondedores y no respondedores mediante una prueba t de Student-Fisher. R: respondedores; NR: no respondedores. Los valores de p estadísticamente significativos se muestran en negrita.

Una vía de señalización de los IFNs de tipo 1 menos inducible se asocia con la falta de respuesta al IFN β

A continuación se analizaron los cambios en la expresión génica inducidos por el IFN β durante los 3 primeros meses de tratamiento en respondedores y no respondedores, mediante la comparación de los cambios en expresión génica obtenidos a tiempo basal y a los 3 meses de tratamiento. Tal y como se muestra en la tabla del Anexo 2, 43 genes se encontraron diferencialmente expresados entre los dos grupos. Cabe resaltar que las

mayores diferencias se observaron en genes que se inducen de forma predominante o selectiva por los IFNs de tipo 1. Un porcentaje alto de genes inducidos por el IFN β tras 3 meses de tratamiento también se encontraron diferencialmente expresados a tiempo basal (genes mostrados en negrita).

Validación de los resultados con microarrays tras 3 meses de tratamiento mediante RT-PCR a tiempo real

Al igual que a tiempo basal, los cambios en la expresión génica inducidos por el IFN β en los 3 primeros meses de tratamiento se validaron mediante PCR a tiempo real en un subgrupo de genes. Los resultados de dicha validación se encuentran resumidos en la Tabla 10.

Es importante destacar que para la mayoría de los genes estudiados por PCR, en los respondedores el tratamiento con IFN β se asoció con una fuerte inducción en la expresión génica, con diferencias comprendidas entre 3 a 120 obtenidas tras comparar las muestras de 3 meses y las de tiempo basal. De forma contraria, en los no respondedores, la magnitud de los cambios en la expresión génica inducidos por el IFN β fue mucho menor comparado con el grupo de respondedores, y no alcanzó significación estadística para ninguno de los genes (Tabla 10).

Estos hallazgos indican que los no respondedores presentan una vía de señalización de los IFNs de tipo 1 activada en células de sangre periférica que es refractaria a la administración de IFN β exógeno.

Tabla 10

Gen	Respondedores				No respondedores			
	$\Delta\text{Ct t=0}$	$\Delta\text{Ct t=3}$	$2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$	P valor	$\Delta\text{Ct t=0}$	$\Delta\text{Ct t=3}$	$2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$	P valor
IFIT3	21,50	15,82	51,21	0,0240	19,39	18,43	1,95	0,5248
IFIT1	21,52	14,83	103,69	0,0234	18,62	17,58	2,05	0,4726
RASGEF1B	15,66	14,87	1,73	0,0876	14,70	13,98	1,64	0,3512
IFIT2	19,88	14,73	35,49	0,0091	17,53	17,58	0,97	0,9656
IFI44	19,81	15,24	23,73	0,0332	18,68	16,91	3,40	0,1683
OASL	20,16	15,94	18,52	0,0113	18,55	17,45	2,14	0,2993
CXCL10	23,27	16,31	124,22	0,0004	20,25	19,84	1,33	0,7998
RSAD2	20,66	15,77	29,68	0,0063	19,68	18,36	2,49	0,3801
OAS2	20,24	17,01	9,41	0,0206	20,26	19,13	2,19	0,3308
ISG15	19,35	14,20	35,54	0,0076	18,30	16,30	4,01	0,1377
MARCKS	16,32	14,09	4,67	0,0136	15,96	15,39	1,48	0,2319
HERC5	19,96	16,00	15,47	0,0037	19,21	18,21	2,00	0,4301
STAT1	15,32	13,12	4,60	0,0339	15,31	14,39	1,89	0,3166
IL1RN	18,05	14,97	8,46	0,0048	16,54	15,91	1,55	0,2412
BIRC4BP	16,84	13,96	7,37	0,0201	16,48	15,57	1,88	0,3706
IFIH1	18,26	15,86	5,30	0,0182	17,75	17,38	1,30	0,5349
EIF5	14,41	15,07	0,63	0,0927	15,42	15,00	1,34	0,2258
DDX58	18,98	15,81	9,00	0,0681	18,57	17,29	2,42	0,2107
PARP9	19,44	16,04	10,51	0,0435	19,43	17,42	4,03	0,1427
MX1	16,55	12,23	20,00	0,0072	16,12	14,34	3,42	0,2615
TNF	18,11	16,54	2,98	0,0484	16,90	16,49	1,33	0,2603
GBP1	18,01	14,78	9,34	0,0509	17,50	16,24	2,39	0,1414
OAS3	17,46	13,53	15,25	0,0250	17,36	15,74	3,09	0,2757
PBEF1	17,37	15,51	3,64	0,0019	16,71	15,80	1,88	0,2280

Leyenda. Los niveles de expresión génica se determinaron mediante RT-PCR a tiempo basal ($\Delta\text{Ct t=0}$) y tras 3 meses de tratamiento ($\Delta\text{Ct t=3}$) en muestras de ARN total de 4 no respondedores y 3 respondedores al IFN β . ΔCt se calcularon como el valor medio de todos los ΔCt obtenidos para cada gen en cada grupo. $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ representa el cambio de expresión génica normalizado con el control endógeno y relativo a los respondedores. P valor: se refiere a los p valores obtenidos tras comparar los ΔCt medios entre

respondedores y no respondedores mediante una prueba t de Student para datos pareados. Los p valores inferiores a 0,05 se muestran en negrita.

Los genes inducidos por los IFNs de tipo 1 son los que mejor predicen la respuesta al tratamiento con IFN β

Uno de los principales objetivos de este estudio fue analizar si los cambios inducidos por el IFN β en los 3 primeros meses de tratamiento podían predecir la respuesta al IFN β tras 24 meses. Se aplicó un algoritmo de predicción comparando varios predictores en un proceso iterativo con validación cruzada. De los diferentes métodos aplicados, el k-vecino más cercano (kNN) con 1 vecino fue el predictor que presentó el error de clasificación más bajo, y la Tabla 11 muestra los 8 genes que mejor discriminaron entre respondedores y no respondedores tras aplicar dicho predictor. Cabe destacar que 5 de los 8 genes que mejor predicen la respuesta al IFN β se inducen de forma predominante o selectiva por los IFNs de tipo 1 (mostrados en negrita).

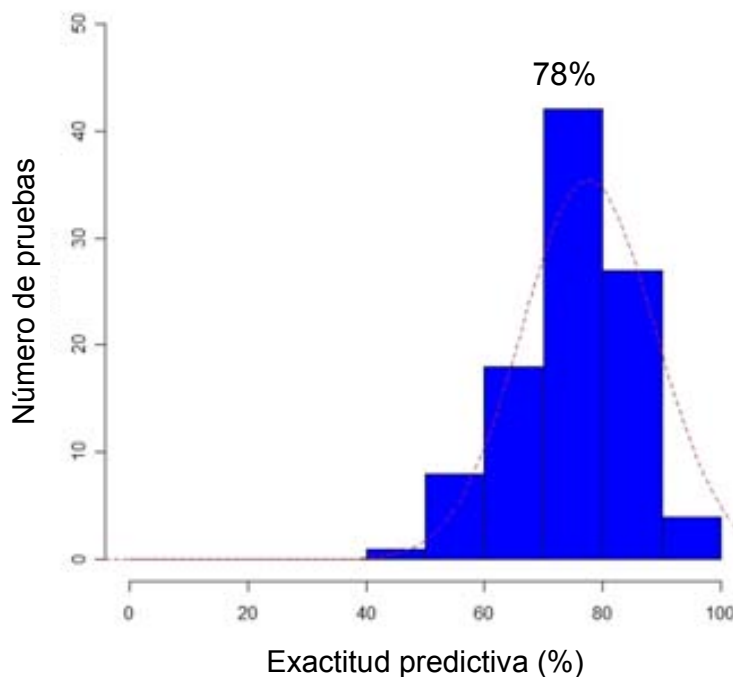
Tabla 11

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen
229450_at	IFIT3
204747_at	IFIT3
230233_at	RASGEF1B
203153_at	IFIT1
205660_at	OASL
214059_at	IFI44
217502_at	IFIT2
208962_s_at	FADS1
210797_s_at	OASL
201670_s_at	MARCKS

Leyenda. Lista de genes que mejor discriminan entre respondedores y no respondedores al IFN β . Un total de 6.410 genes de los 54.675 iniciales pasaron el filtrado inespecífico en su expresión entre el tiempo basal y los 3 meses. Tras aplicar un algoritmo de predicción a este conjunto de genes, el k-vecino más cercano con un vecino y los 8 genes (10 sondas) que figuran en la tabla se seleccionaron como el método y el número de genes que presentaron el error de clasificación más bajo ($\square=0,3083$). Dicho error de clasificación se calculó como la media de 10 pasos iterativos de validación cruzada en los cuales 9 décimas partes de los datos se emplearon como conjunto de entrenamiento y la restante décima parte se empleó como conjunto de validación, para calcular el error de clasificación.

Como se observa en el histograma de la siguiente figura (Figura 5), la exactitud predictiva media que se obtuvo con estos 8 genes tras aplicar 100 veces de forma aleatoria el predictor k-vecino más cercano con un vecino fue de cerca del 80%, e indica que la respuesta clínica al tratamiento con IFN β se puede predecir de forma temprana.

Figura 5



Leyenda. Histograma mostrando la exactitud predictiva media de los genes que mejor predicen la respuesta al IFN β tras realizar particiones aleatorias. Para calcular el histograma, se aplicó un método iterativo de 100 particiones aleatorias en la muestra original y genes filtrados. En cada partición aleatoria, $\frac{3}{4}$ partes se emplearon para construir un predictor usando el k-vecino más cercano con un vecino y los 8 genes de la Tabla 11 (las 10 sondas). Este predictor se aplicó al $\frac{1}{4}$ restante de los pacientes para calcular la exactitud predictiva media en las 100 pruebas. La exactitud predictiva media de todas las particiones aleatorias fue del 78%, la cual se usó para generar una aproximación normal a los datos de predicción, que se encuentra representada en la Figura mediante una línea discontinua. Un test realizado con 500 particiones aleatorias no mostró diferencias respecto al presentado.

Validación de los resultados con microarrays en una cohorte independiente de respondedores y no respondedores al IFN β

Con el objetivo de validar los resultados obtenidos con *microarrays*, se identificó una cohorte independiente de 30 pacientes con EMRR que se clasificó en respondedores (n=15) y no respondedores (n=15) al IFN β en base a los mismos criterios clínicos que en la cohorte original. Las características demográficas y clínicas basales se muestran en la siguiente tabla:

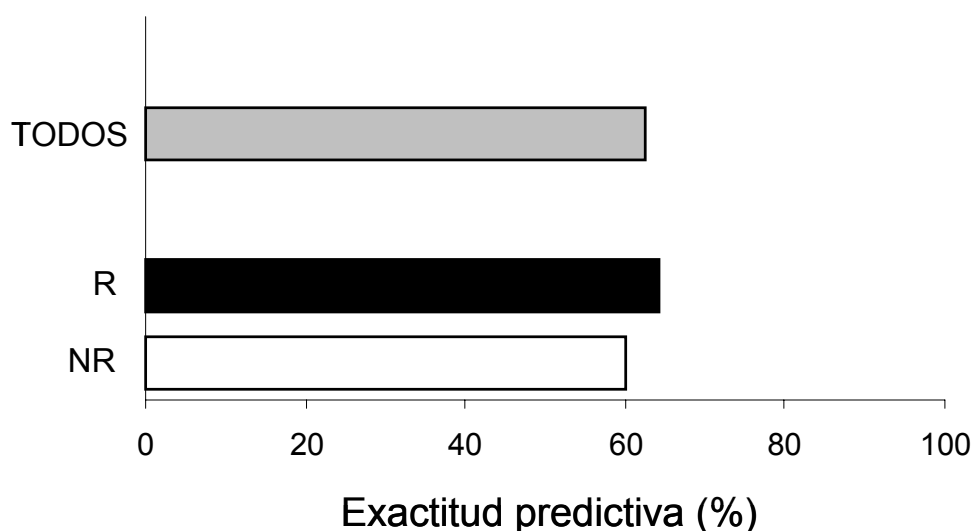
Tabla 12

Características	Respondedores	No respondedores
n (%)	15 (50,0)	15 (50,0)
Edad (años)	32,7 (7,6)	35,5 (8,8)
Mujer/hombre (% mujeres)	11 / 4 (73,3)	10 / 5 (66,7)
Duración de la enfermedad (años)	2,3 (1,5)	5,5 (4,6)
EDSS ^a	1,6 (1,0-2,0)	2,3 (1,5-3,5)
Número de brotes en los dos años previos	2,1 (0,7)	2,3 (0,9)
Tipo de IFN β administrado [n (%)]		
IFN β 1a IM	3 (20,0)	6 (40,0)
IFN β 1b SC	5 (33,3)	4 (26,7)
IFN β 1a SC	7 (46,7)	5 (33,3)

Leyenda. Datos expresados como valores medios (desviación estándar). ^aDatos expresados como mediana (rango intercuartil). EDSS: escala de estado de la discapacidad ampliada. IFN β : interferón-beta. IM: intramuscular. SC: subcutáneo.

En estos pacientes, a partir de CMSP se extrajo ARN total y el perfil de expresión génica se determinó a tiempo basal y a los 3 meses de tratamiento empleando los mismos *microarrays* que en la cohorte original (*Affymetrix® Human Genome U133 Plus 2.0*). Tal y como muestra la siguiente figura (Figura 6), la exactitud predictiva media que se obtuvo con los 8 genes que mejor predicen la respuesta al IFN β (Tabla 11) tras aplicar el método del k-vecino más cercano con un vecino fue del 63%, siendo similar en respondedores y no respondedores al IFN β .

Figura 6

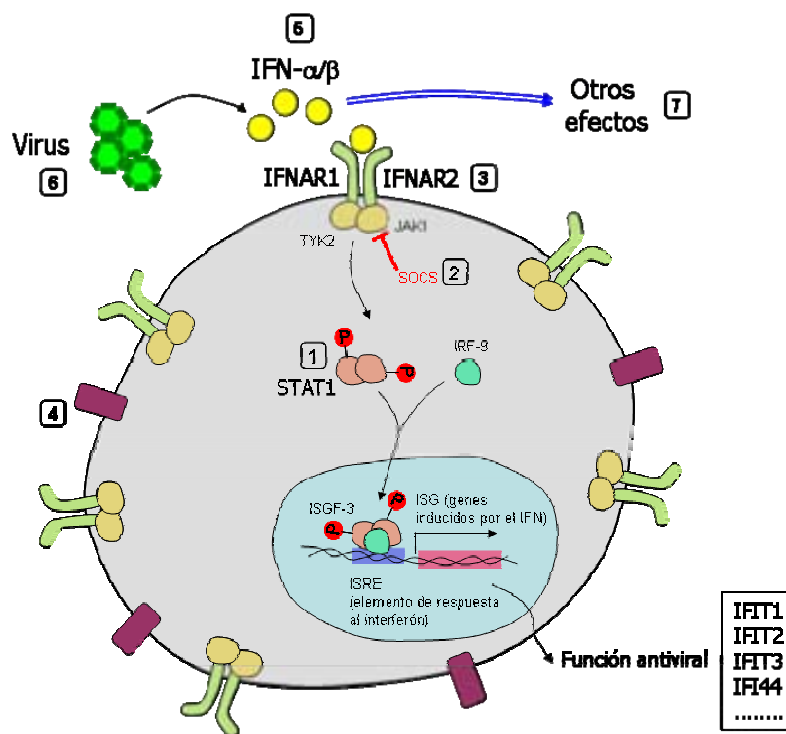


Leyenda. Gráfico que muestra las exactitudes predictivas medias en una cohorte independiente de validación formada por 30 pacientes con EMRR, 15 respondedores y 15 no respondedores al IFN β . “Todos” se refiere a la exactitud predictiva media en los 30 pacientes. R: respondedores. NR: no respondedores.

Estudios mecanísticos de respuesta al IFN β

Los resultados obtenidos con los *microarrays* apuntan a una implicación de la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 en la respuesta al IFN β . Por este motivo, se diseñaron varios experimentos mecanísticos usando principalmente CMSP y suero de respondedores y no respondedores obtenidos antes del tratamiento, con la finalidad de conseguir una mejor caracterización de la implicación de esta vía en la respuesta al IFN β . La siguiente figura (Figura 7) ilustra la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 e indica los diferentes niveles a lo largo de la vía en los que se llevaron a cabo dichos estudios mecanísticos.

Figura 7



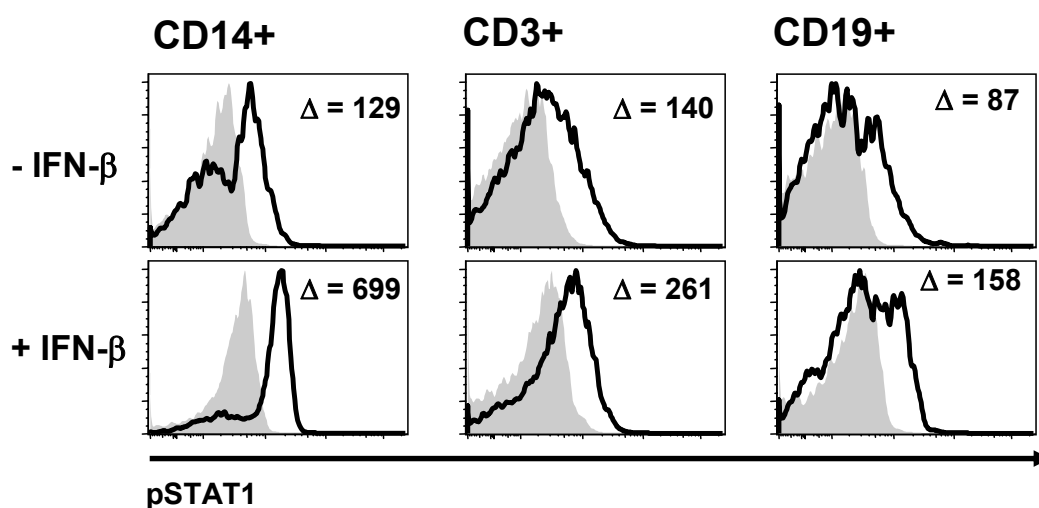
Leyenda. Vía de señalización de los IFNs de tipo 1 que muestra los diferentes niveles en los que se realizaron los siguientes experimentos mecanísticos: 1/ Fosforilación de STAT1. 2/ Expresión de reguladores negativos de la vía de los IFNs de tipo 1. 3/ Expresión de los receptores de los IFNs de tipo 1. 4/ Expresión de marcadores de activación. 5/ Cuantificación de los IFNs de tipo 1. 6/ Detección de ADN viral. 7/ Otros efectos de los IFNs de tipo 1.

1. Fosforilación de STAT1

Los pacientes no respondedores al IFN β muestran un incremento en la fosforilación de STAT1 que afecta de forma selectiva a monocitos de sangre periférica.

La activación del receptor mediada por los IFNs de tipo 1 activa proteínas tirosín-kinasas de la familia JAK, las cuales, a su vez, fosforilan proteínas STAT, incluyendo STAT1. Para evaluar si la expresión diferencial de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 entre respondedores y no respondedores se debía a una alteración en la señal mediada a través del receptor del IFN (IFNAR), la fosforilación de STAT1, como marcador de la respuesta inducida por el IFN a nivel celular, se analizó mediante citometría de flujo tras añadir IFN β *in vitro*. Tal y como se muestra en la Figura 8, la estimulación de CMSP con IFN β condujo a un incremento sustancial de los niveles de STAT1 fosforilados en monocitos, células T y células B. Los monocitos mostraron los niveles más altos de STAT1 fosforilado inducidos por IFN β .

Figura 8



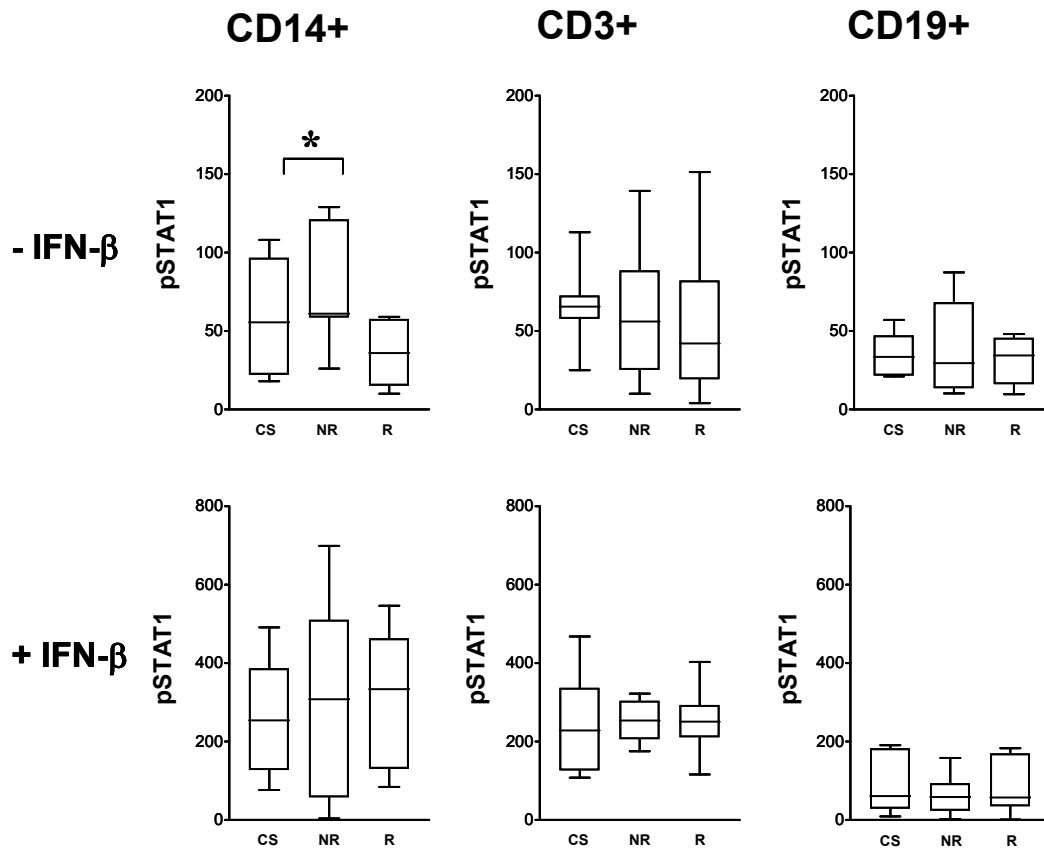
Leyenda. Los niveles de STAT1 fosforilado basales (-IFN- β) e inducidos por IFN β (+IFN- β) se cuantificaron mediante citometría de flujo tras tinción intracelular en monocitos (CD14+), células T (CD3+), y células B (CD19+). La estimulación de CMSP con IFN β -1a recombinante (10.000 UI/ml) durante 20

minutos produjo un incremento sustancial en los niveles de STAT1 fosforilados en los 3 subtipos celulares, presentando los monocitos los niveles más altos. Los resultados se muestran como media geométrica de intensidad de fluorescencia (Δ). pSTAT1: STAT1 fosforilado.

Cuando los niveles de STAT1 fosforilado inducidos por IFN β se compararon entre respondedores, no respondedores, y un grupo de controles sanos, no se observaron diferencias significativas entre grupos, hallazgo que sugiere que la maquinaria de señalización a través del IFNAR no está alterada en los no respondedores al IFN β (paneles inferiores de la Figura 9). Sin embargo, cuando los niveles de STAT1 fosforilado se compararon a tiempo basal, antes de añadir IFN β , éstos se encontraron aumentados de forma estadísticamente significativa en no respondedores respecto a los respondedores. Es importante destacar que este hallazgo tan sólo se observó en la población de monocitos de sangre periférica (CD14+), pero no en células T (CD3+) ó células B (CD19+) (paneles superiores de la Figura 9).

Aunque no se observaron diferencias en los niveles de STAT1 fosforilado tras añadir IFN β , es importante mencionar que cuando se analizó el grado de inducción de STAT1 fosforilado mediante la comparación de los niveles a tiempo basal y tras añadir IFN β in vitro, se observó una inducción más fuerte y estadísticamente significativa de los niveles de STAT1 fosforilado en los respondedores [magnitud del incremento (Δ)=9; p=0,01; test de Wilcoxon] y controles sanos (Δ =4,5; p=0,04) comparado con los no respondedores (Δ =4,5; p=0,06). Estos resultados están en concordancia con la diferencia en los niveles de expresión génica de *STAT1* obtenidos al comparar las muestras tratadas con las de tiempo basal entre respondedores y no respondedores (Tabla 10), y sugieren que la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 se encuentra activada antes del tratamiento con IFN β en monocitos de pacientes no respondedores, y presenta una inducción alterada tras el tratamiento en dicho grupo.

Figura 9



Leyenda. Los niveles basales de STAT1 fosforilado se encuentran aumentados de forma significativa en monocitos de pacientes que presentan una mala respuesta al IFN β comparado con los pacientes con buena respuesta al mismo (*p=0,01; prueba U de Mann Whitney). HD: controles sanos (n=10). NR: no respondedores (n=10). R: respondedores (n=10).

2. Expresión de reguladores negativos de la vía de los IFNs de tipo 1

La activación de la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 en no respondedores no se debe a una expresión deficiente de genes que regulan de forma negativa dicha vía.

Los genes *SOCS1*, *SOCS3*, y *PIAS1* codifican proteínas que tienen por funciones la regulación negativa de la vía de señalización de los IFNs de tipo 1. Para evaluar si las alteraciones que se observan en la vía de los IFNs de tipo 1 se debían a una menor expresión de estos genes, sus niveles de ARNm

se determinaron mediante RT-PCR a tiempo real en respondedores y no respondedores. Tal y como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 13), los niveles de expresión basales de *SOCS1*, *SOCS3*, y *PIAS1* fueron similares entre los dos grupos, descartándose una expresión deficiente de dichos genes como la causa de la activación de la vía de los IFNs de tipo 1 que se observa en los no respondedores.

Tabla 13

Nombre del gen	$\Delta\text{Ct R}$	$\Delta\text{Ct NR}$	$2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$	P valor
SOCS1	15,84	15,84	1	0,9913
SOCS3	14,30	14,16	1,11	0,6789
PIAS1	17,73	17,36	1,28	0,0675

Leyenda. Los niveles de expresión basal de *SOCS1*, *SOCS3*, y *PIAS1* se determinaron mediante RT-PCR a tiempo real en muestras de ARN total de 14 respondedores y 15 no respondedores al IFN β . ΔCt se calcularon como el valor medio de todos los ΔCt obtenidos para cada gen en cada grupo. $2^{(-\Delta\Delta\text{Ct})}$ representa el cambio de expresión génica normalizado con el control endógeno y relativo a los respondedores. P valor: se refiere a los p valores obtenidos tras comparar los ΔCt medios entre respondedores y no respondedores mediante una prueba t de Student-Fisher. R: respondedores; NR: no respondedores.

3. Expresión de los receptores de los IFNs de tipo I

Una expresión diferencial de IFNAR1 en monocitos se asocia con una respuesta diferente al IFN β

Todos los IFNs de tipo 1 se unen a un receptor común presente en la superficie de las células, que se conoce con el nombre de receptor de los IFN de tipo 1 (IFNAR), el cual es un heterodímero formado por dos subunidades, IFNAR1 e IFNAR2. Con la finalidad de estudiar si la alteración en la vía de los IFNs de tipo 1 que se observa en no respondedores se asociaba con cambios en la expresión de los receptores de los IFNs de tipo 1, los niveles de

expresión de IFNAR1 e IFNAR2 se investigaron mediante citometría de flujo en diferentes poblaciones celulares (monocitos, células B, células T, células dendríticas mieloides y células dendríticas plasmacitoides).

Tal y como se observa en la siguientes figuras (Figuras 10 y 11), los niveles de expresión de IFNAR1 e IFNAR2 fueron en conjunto bajos en las poblaciones de células T y células B, con porcentajes de células positivas inferiores al 2% para IFNAR1 (Figura 10), e inferiores al 20% para IFNAR2 (Figura 11). Sin embargo, es importante destacar que la expresión de IFNAR1 se encontró aumentada de forma significativa en no respondedores comparado con respondedores. Al igual que se observó con la fosforilación de STAT1, estos hallazgos se encontraron única y exclusivamente en la población de monocitos de sangre periférica (CD14+) de pacientes no respondedores, pero no en otras poblaciones celulares investigadas tales como las células B, células T, o las dos subpoblaciones principales de células dendríticas, mieloides o plasmacitoides (Figura 10). El porcentaje de células positivas para IFNAR2 en monocitos fue similar entre respondedores y no respondedores al IFN β (Figura 11). De forma similar, tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en la expresión de IFNAR2 en las restantes poblaciones celulares estudiadas (Figura 11).

Figura 10

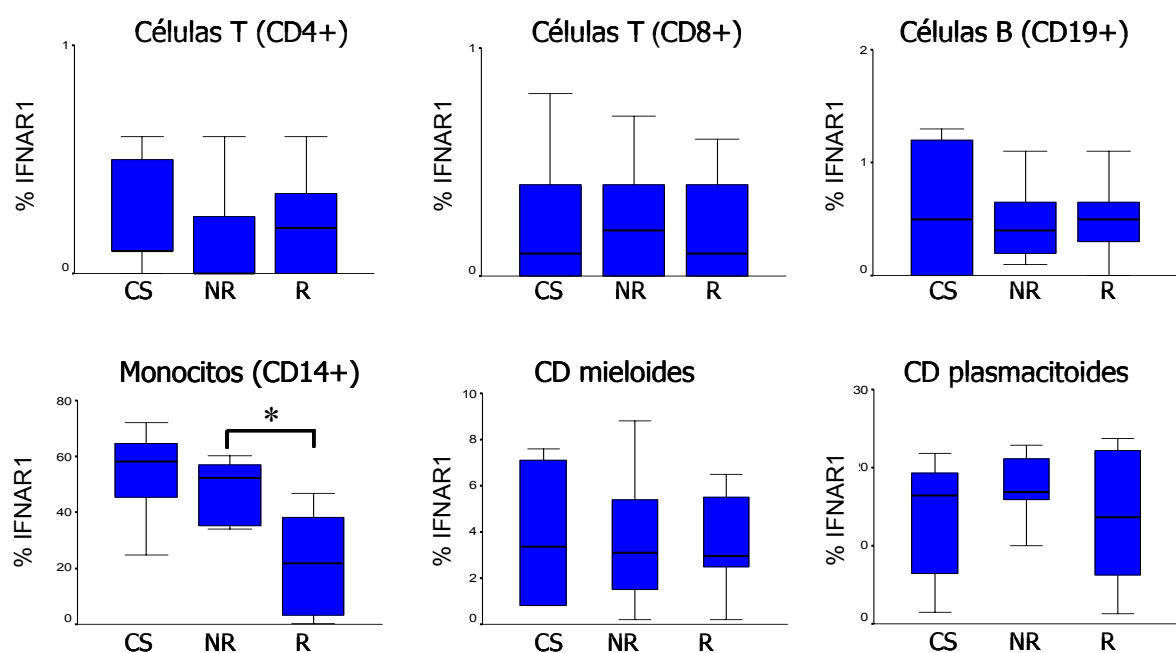
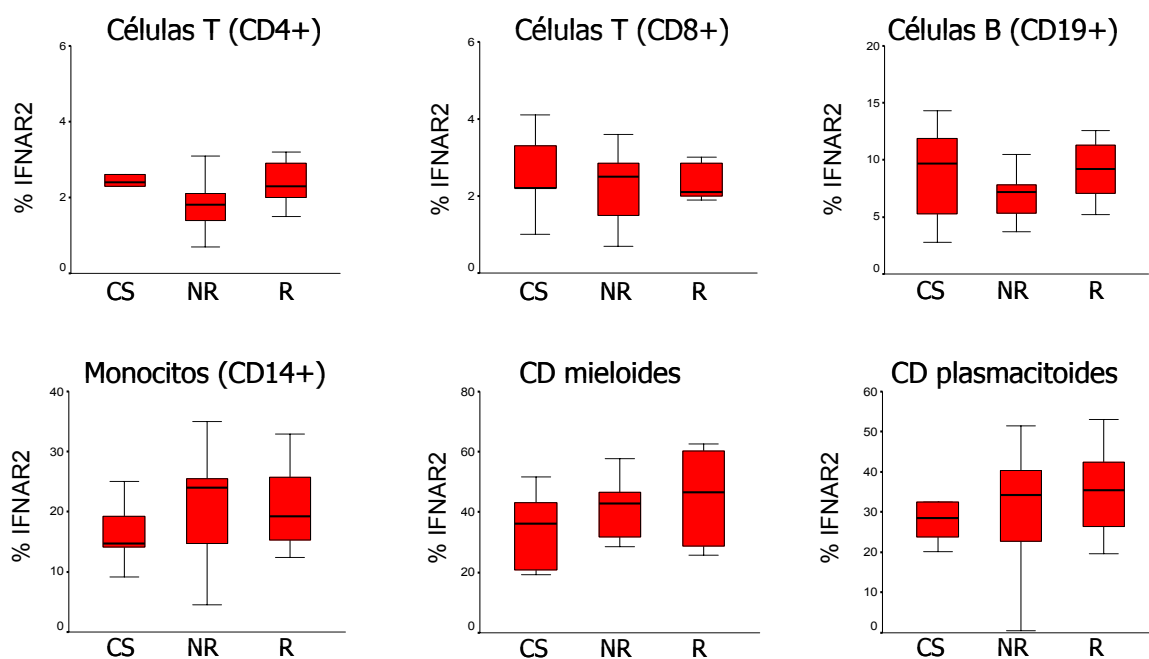


Figura 11



Leyendas. Expresión basal de IFNAR1 e IFNAR2 en diferentes poblaciones celulares. Diagramas de cajas mostrando los porcentajes medios de células positivas que expresan IFNAR1 e IFNAR2 en no respondedores (n=11), respondedores (n=11), y controles sanos (n=9). La expresión de IFNAR1 en monocitos de no respondedores se encontró aumentada de forma significativa comparado con respondedores (*p=0,008; prueba U de Mann Whitney), y fue similar a la expresión de IFNAR1 observada en controles sanos. CS: controles sanos. NR: no respondedores. R: respondedores. CD: células dendríticas.

4. Expresión de marcadores de activación

La mayor expresión de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 en no respondedores no es secundaria a una activación celular

El siguiente paso fue evaluar si la mayor expresión de genes de respuesta a los IFNs de tipo 1 en los pacientes no respondedores podría tener lugar en el contexto de una activación global de monocitos, ya sea de forma aislada o junto con otras células del sistema inmune. Tal y como se muestra en la siguiente tabla (Tabla 14) no se encontraron diferencias

estadísticamente significativas entre grupos en la expresión de los marcadores de activación estudiados en monocitos ni en las otras poblaciones de CMSP. Sin embargo, es interesante mencionar que CD83 se encontró expresado en un 1,2 % de los monocitos de pacientes no respondedores pero tan sólo en un 0,1% de los monocitos de pacientes respondedores. Esta diferencia, aunque no alcanzó significación estadística, está en consonancia con la mayor transcripción observada para CD83 en no respondedores, y podría indicar que una fracción importante de monocitos de no respondedores ha recibido estímulos de diferenciación hacia células dendríticas.

Tabla 14

Población		Marcadores		CS	NR	R
Monocitos	CD64	%		98,1 (1,5)	98,0 (0,7)	97,7 (1,7)
			IMF	1312,6 (417,3)	1228,2 (433,9)	1187,9 (275,0)
	HLA-ABC	%		99,4 (0,2)	99,2 (0,3)	99,3 (0,3)
			IMF	12764,4 (2485,4)	11146,4 (3092,8)	11572,9 (3563,3)
	HLA-DR	%		98,2 (1,1)	95,5 (3,6)	96,2 (1,8)
			IMF	4801,0 (1641,5)	3776,6 (756,9)	3830,1 (1347,4)
	CD86	%		97,2 (1,4)	96,5 (2,2)	93,0 (5,9)
			IMF	800,4 (104,8)	749,7 (96,4)	734,3 (121,9)
	CD83	%		0,9 (1,0)	1,2 (1,6)	0,1 (0,2)
	Células T	CD4	CD25	%	8,2 (2,1)	9,6 (3,5)
CD8		CD25	%	0,3 (0,4)	0,1 (0,2)	1,4 (3,5)
Células B	CD38	%	53,6 (17,0)	52,7 (16,2)	49,3 (6,1)	

Leyenda. La expresión de marcadores de activación en monocitos, células T y células B se determinó mediante citometría de flujo. Para marcadores expresados en prácticamente todas las células de una población determinada, los resultados se expresan en porcentaje de células positivas y en IMF. Los datos representan valores medios (desviación estándar). CS: controles sanos (n=9). NR: no respondedores (n=11). R: respondedores (n=11). %: porcentaje de células positivas. IMF: intensidad media de fluorescencia.

5. Cuantificación de los IFNs de tipo 1

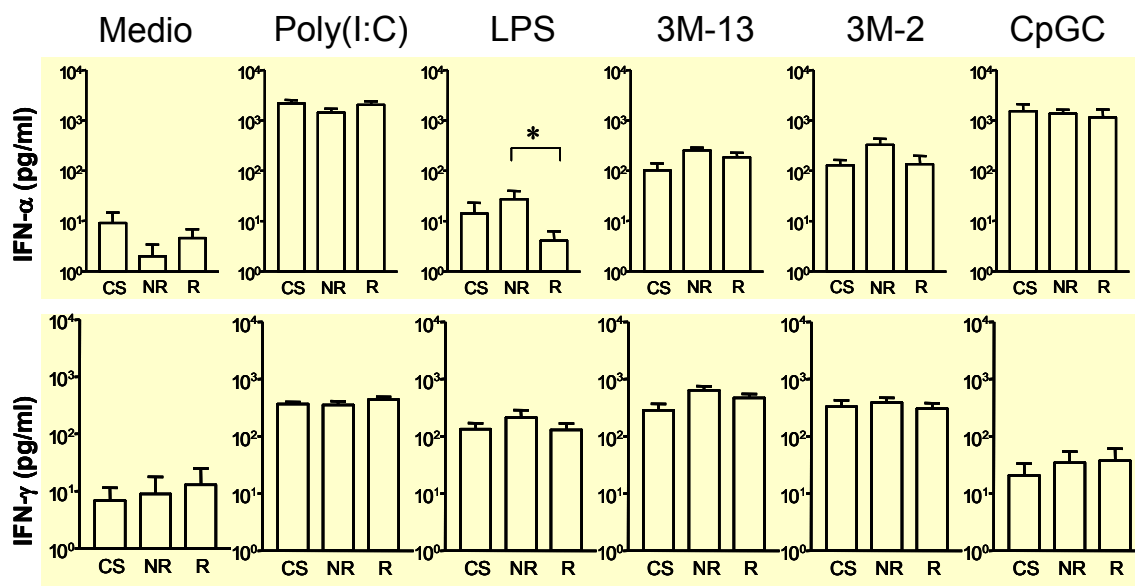
(A) La estimulación de la inmunidad innata produce respuestas de IFNs de tipo 1 mayores en no respondedores al IFN β

Muchos de los genes que se expresan con niveles más elevados en no respondedores a tiempo basal (*IL1B*, *TNF*, *STAT1*, *CXCL10*, *PTX3*, *CCR1*) sugieren una mayor activación del sistema inmune innato. Los patógenos microbianos son un estímulo potente para la inmunidad innata por medio de diferentes receptores, entre los cuales figuran los TLRs. Tras estimulación de algunos de estos receptores, los IFNs de tipo 1 actúan como principales mediadores de las respuestas inmunes innatas. Para evaluar si la mayor expresión de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 en no respondedores se podría asociar con una mayor producción de IFNs de tipo 1 tras estimulación con agonistas de los TLRs que simulan productos bacterianos y virales, las CMSP se estimularon con agonistas clásicos de los TLR3 (polyI:C), TLR4 (LPS), TLR7 (3-M13), TLR8 (3M-2), TLR9 (CpG-C), y los sobrenadantes de los cultivos se emplearon para medir las concentraciones de IFNs de tipo 1 (IFN α) y de tipo II (IFN γ). Tal y como se muestra en la siguiente figura (Figura 12), todos los ligandos de los TLRs indujeron una respuesta potente de IFNs. Es interesante remarcar que los niveles de IFN α se encontraron aumentados de forma significativa en no respondedores comparado con los respondedores tras estimulación de TLR4 con LPS. Este incremento en la producción de IFNs de tipo 1 probablemente está mediado por monocitos, debido a que: (i) no se detectaron diferencias en la producción de IFN γ tras estimulación con LPS; y (ii) porque la expresión de TLR4 por las células dendríticas plasmacitoides,

que son la principales productoras de $IFN\alpha$, es baja o ausente (Kadowaki y cols., 2001).

Estos datos sugieren que los no respondedores difieren de los respondedores en una respuesta de IFNs de tipo 1 más potente tras estimulación con TLR4.

Figura 12



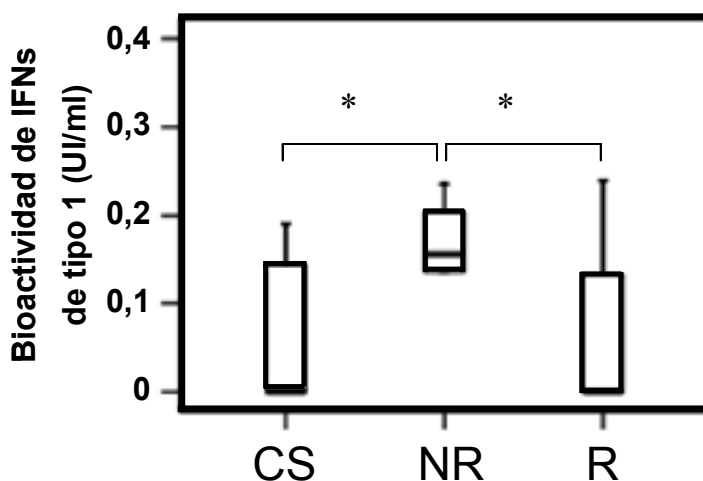
Leyenda. Producción de IFNs de tipo 1 ($IFN\alpha_2$) y de tipo 2 ($IFN\gamma$) en CMSP tras estimulación de los TLRs. Las CMSP se estimularon con agonistas de los TLR3 (Poly(I:C); 25 mg/ml), TLR4 (LPS; 1 mg/ml), TLR7 (3M-13; 1 mg/ml), TLR8 (3M-2; 1 mg/ml), y TLR9 (CpG-C; 500mM) por duplicado durante 48 horas. Los niveles de citocinas se cuantificaron en sobrenadantes mediante la técnica de ELISA. Los resultados se expresan como valores medios (error estándar de la media). La producción de $IFN\alpha_2$ tras estimulación con LPS se encuentra aumentada de forma significativa en no respondedores comparado con respondedores (* $p=0,03$, prueba U de Mann Whitney). No se encontraron diferencias significativas en la respuesta de IFNs tras estimulación con otros agonistas de los TLRs entre respondedores y no respondedores, ni tampoco respecto a controles sanos. CS: controles sanos. R: respondedores; NR: no respondedores.

(B) La bioactividad de los IFNs de tipo 1 está aumentada en suero de no respondedores al IFN β

A continuación se estudió si la mayor expresión de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 que se observa en no respondedores se asociaba con niveles endógenos aumentados de IFNs de tipo 1. Un bioensayo con gen testigo (“*reporter*”) específico para los IFNs de tipo 1 se empleó para cuantificar la bioactividad de los mismos en muestras de suero de pacientes y controles sanos obtenidas a tiempo basal. Aunque en general baja, la bioactividad de los IFNs de tipo 1 se encontró aumentada de forma significativa en no respondedores al IFN β comparado con los respondedores y con los controles sanos (Figura 13).

Estos resultados sugieren la presencia de una producción endógena de IFNs de tipo 1 aumentada en no respondedores como la causa de la expresión diferencial de genes inducidos por los IFNs de tipo 1 que se observa en estos pacientes.

Figura 13



Leyenda. Cuantificación de la bioactividad de los IFNs de tipo 1. Una línea celular promonocítica se transfirió a una placa de 96 pocillos y 25 μ l de muestras de suero de pacientes con EM y controles sanos se depositaron por duplicado en los pocillos correspondientes para cuantificar la bioactividad de los IFNs de tipo 1. Las placas finalmente se leyeron en un luminómetro

tras incubación a 37°C durante 17 horas, y la bioactividad de los IFNs de tipo 1 se cuantificó mediante extrapolación de una curva estándar generada con IFN α -2b (rango 1,5 - 25 UI/ml). La bioactividad de los IFNs de tipo 1 en suero se encuentra aumentada de forma significativa en no respondedores comparado con respondedores y controles sanos (*p=0,04 para ambos grupos; prueba U de Mann Whitney). CS: controles sanos (n=10). NR: no respondedores (n=10). R: respondedores (n=10).

6. Detección de ADN viral

El ADN viral para VEB y HHV-6 no se detecta en CMSP de no respondedores a tiempo basal

Aunque poco probable, el incremento en los niveles séricos de IFNs de tipo 1 observado en no respondedores podría ser debido a la reactivación de una infección viral crónica preexistente. Por este motivo, la carga viral de ADN para VEB y HHV-6, dos virus que se han implicado como factores etiológicos en la EM, se determinó en CMSP a tiempo basal mediante PCR a tiempo real, cuantitativa para el VEB, y cualitativa para el HHV-6. Como muestra la siguiente tabla (Tabla 15), la seroprevalencia de IgG para ambos virus se encontró elevada y fue similar entre los pacientes respondedores y no respondedores al IFN β . Por el contrario, la seropositividad para IgM fue baja o se encontró ausente en ambos grupos de pacientes. En ninguno de los pacientes seropositivos se encontraron niveles de ADN detectables para el VEB ó para el HHV-6 en CMSP a tiempo basal. Estos resultados indican que es poco probable la reactivación de una infección viral por VEB ó HHV-6 como la causa de las diferencias que se observan en la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 entre los dos grupos de pacientes, respondedores y no respondedores al tratamiento.

Tabla 15

Virus		No respondedores n (%)	Respondedores n (%)
VEB	IgG	17 (100)	24 (96)
	IgM	0	0
	Carga ADN	0	0
HHV-6	IgG	15 (88)	23 (92)
	IgM	1 (6)	1 (4)
	Carga ADN	0	0

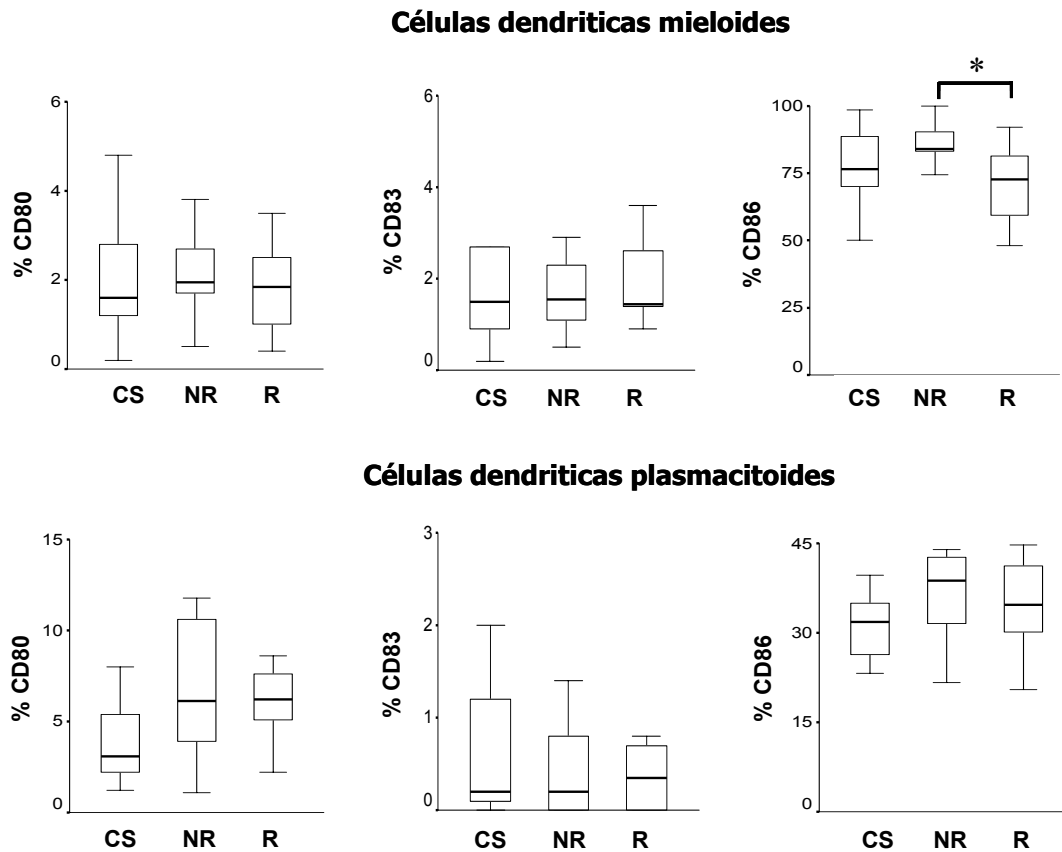
Leyenda. Las serologías IgG e IgM para VEB y HHV-6 se determinaron en 17 no respondedores y 25 respondedores. En los pacientes seropositivos, la detección del genoma viral se llevó a cabo mediante PCR a tiempo real cuantitativa para el VEB, y cualitativa para el HHV-6.

7. Otros efectos de los IFNs de tipo I

(A) Aumento en la activación de células dendríticas mieloides de no respondedores al IFN β

El último nivel de la vía de los IFNs que se exploró está relacionado con otros efectos conocidos de los IFNs de tipo 1. Por ejemplo, los IFNs de tipo 1 inducen la activación y maduración de las células dendríticas. En este sentido, para evaluar si las células dendríticas de los no respondedores diferían de los respondedores en su estado de activación, la expresión de varios marcadores de activación y maduración se determinó en las poblaciones mieloides y plasmacitoides de células dendríticas. Tal y como se mencionó anteriormente, la mayor fracción de monocitos que expresaron CD83 sugirió una diferenciación de monocitos hacia células dendríticas, y de hecho las células dendríticas mieloides de los no respondedores mostraron un aumento significativo en la expresión de CD86 comparado con los respondedores, mientras que CD80 y CD83 se expresaron en proporciones similares entre los dos grupos de pacientes (Figura 14). Estos resultados sugieren que las células dendríticas mieloides de los no respondedores están más activadas a tiempo basal que las correspondientes células de los respondedores.

Figura 14



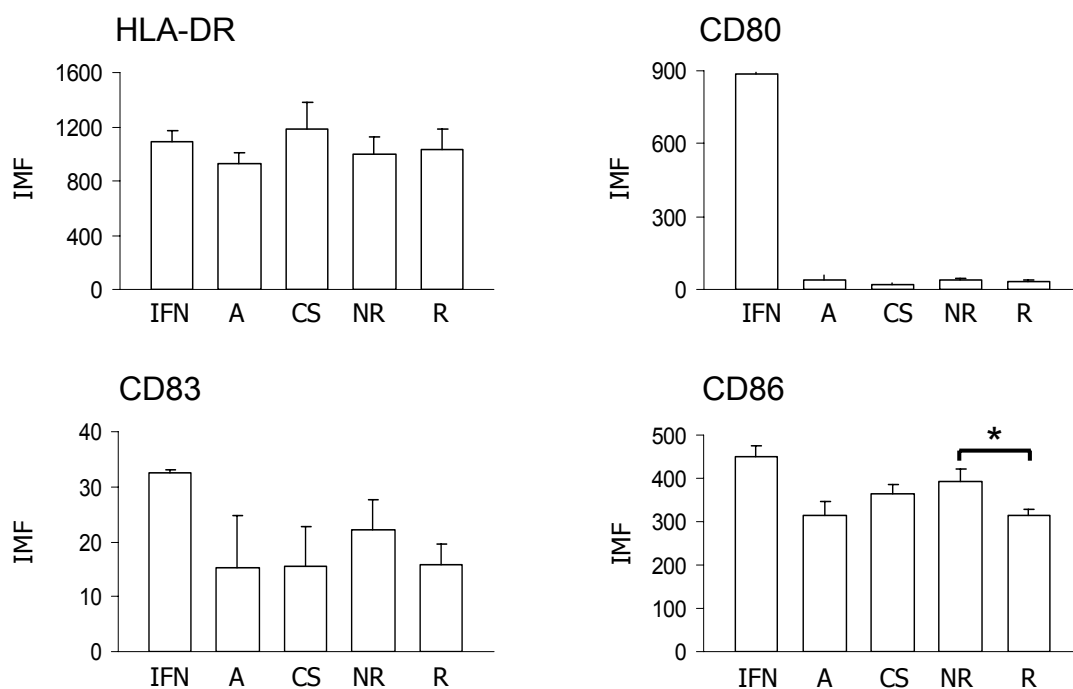
Leyenda. Diagramas de cajas mostrando la expresión de marcadores de activación (CD80 y CD86) y maduración (CD83) a tiempo basal en células dendríticas mieloides y plasmacitoides. CMSP de respondedores, no respondedores y controles sanos se incubaron con anticuerpos monoclonales contra CD11c, HLA-DR, CD86, CD80, CD83, y marcadores de linaje. Las células dendríticas mieloides se identificaron como células linaje⁻HLADR⁺CD11c⁺, mientras que las células dendríticas plasmacitoides se caracterizaron por ser linaje⁻HLADR⁺CD11c⁻. Los resultados se expresan como porcentaje medio de células positivas para cada marcador. La expresión de CD86 en células dendríticas mieloides de no respondedores está aumentada de forma significativa comparado con respondedores (*p=0,006; prueba t de Student-Fisher). CS: controles sanos (n=9). NR: no respondedores (n=10). R: respondedores (n=10).

(B) El suero de los no respondedores al IFN β induce la expresión de CD86 en monocitos

También en relación con otros efectos conocidos de los IFNs de tipo 1, comprobamos si el suero de los pacientes no respondedores favorecía la diferenciación de monocitos hacia células dendríticas mediante el cultivo de monocitos purificados de donantes sanos con suero obtenido a tiempo basal de respondedores, no respondedores, y controles sanos. Es interesante resaltar que el suero de los no respondedores indujo un incremento significativo en la expresión de CD86 de monocitos tras 3 días de cultivo comparado con los respondedores, que presentaron niveles de expresión de CD86 similares a los obtenidos con suero autólogo (corresponde al control negativo) (Figura 15). Estos hallazgos están en consonancia con la mayor expresión de CD86 observada en células dendríticas de pacientes no respondedores. Tal y como se muestra en la siguiente figura, el suero de los no respondedores también indujo un incremento en la expresión de CD83, aunque la diferencia no alcanzó significación estadística. Finalmente, no se observaron diferencias entre grupos en la expresión de CD80 ó HLA-DR.

Estos hallazgos sugieren la presencia de factores solubles en el suero de no respondedores que inducen la diferenciación de monocitos.

Figura 15



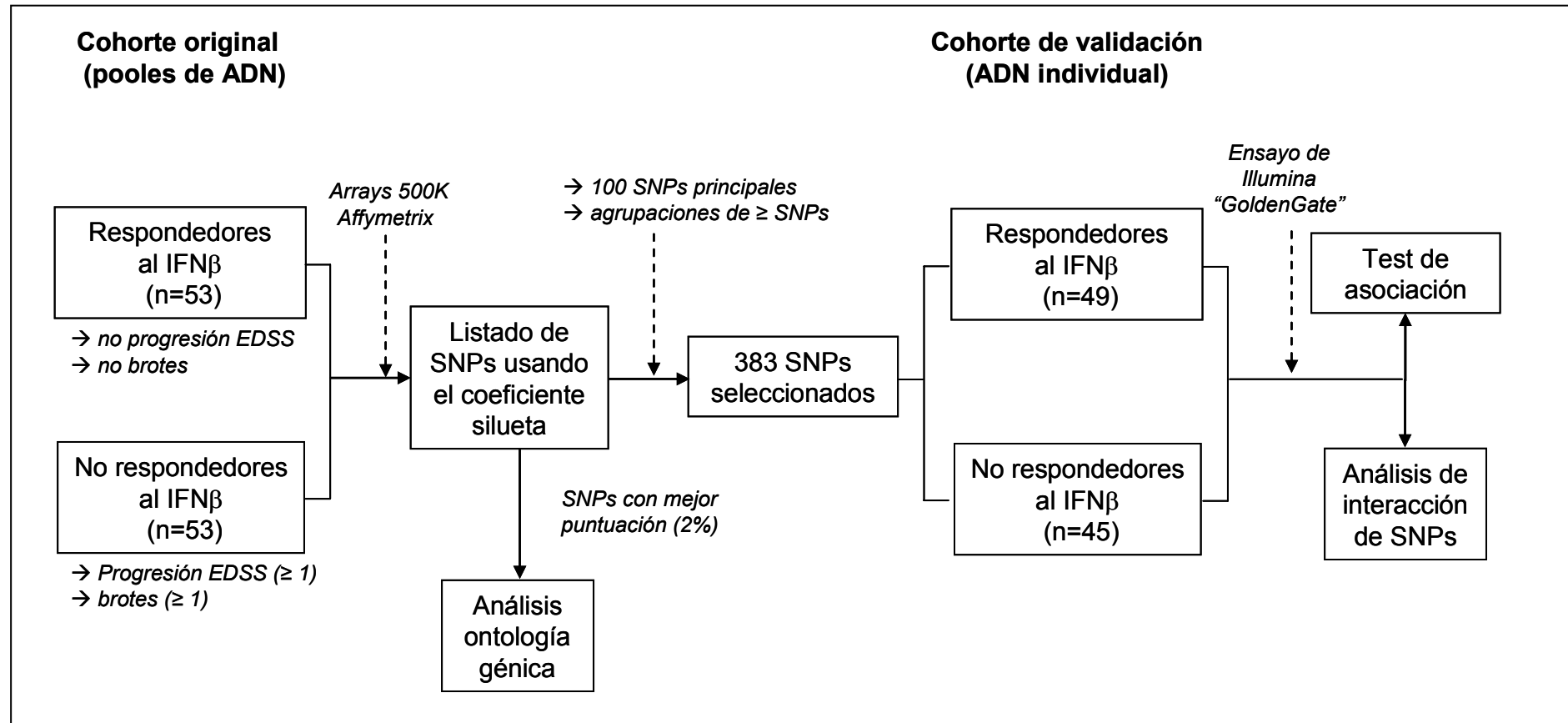
Leyenda. Inducción de la diferenciación de células dendríticas a partir de monocitos mediante suero de respondedores y no respondedores. Monocitos CD14+ purificados se cultivaron durante 3 días en las siguientes condiciones: IFN α (100 UI/ml), suero autólogo, suero de respondedores, suero de no respondedores, ó suero de controles sanos. La expresión de HLA-DR, CD80, CD86, y CD83 se determinó mediante citometría de flujo. Los resultados se expresan como valores medios (error estándar de la media) de la IMF. La expresión de CD86 en células dendríticas derivadas de monocitos se encontró aumentada tras incubación con suero de pacientes no respondedores comparado con el suero de los pacientes respondedores (*p=0,02; prueba t de Student-t-Fisher). IFN: IFN α (n=2). A: suero autólogo (n=5). CS: suero de controles sanos (n=6). NR: suero de no respondedores (n=10). R: suero de respondedores (n=10). IMF: intensidad media de fluorescencia.

7.3 Resultados en relación con el Objetivo 3

“Identificar variantes alélicas asociadas con la respuesta al tratamiento con IFN β mediante microarrays de SNPs”

Las diferentes fases que se siguieron en el diseño y análisis del estudio se encuentran ilustradas en la Figura 16, y se irán desarrollando en este apartado.

Figura 16



Leyenda. Fases del diseño y análisis del GWAS en relación con la respuesta al IFN β

Genotipado de la cohorte original mediante arrays de SNPs

En una primera fase del estudio, los *pools* de ADN de los 106 pacientes con EMRR clasificados en respondedores y no respondedores al IFN β (Tabla 3) incluidos en el estudio se hibridaron en los arrays de SNPs de 500K tal y como se describió en la sección de Métodos. Del análisis de las diferencias en las intensidades de las sondas entre los 53 respondedores y 53 no respondedores al tratamiento se obtuvo una lista de 115.232 SNPs ordenados por los p valores en relación con su asociación con el fenotipo respuesta.

Análisis de ontología génica de los principales SNPs

Con la finalidad de agrupar los SNPs candidatos por categorías funcionales, se llevó a cabo un estudio de ontología génica en los SNPs que obtuvieron mejor puntuación (2% de SNPs que mostró mayor asociación con la respuesta). Tal y como muestra la Tabla 16, la categoría de “*respuesta inmune*” relacionada con las funciones antivirales de los IFNs fue la más representada entre los SNPs candidatos que mejor discriminaron entre respondedores y no respondedores al IFN β . Los genes representativos de esta categoría fueron *ADAR* (adenosine deaminase, RNA-specific), *IFNAR2*, *NOS2* (nitric oxide synthase 2, inducible), y *OAS3* (2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa). Otras dos categorías menos representadas entre los principales SNPs fueron las vías de regulación de la IL-6 y de la GTPasa de bajo peso molecular RalA.

Tabla 16

Categorías	Proceso celular	Genes	P valor
Respuesta inmune - funciones antivirales de los IFNs	Respuesta inmune	<i>ADAR</i> , <i>IFNAR2</i> , <i>NOS2</i> , <i>OAS3</i>	0,0002
Respuesta inmune - IL6 signaling pathway	Vía de señalización mediada por citocinas y quimiocinas, respuesta inmune	<i>ADAM10</i> <i>STAT3</i>	0,03
Remodelado del citoesqueleto - vía de regulación de RalA	Señalización mediada por GTPasas de bajo peso molecular	<i>CDC42</i> , <i>PGGT1B</i>	0,03

Leyenda. Categorías funcionales más representadas entre los SNPs que presentaron una mayor asociación con el fenotipo respuesta

Genotipado individual de los SNPs seleccionados en una cohorte de validación

En una segunda fase del estudio, de la lista de SNPs obtenida tras analizar los *pooles* de ADN con el coeficiente silueta y tras aplicar los criterios de selección mencionados en el apartado de Métodos, se seleccionaron 383 SNPs para validar los resultados en una cohorte de replicación. La validación se llevó a cabo en muestras individuales de ADN de una cohorte totalmente independiente de 94 pacientes clasificados en respondedores y no respondedores utilizando una plataforma de genotipado diferente (Illumina *GoldenGate*). La Tabla 17 muestra los SNPs intragénicos que mostraron una asociación estadísticamente significativa tras genotiparse en la cohorte de validación (p valores no corregidos <0,05 tras realizar un análisis de asociación alélica). La lista completa de SNPs junto con los resultados obtenidos en la cohorte de validación se muestra en el Anexo 3.

Tal y como figura en la Tabla 17, el SNP que mostró mayor asociación con la respuesta al IFN β fue el *rs12557782*, con un p valor de $1,7 \times 10^{-3}$ y una

OR de 2,7. Este SNP reside en el cromosoma X y está localizado en el intrón 2 del gen *GRIA3*, que codifica un receptor del glutamato de tipo AMPA. A nivel de genotipo, se encontraron diferencias relacionadas con el sexo, de tal forma que la asociación con la respuesta al tratamiento se observó únicamente en mujeres (p valor: $7,0 \times 10^{-4}$; OR: 8,5), pero no en hombres (p valor: 0,56; OR: 1,7). El segundo SNP que mostró mayor asociación fue el *rs7308076*, con un p valor de $6,3 \times 10^{-3}$ y una OR de 2,4. Dicho SNP se encuentra en el gen *CIT* y codifica una proteína dependiente del ciclo celular.

Es importante resaltar que 2 de los SNPs asociados con la respuesta al tratamiento residen en genes que están directamente relacionados con la vía de los IFNs de tipo 1. Uno de ellos es el *rs2229857*, SNP que se encuentra en el gen *ADAR* y codifica una proteína que se induce por el IFN y tiene funciones antivirales. A destacar, *rs2229857* es un SNP no sinónimo que da lugar a un cambio de aminoácido en el exón 2 del gen (lisina por arginina). El otro SNP es el *rs2248202*, polimorfismo localizado en el intrón 1 del gen *IFNAR2*, que codifica una de las dos subunidades que componen el heterodímero del receptor de los IFNs de tipo 1.

Finalmente, otros SNPs intragénicos que se validaron fueron *rs733254* y *rs11787532*, localizados en los genes que codifican las proteínas de dedos de zinc *ZFAT* y *ZFHX4* respectivamente, y *rs9527281*, situado en el gen *STARD13*, que codifica la proteína activadora de una GTPasa de la familia Rho.

Los siguientes SNPs intergénicos también se asociaron con la respuesta al tratamiento tras comparación de las frecuencias alélicas entre respondedores y no respondedores al IFN β : *rs4425528* (cromosoma 5; p valor=0,0094); *rs1501173* (cromosoma 4; p valor=0,0207); *rs10424648* (cromosoma 19; p valor=0,0261); *rs274947* (cromosoma 9; p valor= 0,0261); *rs8180631* (cromosoma 6; p valor=0,0275); *rs7517690* (cromosoma 1; p valor=0,0312); *rs1948577* (cromosoma 16; p valor=0,0332); *rs11956421* (cromosoma 5; p valor=0,0348); *rs1382673* (cromosoma 12; p valor=0,0369);

rs236855 (cromosoma 6; p valor=0,0437); y *rs9297235* (cromosoma 8; p valor=0,0443). En los SNPs restantes que se genotiparon en la cohorte de validación no se observaron asociaciones estadísticamente significativas con la respuesta al tratamiento (Anexo 3).

Análisis de interacción entre SNPs

Finalmente, con el objetivo de evaluar si las combinaciones de SNPs aumentaban el grado de asociación con la respuesta al tratamiento, se realizó un análisis de interacción entre los SNPs seleccionados para la validación. No se observaron interacciones estadísticamente significativas tras realizar combinaciones de 2 o 3 SNPs.

Tabla 17

SNP	Chr.	Gen	Localiz.	Asociación alélica			Asociación genotípica		
				Alelo*	OR (IC 95%)	P valor	Genotipo*	OR (IC 95%)	P valor
rs12557782	X	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (<i>GRIA3</i>)	Intrón 2	G	2,7 (1,5-5,2)	0,0017	AG+GG	8,5 (2,2 - 32,8)	0,0007 (M)
							G	1,7 (0,3 - 9,5)	0,5623 (H)
rs7308076	12	Citron (rho-interacting, serine /threonine kinase 21) (<i>CIT</i>)	Intrón 9	C	2,4 (1,3-4,4)	0,0063	CC	3,7 (1,5 - 8,8)	0,0028
rs2229857	1	Adenosine deaminase, RNA-specific (<i>ADAR</i>)	Exon 2 (cambio A)	A	2,1 (1,1-4,0)	0,0171	AA	8,6 (1,0 - 71,7)	0,0203
rs733254	8	Zinc finger and AT hook domain containing (<i>ZFAT</i>)	Intrón 3	G	2,1 (1,1-4,0)	0,0217	GG+GT	22,4 (1,3 - 401,2) ¹	0,0020
rs9527281	13	StAR-related lipid transfer (START) domain containing 13 (<i>STARD13</i>)	Intrón 1	T	2,0 (1,1-3,7)	0,0237	GT+TT	5,1 (1,0 - 25,4)	0,0314
rs11787532	8	Zinc finger homeobox 4 (<i>ZFH4</i>)	Intrón 3	C	2,3 (1,0-5,2)	0,0388	CC+CG	2,6 (1,1 - 6,5)	0,0335
rs2248202	21	Interferon (alpha, beta and omega) receptor 2 (<i>IFNAR2</i>)	Intrón 1	C	1,9 (1,0-3,7)	0,0412	CC	5,4 (1,1 - 26,2)	0,0227

Leyenda. Resultados del análisis de asociación alélica con los SNPs que mostraron una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al IFN β . ¹Se aplicó la corrección de Haldane para calcular las OR y los IC 95%. *Alelos y genotipos de riesgo. M: mujeres. H: hombres. OR: odds ratio. IC: intervalo de confianza del 95%. A: aminoácido. Chr: cromosoma. Localiz: localización del polimorfismo en el gen correspondiente. Los p valores no están corregidos por comparaciones múltiples.

Discusión general

8. Discusión general

Tal y como se ha descrito en las secciones correspondientes, el presente estudio se compone de tres grandes bloques que, usando tecnología diferente, ha perseguido como objetivo común la búsqueda de biomarcadores de respuesta al IFN β .

8.1 HLA y respuesta al IFN β

La selección del HLA como posible biomarcador candidato en la respuesta al IFN β derivó principalmente de (i) la asociación conocida, sólida y fuerte, del HLA de clase II con el riesgo genético para la EM; y (ii) de la evidencia de que el alelo *HLA-DRB1*15:01*, el más prevalente en la EM, se había asociado en una publicación previa con la respuesta a otro inmunomodulador empleado en el tratamiento de la EMRR, el acetato de glatirámico (*Fusco y cols., 2001*).

Es importante mencionar que varias publicaciones anteriores no mostraron asociación de los alelos del HLA de clase II con la respuesta al IFN β (*Fusco y cols., 2001; Villoslada y cols., 2002; Fernández y cols., 2005*). El presente estudio, sin embargo, persiguió el genotipado de varios alelos tanto del HLA de clase II como del HLA de clase I (no investigado previamente), en una cohorte numerosa de pacientes tratados con IFN β y clasificados en respondedores y no respondedores en base a criterios clínicos de respuesta estrictos.

En este estudio, ninguno de los alelos del HLA de clase I y II estudiados mostró una asociación estadísticamente significativa con la respuesta al IFN β . Es pertinente destacar que los diferentes estudios llevados a cabo en relación con el HLA y la respuesta al IFN β han empleado criterios clínicos diferentes para definir el fallo de tratamiento, que han variado desde criterios poco estrictos que requerían uno o más brotes ó progresión sostenida de 0,5 puntos o más en el EDSS tras 1 año de tratamiento (*Fernández y cols.,*

2005), hasta criterios más estrictos como los empleados en el estudio actual que requieren la presencia de brotes y la progresión sostenida de 1 o más puntos en el EDSS tras dos años de tratamiento. En los estudios de *Fusco y cols.* (2001) y *Villoslada y cols.* (2002) se emplearon criterios intermedios para definir el fracaso del tratamiento. Teniendo en cuenta estos aspectos, parece poco probable que el uso de criterios de respuesta diferentes a los empleados en estos estudios resulte en una asociación significativa entre el HLA y la respuesta al tratamiento.

A pesar de la evidencia sólida y fuerte en la literatura sobre la asociación entre alelos del HLA de clase I y clase II y la susceptibilidad para la EM, el presente estudio no apoya un papel de dichos alelos como modificadores de la respuesta al IFN β en la EM.

8.2 Respuesta al IFN β y transcriptómica

Un segundo gran bloque del presente estudio corresponde al abordaje de transcriptómica. Mediante el uso de la tecnología de *microarrays* se persiguió la identificación de biomarcadores basados en expresión génica que pudieran mostrar asociación con el fenotipo respuesta al IFN β . Tal y como muestran los resultados, los pacientes no respondedores expresan genes que tienen una característica común, se inducen por los IFNs de tipo 1 (IFN β e IFN-alfa), y se encuentran elevados a tiempo basal, es decir, previo a la administración exógena de IFN β . Tras el tratamiento, estos genes diferencialmente expresados se inducen en respondedores, pero su regulación parece afectada en no respondedores. Además, genes como *IFIT1-3*, *IFI44* y *OASL*, que se inducen de forma selectiva por los IFNs de tipo 1, forman parte de los genes que mejor predicen la respuesta al IFN β tras dos años de tratamiento. En base a estos hallazgos, se llevó a cabo una disección de la vía de los IFNs de tipo 1 mediante una serie de experimentos mecanísticos que mostraron que los no respondedores se caracterizaron por

(i) una expresión elevada en monocitos de una de las subunidades del receptor de los IFNs de tipo 1, IFNAR1; (ii) un aumento en la secreción de IFNs de tipo 1 (IFN-alfa) por monocitos tras estimular la inmunidad innata a través de TLR4; (iii) un incremento de la bioactividad de los IFNs de tipo 1 en suero; y (iv) una mayor activación de células dendríticas mieloides.

Una huella de expresión de los IFNs de tipo 1 también se ha descrito en otras enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (*van der Pouw Kraan y cols., 2007*), el lupus eritematoso sistémico (*Han y cols., 2003*), la dermatomiositis (*Baechler y cols., 2007*), la esclerosis sistémica (*Tan y cols., 2006*), y el síndrome de Sjögren (*Gottenberg y cols., 2006*). En EM, un estudio con *microarrays* de expresión génica mostró en un subgrupo de pacientes con EMRR una mayor expresión de genes pertenecientes a la vía de señalización de los IFNs de tipo 1 (*van Baarsen y cols., 2006*). Esta huella de los IFNs de tipo 1 compartida podría sugerir la presencia de factores etiológicos y vías patogénicas comunes operando en estas enfermedades autoinmunes. En el presente estudio, se observa una vía de los IFNs de tipo 1 activada de forma constitutiva en los no respondedores al IFN β . Estos resultados podrían indicar un desacoplamiento de los mecanismos reguladores mediados por una familia de tirosin-kinasas denominada receptores TAM (*Rothlin y cols., 2007*), la cual emplea IFNAR1 y STAT1 fosforilado para inhibir la activación de la inmunidad innata previa estimulación de los receptores TLR, señalización a través de IFNAR1 y fosforilación de STAT1. Es importante resaltar que la vía de los IFNs de tipo 1 parece encontrarse alterada de forma selectiva en la población celular de monocitos de sangre periférica de no respondedores en base al aumento en los niveles de STAT1 fosforilado y expresión de IFNAR1 que se observó únicamente en esta población celular. Además, el aumento en la producción de IFN-alfa que se encontró tras la estimulación con TLR4 posiblemente esté también mediado por la estirpe de monocitos.

Los monocitos son abundantes en las lesiones inflamatorias del SNC de pacientes con EM, y se piensa que las células dendríticas mieloides infiltrantes junto con la microglía juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria que tiene lugar en el SNC (*Heppner y cols., 2005; Karni y cols., 2006; Bailey y cols., 2007*). En el presente estudio se excluyó una expresión deficiente de reguladores negativos de la vía de los IFNs de tipo 1, así como la reactivación de infecciones virales latentes por el VEB o el HHV-6 como causas de la mayor expresión de genes de respuesta a los IFNs de tipo 1 observada en monocitos de no respondedores. Además, los monocitos de los no respondedores no se encuentran más activados, reflejado por el hallazgo de un porcentaje similar de marcadores de activación de monocitos en respondedores y no respondedores. Tampoco se encontraron más activadas otras poblaciones celulares investigadas como células B ó células T. Los resultados del presente estudio sugieren más bien una mayor señalización a través de IFNAR como consecuencia del aumento de los IFNs de tipo 1 endógenos observado en no respondedores, hipótesis avalada por los hallazgos en este grupo de un aumento en la bioactividad de los IFNs de tipo 1 y un incremento en la producción de IFN-alfa tras estimulación de TLR4.

En base a los resultados del estudio de transcriptómica, los pacientes no respondedores al IFN β representan un fenotipo de EM diferente desde el punto de vista patogénico, con un curso clínico más agresivo, función de los monocitos alterada, y un sistema inmune innato activado. En estos pacientes la administración de IFN β exógeno, como parte del tratamiento, fracasó en la inducción de genes regulados por los IFNs de tipo 1. Es difícil distinguir si la presencia de brotes y progresión de la discapacidad neurológica en los no respondedores durante los 2 años de tratamiento corresponde a una verdadera falta de respuesta al IFN β , o simplemente obedece a una enfermedad más activa en los no respondedores, que ya está presente antes del tratamiento y se mantiene activa a pesar del tratamiento. También podría deberse a una combinación de ambos factores. La falta de inclusión de un grupo de pacientes con EMRR no tratados con un seguimiento similar al del

estudio no permite diferenciar entre historia natural de la enfermedad y falta de respuesta al IFN β . En cualquier caso, en el presente estudio se ha identificado un subgrupo de pacientes que parecen tener de forma constitutiva una vía de los IFNs de tipo 1 más activada y que se induce en menor grado, y este subgrupo de pacientes no responde al tratamiento con IFN β . Además, por motivos que se desconocen, la vía de los IFNs de tipo 1 presenta una regulación deficiente en los monocitos, hallazgo que puede contribuir a una enfermedad más activa. En este contexto, es importante destacar un estudio llevado a cabo en el modelo animal de la enfermedad (encefalomielitis autoinmune experimental), en el cual la delección selectiva de *ifnar1* en monocitos, pero no en células T, células B, o células propias del SNC, se asoció con un curso de la enfermedad más agresivo (*Prinz y cols., 2008*). Es importante resaltar que, en el contexto de una huella de expresión génica de los IFNs de tipo 1, éstos podrían no ser beneficiosos para la enfermedad. En este sentido, se sabe que los IFNs de tipo 1 pueden activar las células dendríticas (*Radvanyi y cols., 1999*), aumentar la inmunidad humoral (*Le Bon y cols., 2001*), y favorecer respuestas inmunes de tipo Th1 caracterizadas por una mayor producción de IFN-alfa (*Brinkmann y cols., 1993*). En este estudio se demuestra, por ejemplo, que las células dendríticas mieloides de los no respondedores se encuentran más activadas antes del tratamiento. El efecto perjudicial de los IFNs de tipo 1 viene apoyado por el hallazgo de una importante inducción en la expresión del factor activador de células B *BAFF* por acción del IFN β en pacientes con EM, proporcionando de esta forma un vínculo entre IFNs de tipo 1 y respuestas humorales aumentadas (*Krumbholz y cols., 2008*).

8.3 Respuesta al IFN β y GWAS

El tercer y último gran bloque del presente estudio corresponde a un abordaje de farmacogenómica empleando también la tecnología de *microarrays*, pero en este caso *microarrays* de polimorfismos. Numerosos estudios de genes candidatos han perseguido la identificación de variantes alélicas asociadas con la buena o mala respuesta al IFN β en pacientes con EM (resumidos brevemente en la Introducción). Sin embargo, en la mayoría de casos, los resultados mostraron o bien no asociación, o asociaciones débiles y no replicadas con la respuesta.

A diferencia de los estudios de genes candidatos, el presente estudio correspondió a un GWAS en relación con la respuesta al IFN β . Se trata del segundo GWAS llevado a cabo hasta la fecha en pacientes tratados con IFN β . El primer GWAS se publicó en el 2008 por *Byun y cols.* y comparte varias similitudes con el actual (revisado en *Vandenbroeck y cols., 2010*):

1. En ambos estudios el genotipado se llevó a cabo con la tecnología de *microarrays* de SNPs. El primer estudio empleó los *arrays* de Affymetrix de 100K, que permiten identificar hasta 100.000 polimorfismos diferentes. El estudio actual empleó los *arrays* de Affymetrix de 500K, que son de mayor densidad y permiten genotipar hasta 500.000 variantes genéticas diferentes por experimento.

2. Los dos estudios emplearon una estrategia de *pooles* de ADN para el genotipado.

3. Ambos estudios tienen un diseño similar, con una primera fase de *screening* para identificar genes candidatos asociados con la respuesta al tratamiento, y una segunda fase de validación de los marcadores candidatos en cohortes parcialmente o totalmente independientes de respondedores y no respondedores al IFN β .

En el estudio actual, la asociación más fuerte con la respuesta al IFN β correspondió al SNP rs12557782, polimorfismo localizado en el gen *GRIA3* que codifica un receptor de glutamato. Este hallazgo es relevante desde un punto de vista patogenético. Por una parte, en el estudio de *Byun y cols.* (2008), el análisis de vías celulares encontró una representación elevada de genes que codificaban receptores de neurotransmisores como GABA y glutamato. Los resultados del presente estudio apoyan, por tanto, la relación entre excitabilidad neuronal y respuesta al IFN β sugerida en el estudio de *Byun y cols.* En este contexto, el glutamato tiene un papel importante en el SNC (*Zipfel y cols., 2000; Barnes y Slevin, 2003*) y los receptores del glutamato de tipo AMPA median la mayoría de las transmisiones sinápticas de tipo excitatorio en el SNC (*Seeburg, 1993; Mayer y Armstrong, 2004*) y además se expresan en oligodendrocitos (*Steinhäuser y Gallo, 1996*). La sobreactivación de los receptores de glutamato tipo AMPA conduce a la muerte celular del oligodendrocito por excitotoxicidad y se ha implicado en la patogenia de enfermedades desmielinizantes (*Steinhäuser y Gallo, 1996; Matute, 1998; McDonald y cols., 1998; Sánchez-Gómez y Matute, 1999; Pitt y cols., 2000; Smith y cols., 2000; Werner y cols., 2001*). Se desconoce, sin embargo, el mecanismo por el cual las variantes alélicas del gen *GRIA3* pueden modular la respuesta al IFN β en pacientes con EM.

El SNP rs7308076 mostró la segunda asociación más fuerte con la respuesta al tratamiento con IFN β . Este polimorfismo está localizado en el intrón 9 del gen *CIT*, que codifica una proteín-kinasa que interacciona con la proteína Rho. *CIT* se concentra en las regiones postsinápticas de neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas en asociación con la proteína estructural postsináptica PSD-95 (*Furuyashiki y cols., 1999; Zhang y cols., 1999; Zhang y Benson, 2006*), y se ha sugerido una posible relación entre el sistema de señalización de Rho y la señalización mediada por receptores de glutamato (*Furuyashiki y cols., 1999*). Estas observaciones también apoyarían la relación mencionada anteriormente entre excitabilidad neuronal y respuesta al IFN β .

Es importante subrayar que el análisis de ontología génica mostró que la categoría funcional más representada entre los genes que mejor discriminaron entre respondedores y no respondedores al IFN β fue la relacionada con las acciones antivirales de los IFNs, y además dos de los polimorfismos que se validaron de forma individual en la cohorte independiente de pacientes tratados con IFN β , codifican genes que se inducen de forma específica por los IFNs de tipo 1, *ADAR* e *IFNAR2*. *ADAR* (adenosina deaminasa específica de ARN) codifica una enzima que se induce por el IFN y con funciones importantes en la edición de transcritos de ARN virales (*Samuel, 2001*). En el estudio de *Byun y cols. (2008)* se identificó un SNP localizado 54 kilobases *downstream* del gen *ADAR* (rs4131514) que mostró diferencias estadísticamente significativas entre respondedores y no respondedores al IFN β . El otro polimorfismo que se validó, rs2248202, se encuentra localizado en el primer intrón del gen *IFNAR2*, y codifica una de las subunidades del receptor de los IFNs de tipo 1. Estos hallazgos están en concordancia con los resultados obtenidos en el abordaje de transcriptómica, y sugieren un papel importante de los genes inducidos por los IFNs de tipo 1 en la respuesta al IFN β en pacientes con EM.

Respecto a los otros polimorfismos intragénicos que se validaron en el estudio, existen pocas evidencias en la literatura sobre la función de las proteínas de dedos de zinc ZFAT y ZFH4, y la proteína activadora de una GTPasa de la familia Rho STARD13. Además, su posible asociación con la respuesta al tratamiento con IFN β se desconoce.

Es relevante destacar también que, cuando se comparan los dos estudios GWAS realizados hasta la fecha, se observa una representación relativamente elevada de genes que tienen una expresión predominante en tejido cerebral: *COL25A1* y *NPAS3* (*Byun y cols., 2008*), *GRIA3* y *CIT* (presente estudio) (revisado en *Vandenbroeck y Comabella, 2010*).

Finalmente, los SNPs intergénicos que se validaron en la cohorte de replicación podrían localizarse en regiones del genoma que se encuentran en desequilibrio de ligamiento elevado con genes implicados en la respuesta al tratamiento con IFN β .

Conclusiones

9. Conclusiones

Las principales conclusiones que se derivan de estos tres estudios son las siguientes:

1. La respuesta al IFN β en pacientes con EM es compleja y de naturaleza poligénica.
2. Los genes del HLA de clase I y II no influyen en la respuesta al tratamiento con IFN β en pacientes con EM.
2. Antes de iniciar tratamiento, los pacientes que presentarán una buena y mala respuesta al IFN β se distinguen por una expresión diferencial en sangre periférica de genes inducidos por los IFNs de tipo 1.
3. Tras iniciar el tratamiento con IFN β , la vía de los IFNs de tipo 1 se induce menos en los pacientes que presentarán una mala respuesta al tratamiento.
4. La vía de señalización mediada por los IFNs de tipo 1 se encuentra alterada de forma selectiva en los monocitos de sangre periférica de pacientes que no responden al IFN β .
5. Los genes inducidos por los IFNs de tipo 1 podrían usarse en la práctica clínica como biomarcadores de respuesta al tratamiento con IFN β .

Comentario final

10. Comentario final

Los resultados de estos estudios permitieron la redacción de tres artículos científicos, listados a continuación y adjuntados al final de la tesis, que fueron aceptados en revistas internacionales con sistema de revisión por expertos (*peer review*). El desarrollo de estos tres artículos constituye el núcleo principal de la presente tesis doctoral.

Publicaciones:

1. Comabella M, Fernández-Arquero M, Río J, Guinea A, Fernández M, Cenit MC, de la Concha EG, Montalban X. HLA class I and II alleles and response to treatment with interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*. 2009 May 29; 210(1-2):116-9.

2. Comabella M, Lünemann JD, Río J, Sánchez A, López C, Julià E, Fernández M, Nonell L, Camiña-Tato M, Deisenhammer F, Caballero E, Tortola MT, Prinz M, Montalban X, Martin R. A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain*. 2009 Dec; 132(Pt 12):3353-65.

3. Comabella M, Craig DW, Morcillo-Suárez C, Río J, Navarro A, Fernández M, Martin R, Montalban X. Genome-wide scan of 500,000 single-nucleotide polymorphisms among responders and nonresponders to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2009 Aug; 66(8):972-8.

Bibliografía

10. Bibliografía

Aladro Y, Alemany MJ, Pérez-Vieitez MC, Amela R, Conde M, Reyes MP, Alamo F, Angel-Moreno A. Prevalence and incidence of multiple sclerosis in Las Palmas, Canary Islands, Spain. *Neuroepidemiology* 2005; 24: 70-75.

Archelos JJ, Previtali SC, Hartung HP. The role of integrins in immune-mediated diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 1999; 22: 30-38.

Ares B, Prieto JM, Lema M, Dapena D, Arias M, Noya M. Prevalence of multiple sclerosis in Santiago de Compostela (Galicia, Spain). *Mult Scler* 2007; 13: 262-264.

Ascherio A, Munger KL, Lennette ET, et al. Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study. *JAMA* 2001; 286: 3083-3088.

Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Ann Neurol*. 2007; 61: 288-299.

Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P et al. T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 2010; 16: 406-412.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, Rajewsky K. Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J Exp Med* 2000; 192: 393-404.

Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, et al. An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity. *Mol Med* 2007; 13: 59-68.

Baggiolini M. Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568.

Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol* 2007; 8: 172-180.

Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, Caillier SJ, Stillman A, Villoslada P, Wyatt MM, Comabella M, Greller LD, Somogyi R, Montalban X, Oksenberg JR. Transcription-based prediction of response to IFNbeta using supervised computational methods. *PLoS Biol* 2005; 3: e2.

Bar-Or A. The immunology of multiple sclerosis. *Semin Neurol* 2008; 28: 29-45.

Barnes GN, Slevin JT. Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease. *Curr Med Chem* 2003; 10: 2059-2072.

Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L, Pitha PM. Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J Biol Chem* 2004; 279: 45194-45207.

Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, Tse C, Brault D, Chiappini F, Breittschneider J, Lacaine F, Houry S, Huguier M, Van der Laan MJ, Speed T, Debuire B, Flahault A, Dudoit S. Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene* 2005; 24: 6155-6164.

Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B* 1995; 57: 289-300.

Bettelli E, Korn T, Kuchroo VK. Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 652-657.

Bitsch A, J. Schuchardt, S. Bunkowski, T. Kuhlmann, W. Brück. Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation, *Brain* 2000; 123: 1174-1183.

Bosca I, Villar LM, Coret F, Magraner MJ, Simó-Castelló M, Alvarez-Cermeño JC, Casanova B. Response to interferon in multiple sclerosis is related to lipid-specific oligoclonal IgM bands. *Mult Scler* 2010; 16: 810-815.

Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1655-1663.

Brucklacher-Waldert V, Stuermer K, Kolster M, Wolthausen J, Tolosa E. Tolosa. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 2009; 132: 3329-3341.

Bushnell SE, Zhao Z, Stebbins CC, et al. Serum IL-17F does not predict poor response to IM IFN β -1a in relapsing-remitting MS. *Neurology* 2012; 79: 531-537.

Byun E, Caillier SJ, Montalban X, Villoslada P, Fernández O, Brassat D, Comabella M, Wang J, Barcellos LF, Baranzini SE, Oksenberg JR. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65: 337-344.

Cénit MD, Blanco-Kelly F, de las Heras V, Bartolomé M, de la Concha EG, Urcelay E, Arroyo R, Martínez A. Glypican 5 is an interferon-beta response gene: a replication study. *Mult Scler* 2009; 15: 913-917.

Christensen T. Human herpesviruses in MS. *Int MS J* 2007; 14: 41-47.

Comabella M, Río J, Espejo C, Ruiz de Villa M, Al-Zayat H, Nos C, Deisenhammer F, Baranzini SE, Nonell L, López C, Julià E, Oksenberg JR, Montalban X. Changes in matrix metalloproteinases and their inhibitors during interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2009; 130: 145-150.

Comabella M, Montalban X. Pharmacogenomics in Multiple Sclerosis. *CML - Multiple Sclerosis* 2009;1: 29-35.

Comabella M, Khoury SJ. Immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2012; 142: 2-8.

Comabella M, Montalban X. Multiple sclerosis and immunological response: time for a personalized therapy? *Hot Topics In Neurology and Psychiatry* 2012; 13: 19-25.

Comabella M, Racke MK. New technologies for biomarker discovery in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2012; 248: 1.

Cunningham S, Graham C, Hutchinson M, Droogan A, O'Rourke K, Patterson C, McDonnell G, Hawkins S, Vandebroek K. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN-beta treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin Pharmacol Ther* 2005; 78: 635-646.

De Jager PL, Baecher-Allan C, Maier LM, Arthur AT, Ottoboni L, Barcellos L, McCauley JL, Sawcer S, Goris A, Saarela J, Yelensky R, Price A, Leppa V, Patterson N, de Bakker PI, Tran D, Aubin C, Pobywajlo S, Rossin E, Hu X, Ashley CW, Choy E, Rioux JD, Pericak-Vance MA, Ivinson A, Booth DR, Stewart GJ, Palotie A, Peltonen L, Dubois B, Haines JL, Weiner HL, Compston A, Hauser SL, Daly MJ, Reich D, Oksenberg JR, Hafler DA. The role of the

CD58 locus in multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; 106: 5264-5269.

Deisenhammer F, Schellekens H, Bertolotto A. Measurement of neutralizing antibodies to interferon beta in patients with multiple sclerosis. *J Neurol* 2004; 251 Suppl 2: II31-39.

Der SD, Zhou A, Williams BR, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15623-15628.

Dhib-Jalbut S, Marks S. Interferon-beta mechanisms of action in multiple sclerosis. *Neurology* 2010; 74 Suppl 1: S17-24.

Dominguez-Mozo MI, Garcia-Montojo M, De Las Heras V, Garcia-Martinez A, Arias-Leal AM, Casanova I, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R. MHC2TA mRNA levels and human herpesvirus 6 in multiple sclerosis patients treated with interferon beta along two-year follow-up. *BMC Neurol* 2012; 12: 107.

Dudoit S, Fridlyand J, Speed TP. Comparison of Discrimination Methods for the Classification of Tumors Using Gene Expression Data. *J Am Stat Assoc* 2002; 97: 77-87.

Dhodapkar KM, Banerjee D, Connolly J, Kukreja A, Matayeva E, Veri MC, Ravetch JV, Steinman RM, Dhodapkar MV. Selective blockade of the inhibitory Fc $\{\gamma\}$ receptor (Fc $\{\gamma\}$ R1B) in human dendritic cells and monocytes induces a type I interferon response program. *J Exp Med* 2007; 204: 1359-1369.

Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2004; 3:104-110.

Fainardi E, Rizzo R, Melchiorri L, Castellazzi M, Govoni V, Caniatti L, Paolino E, Tola MR, Granieri E, Baricordi OR. Beneficial effect of interferon-beta 1b treatment in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is associated with an increase in serum levels of soluble HLA-I molecules during the first 3 months of therapy. *J Neuroimmunol* 2004; 148: 206-211.

Fernández O, Fernández V, Mayorga C, Guerrero M, León A, Tamayo JA, Alonso A, Romero F, Leyva L, Alonso A, Luque G, de Ramón E. HLA class II and response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 2005; 112: 391-394.

Furtado GC, Marcondes MC, Latkowski JA, Tsai J, Wensky A, Lafaille JJ. Swift entry of myelin-specific T lymphocytes into the central nervous system in spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2008; 181: 4648-4655.

Furuyashiki T, Fujisawa K, Fujita A, Madaule P, Uchino S, Mishina M, Bito H, Narumiya S. Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J Neurosci* 1999; 19: 109-118.

Fusco C, Andreone V, Coppola G, Luongo V, Guerini F, Pace E, Florio C, Pirozzi G, Lanzillo R, Ferrante P, Vivo P, Mini M, Macrì M, Orefice G, Lombardi ML. HLADRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing–remitting multiple sclerosis. *Neurology* 2001; 57: 1976-1979.

Gilli F, Marnetto F, Caldano M, Sala A, Malucchi S, Capobianco M, Bertolotto A. Biological markers of interferon-beta therapy: comparison among interferon-stimulated genes MxA, TRAIL and XAF-1. *Mult Scler* 2006; 12: 47-57.

Giovannoni G, Cutter GR, Lunemann J, Martin R, Münz C, Sriram S, Steiner I, Hammerschlag MR, Gaydos CA. Infectious causes of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2006; 5: 887-894.

Giovannoni G, Ebers G. Multiple sclerosis: the environment and causation. *Curr Opin Neurol* 2007; 20: 261-268.

Gneiss C, Tripp P, Reichartseder F, Egg R, Ehling R, Lutterotti A, Khalil M, Kuenz B, Mayringer I, Reindl M, Berger T, Deisenhammer F. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2006; 12: 731-737.

Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, Jacques S, Ba N, Ittah M, Lepajolec C, Labetoulle M, Ardizzone M, Sibilica J, Fournier C, Chiocchia G, Mariette X. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2770-2775.

Graber JJ, Ford D, Zhan M, Francis G, Panitch H, Dhib-Jalbut S. Cytokine changes during interferon-beta therapy in multiple sclerosis: correlations with interferon dose and MRI response. *J Neuroimmunol* 2007; 185: 168-174.

Greenwood J, Heasman SJ, Alvarez JI, Prat A, Lyck R, Engelhardt B. Review: leucocyte-endothelial cell crosstalk at the blood-brain barrier: a prerequisite for successful immune cell entry to the brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 2011; 37: 24-39.

Gustavsson A, Svensson M, Jacobi F, Allgulander C, Alonso J, Beghi E, Dodel R, Ekman M, Faravelli C, Fratiglioni L, Gannon B, Jones DH, Jennum P, Jordanova A, Jönsson L, Karampampa K, Knapp M, Kobelt G, Kurth T, Lieb R, Linde M, Ljungcrantz C, Maercker A, Melin B, Moscarelli M, Musayev A, Norwood F, Preisig M, Pugliatti M, Rehm J, Salvador-Carulla L, Schlehofer B, Simon R, Steinhausen HC, Stovner LJ, Vallat JM, den Bergh PV, van Os J, Vos P, Xu W, Wittchen HU, Jönsson B, Olesen J; CDBE2010Study Group. Cost of disorders of the brain in Europe 2010. *Eur Neuropsychopharmacol* 2011; 21: 718-779.

Haines JL, Terwedow HA, Burgess K, Pericak-Vance MA, Rimmler JB, Martin ER, Oksenberg JR, Lincoln R, Zhang DY, Banatao DR, Gatto N, Goodkin DE, Hauser SL. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 1229-1234.

Han GM, Chen SL, Shen N, Ye S, Bao CD, Gu YY. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun* 2003; 4: 177-186.

Handel AE, Williamson AJ, Disanto G, Dobson R, Giovannoni G, Ramagopalan SV. Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis, *PLoS One* 2011; 6: e16149.

Hartung HP, Steinman L, Goodin DS, Comi G, Cook S, Filippi M, O'Connor P, Jeffery DR, Kappos L, Axtell R, Knappertz V, Bogumil T, Schwenke S, Croze E, Sandbrink R, Pohl C. Interleukin 17F Level and Interferon Beta Response in Patients With Multiple Sclerosis. *JAMA Neurol* 2013; 70: 1017-1021.

Helbig KJ, Lau DT, Semendric L, Harley HA, Beard MR. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 2005; 42: 702-710.

Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N. Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Curr Opin Neurol* 2002; 15: 227-231.

Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, Waisman A, Rülcke T, Prinz M, Priller J, Becher B, Aguzzi A. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 2005; 11: 146-152.

Holman DW, Klein RS, Ransohoff RM. The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis, *Biochim Biophys Acta* 2011; 1812: 220-230.

Homer N, Tembe WD, Szelinger S, Redman M, Stephan DA, Pearson JV, Nelson SF, Craig D. Multimarker analysis and imputation of multiple platform pooling-based genome-wide association studies. *Bioinformatics* 2008; 24: 1896-1902.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, de Bakker PI, Gabriel SB, Mirel DB, Ivinson AJ, Pericak-Vance MA, Gregory SG, Rioux JD, McCauley JL, Haines JL, Barcellos LF, Cree B, Oksenberg JR, Hauser SL. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N Engl J Med* 2007; 357: 851-862.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). Refining genetic associations in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2008; 7: 567-569.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC). The expanding genetic overlap between multiple sclerosis and type I diabetes. *Genes Immun* 2009; 10: 11-14.

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

Ravindrarajah R, Abraham R, Alfredsson L, Ardlie K, Aubin C, Baker A, Baker K, Baranzini SE, Bergamaschi L, Bergamaschi R, Bernstein A, Berthele A, Boggild M, Bradfield JP, Brassat D, Broadley SA, Buck D, Butzkueven H, Capra R, Carroll WM, Cavalla P, Celius EG, Cepok S, Chiavacci R, Clerget-Darpoux F, Clysters K, Comi G, Cossburn M, Cournu-Rebeix I, Cox MB, Cozen W, Cree BA, Cross AH, Cusi D, Daly MJ, Davis E, de Bakker PI, Debouverie M, D'hooghe MB, Dixon K, Dobosi R, Dubois B, Ellinghaus D, Elovaara I, Esposito F, Fontenille C, Foote S, Franke A, Galimberti D, Ghezzi A, Glessner J, Gomez R, Gout O, Graham C, Grant SF, Guerini FR, Hakonarson H, Hall P, Hamsten A, Hartung HP, Heard RN, Heath S, Hobart J, Hoshi M, Infante-Duarte C, Ingram G, Ingram W, Islam T, Jagodic M, Kabesch M, Kermodé AG, Kilpatrick TJ, Kim C, Klopp N, Koivisto K, Larsson M, Lathrop M, Lechner-Scott JS, Leone MA, Leppä V, Liljedahl U, Bomfim IL, Lincoln RR, Link J, Liu J, Lorentzen AR, Lupoli S, Macciardi F, Mack T, Marriott M, Martinelli V, Mason D, McCauley JL, Mentch F, Mero IL, Mihalova T, Montalban X, Mottershead J, Myhr KM, Naldi P, Ollier W, Page A, Palotie A, Pelletier J, Piccio L, Pickersgill T, Piehl F, Pobywajlo S, Quach HL, Ramsay PP, Reunanen M, Reynolds R, Rioux JD, Rodegher M, Roesner S, Rubio JP, Rückert IM, Salvetti M, Salvi E, Santaniello A, Schaefer CA, Schreiber S, Schulze C, Scott RJ, Sellebjerg F, Selmaj KW, Sexton D, Shen L, Simms-Acuna B, Skidmore S, Sleiman PM, Smestad C, Sørensen PS, Søndergaard HB, Stankovich J, Strange RC, Sulonen AM, Sundqvist E, Syvänen AC, Taddeo F, Taylor B, Blackwell JM, Tienari P, Bramon E, Tourbah A, Brown MA, Tronczynska E, Casas JP, Tubridy N, Corvin A, Vickery J, Jankowski J, Villoslada P, Markus HS, Wang K, Mathew CG, Wason J, Palmer CN, Wichmann HE, Plomin R, Willoughby E, Rautanen A, Winkelmann J, Wittig M, Trembath RC, Yaouanq J, Viswanathan AC, Zhang H, Wood NW, Zuvich R, Deloukas P, Langford C, Duncanson A, Oksenberg JR, Pericak-Vance MA, Haines JL, Olsson T, Hillert J, Ivinson AJ, De Jager PL, Peltonen L, Stewart GJ, Hafler DA, Hauser SL, McVean G, Donnelly P, Compston A. Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 2011; 476: 214-219.

Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, Speed TP. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4: 249-264.

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH, Alam JJ, Bartoszak DM, Bourdette DN, Braiman J, Brownscheidle CM, Coats ME, Cohan SL, Dougherty DS, Kinkel RP, Mass MK, Munschauer FE 3rd, Priore RL, Pullicino PM, Scherokman BJ, Whitham RH, et al. Intramuscular interferon b-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol* 1996; 39: 285-294.

Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863-869.

Kakalacheva K, Comabella M. Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: causation or association? *Future Microbiol* 2010; 5:1617-1619.

Karni A, Abraham M, Monsonogo A, Cai G, Freeman GJ, Hafler D, Khoury SJ, Weiner HL. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* 2006; 177: 4196-5202.

Killestein J, Hintzen RQ, Uitdehaag BM, Baars PA, Roos MT, van Lier RA, Polman CH. Baseline T cell reactivity in multiple sclerosis is correlated to efficacy of interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2002; 133: 217-224.

Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, Peterson MG, Ly N, Woodward RN, Fry KE, Lau AY, Prentice JG, Wohlgemuth JG, Crow MK. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3958-3967.

Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, Hoffmann LA, Ku"mpfel T, Pellkofer H, et al. Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain* 2008; 131: 1455-1463.

Kulakova OG, Tsareva EY, Boyko AN, Shchur SG, Gusev EI, Lvovs D, Favorov AV, Vandebroek K, Favorova OO. Allelic combinations of immune-response genes as possible composite markers of IFN- β efficacy in multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics* 2012; 13: 1689-1700.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 2005; 201: 233-240.

Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14: 461-470.

Lee MA, J. Palace, G. Stabler, J. Ford , A. Gearing, K. Miller. Serum gelatinase B, TIMP-1, TIMP-2 levels in multiple sclerosis. A longitudinal clinical and MRI study. *Brain* 1999; 122: 191-197.

Lesinski GB, Kondadasula SV, Crespin T, Shen L, Kendra K, Walker M, Carson WE 3rd. Multiparametric flow cytometric analysis of inter-patient variation in STAT1 phosphorylation following interferon Alfa immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1331-1342.

Leszczyniecka M, Su ZZ, Kang DC, Sarkar D, Fisher PB. Expression regulation and genomic organization of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase(old-35), a Type I interferon inducible early response gene. *Gene* 2003; 316: 143-156.

Leyva L, Fernández O, Fedetz M, Blanco E, Fernandez VE, Oliver B, Leon A, Pinto-Medel MJ, Mayorga C, Guerrero M, Luque G, Alcina A, Matesanz F. IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *J Neuroimmunol* 2005; 163: 165-171.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402-408.

López-Gómez C, Pino-Ángeles A, Órpez-Zafra T, Pinto-Medel MJ, Oliver-Martos B, Ortega-Pinazo J, Arnáiz C, Guijarro-Castro C, Varadé J, Álvarez-Lafuente R, Urcelay E, Sánchez-Jiménez F, Fernández Ó, Leyva L. Candidate gene study of TRAIL and TRAIL receptors: association with response to interferon beta therapy in multiple sclerosis patients. *PLoS One* 2013; 8: e62540.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. *Neurology* 1996; 46: 907-911.

Malhotra S, Bustamante MF, Pérez-Miralles F, Rio J, Ruiz de Villa MC, Vegas E, Nonell L, Deisenhammer F, Fissolo N, Nurtdinov RN, Montalban X, Comabella M. Search for specific biomarkers of IFN β bioactivity in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2011; 6: e23634.

Malhotra S, Morcillo-Suárez C, Brassat D, Goertsches R, Lechner-Scott J, Urcelay E, Fernández O, Drulovic J, García-Merino A, Martinelli Boneschi F, Chan A, Vandebroek K, Navarro A, Bustamante MF, Río J, Akkad DA, Giacalone G, Sánchez AJ, Leyva L, Alvarez-Lafuente R, Zettl UK, Oksenberg J, Montalban X, Comabella M. IL28B polymorphisms are not associated with the response to interferon- β in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2011; 239: 101-104.

Malhotra S, Morcillo-Suárez C, Nurtdinov R, Rio J, Sarro E, Moreno M, Castelló J, Navarro A, Montalban X, Comabella M. Roles of the ubiquitin peptidase USP18 in multiple sclerosis and the response to interferon- β treatment. *Eur J Neurol* 2013; 20: 1390-1397.

Malucchi S, Sala A, Gilli F, Bottero R, Di Sapio A, Capobianco M, Bertolotto A.. Neutralizing antibodies reduce the efficacy of betaIFN during treatment of multiple sclerosis. *Neurology* 2004; 62: 2031-2037.

Martínez A, de las Heras V, Mas Fontao A, Bartolomé M, de la Concha EG, Urcelay E, Arroyo R. An IFNG polymorphism is associated with interferon-beta response in Spanish MS patients. *J Neuroimmunol* 2006; 173: 196-199.

Martínez-Rodríguez JE, López-Botet M, Munteis E, Rio J, Roquer J, Montalban X, Comabella M. Natural killer cell phenotype and clinical response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Clin Immunol* 2011; 141: 348-356.

Matute C. Characteristics of acute and chronic kainite excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998; 95: 10229-10234.

Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol* 2004; 66: 161-181.

McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med* 1998; 4: 291-297.

Minagar A, Adamashvili I, Kelley RE, Gonzalez-Toledo E, McLarty J, Smith SJ. Saliva soluble HLA as a potential marker of response to interferon-beta1a in multiple sclerosis: a preliminary study. *J Neuroinflammation* 2007; 4: 16.

Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, Chiang FT, Holden T, Barney N, White BC. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol* 2006; 241: 252-261.

Morcillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, Gazave E, de Cid R, Milne R, Amigo J, Ferrer-Admetlla A, Moreno-Estrada A, Gardner M, Casals F, Pérez-Lezaun A, Comas D, Bosch E, Calafell F, Bertranpetit J, Navarro A. SNP analysis to results (SNPator): a Web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. *Bioinformatics* 2008; 24: 1643-1644.

Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Ascherio. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis, *JAMA* 2006; 296: 2832-2838.

Münz C, Lünemann JD, Getts MT, Miller SD. Antiviral immune responses: triggers of or triggered by autoimmunity? *Nature Rev Immunol* 2009; 9: 246-258.

Murray PD, McGavern DB, Sathornsumetee S, Rodriguez M. Spontaneous remyelination following extensive demyelination is associated with improved neurological function in a viral model of multiple sclerosis. *Brain* 2001; 124: 1403-1416.

Naci H, Fleurence R, Birt J, Duhig A. Economic burden of multiple sclerosis: a systematic review of the literature. *Pharmacoeconomics* 2010; 28: 363-379.

O'Connor KC, Appel H, Bregoli L, Call ME, Catz I, Chan JA, Moore NH, Warren KG, Wong SJ, Hafler DA, Wucherpfennig KW. Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein. *J Immunol* 2005; 175: 1974-1982.

O'Doherty C, Favorov A, Heggarty S, Graham C, Favorova O, Ochs M, Hawkins S, Hutchinson M, Vandebroek K. Genetic polymorphisms, their allele combinations and IFN-beta treatment response in Irish multiple sclerosis patients. *Pharmacogenomics* 2009; 10: 1177-1186.

Oksenberg JR, Hauser SL. Genetics of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 2005; 23: 61-75.

Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 1991; 38: 1-15.

Pachner AR, Bertolotto A, Deisenhammer F. Measurement of MxA mRNA or protein as a biomarker of IFNbeta bioactivity: detection of antibody-mediated decreased bioactivity (ADB). *Neurology* 2003; 61: S24-26.

Pearson JV, Huentelman MJ, Halperin RF, Tembe WD, Melquist S, Homer N, Brun M, Szelinger S, Coon KD, Zismann VL, Webster JA, Beach T, Sando SB, Aasly JO, Heun R, Jessen F, Kolsch H, Tsolaki M, Daniilidou M, Reiman EM, Papassotiropoulos A, Hutton ML, Stephan DA, Craig DW. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide polymorphism association studies. *Am J Hum Genet* 2007; 80: 126-139.

Petereit HF, Nolden S, Schoppe S, Bamborschke S, Pukrop R, Heiss WD. Low interferon gamma producers are better treatment responders: a two-year follow-up of interferon beta-treated multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2002; 8: 492-494.

Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med* 2000; 6: 67-70.

Polman CH, Bertolotto A, Deisenhammer F, Giovannoni G, Hartung HP, Hemmer B, Killestein J, McFarland HF, Oger J, Pachner AR, Petkau J, Reder AT, Reingold SC, Schellekens H, Sørensen PS. Recommendations for clinical use of data on neutralising antibodies to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2010; 9: 740-750.

Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, Merkler D, Detje C, Gutcher I, Mages J, Lang R, Martin R, Gold R, Becher B, Brück W, Kalinke U. Distinct and nonredundant in vivo functions of ifnar on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008; 28: 675-686.

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

Radvanyi LG, Banerjee A, Weir M, Messner H. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Immunol* 1999; 50: 499-509.

Río J, Nos C, Tintoré M, Borrás C, Galan I, Comabella M, Montalban X. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon b: Implications for clinical trials. *Ann Neurol* 2002; 52: 400-406.

Río J, Nos C, Tintoré M, Téllez N, Galán I, Pelayo R, Comabella M, Montalban X. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006; 59: 344-352.

Río J, Castelló J, Rovira A, Tintoré M, Sastre-Garriga J, Horga A, Nos C, Comabella M, Aymerich X, Montalbán X. Measures in the first year of therapy predict the response to interferon beta in MS. *Mult Scler* 2009; 15: 848-853.

Río J, Comabella M, Montalban X. Predicting responders to therapies for multiple sclerosis. *Nat Rev Neurol* 2009; 5: 553-560.

Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007; 131: 1124-1136.

Rudick RA, Rani MR, Xu Y, Lee JC, Na J, Shrock J, Josyula A, Fisher E, Ransohoff RM. Excessive biologic response to IFN β is associated with poor treatment response in patients with multiple sclerosis. *PLoS One* 2011; 6: e19262.

Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev* 2001; 14: 778-809.

Sánchez-Gómez MV, Matute C. AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiol Dis* 1999; 6: 475-485.

Seeburg PH. The TINS/TiPS Lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci* 1993; 16: 359-365.

Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med* 2000; 6: 62-66.

Smyth GK. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol* 2004; 3: Article3.

Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Hanninen A, Eralinna JP, Panelius M. Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in MS. *J Neuroimmunol* 2005; 167: 175-182.

Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Ross C, Clemmesen KM, Bendtzen K; Danish Multiple Sclerosis Study Group. Appearance and disappearance of neutralizing antibodies during interferon-beta therapy. *Neurology* 2005; 65: 33-39.

Sorensen PS, Tscherning T, Mathiesen HK, Langkilde AR, Ross C, Ravnborg M, Bendtzen K. Neutralizing antibodies hamper IFNbeta bioactivity and treatment effect on MRI in patients with MS. *Neurology* 2006; 67: 1681-1683.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 2005; 23: 683-747.

Sriram U, Barcellos LF, Villoslada P, Rio J, Baranzini SE, Caillier S, Stillman A, Hauser SL, Montalban X, Oksenberg JR. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun* 2003; 4: 147-152.

Steinhäuser C, Gallo V. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci* 1996; 19: 339-345.

Sturzebecher S, Wandinger KP, Rosenwald A, Sathyamoorthy M, Tzou A, Mattar P, Frank JA, Staudt L, Martin R, McFarland HF. Expression profiling identifies responder and non-responder phenotypes to interferon-beta in multiple sclerosis. *Brain* 2003; 126: 1419-1429.

Otero-Romero S, Roura P, Solà J, Altimiras J, Sastre-Garriga J, Nos C, Vaqué J, Montalban X, Bufill E. Increase in the prevalence of multiple sclerosis over a 17-year period in Osona, Catalonia, Spain. *Mult Scler* 2013; 19: 245-248.

Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, Jin L, Arnett FC Jr. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology* 2006; 45: 694-702.

The Interferon β Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43: 655-661.

Thacker EL, Mirzaei F, Ascherio A. Infectious mononucleosis and risk for multiple sclerosis: a meta-analysis. *Ann Neurol* 2006; 59: 499-503.

Tian L, Greenberg SA, Kong SW, Altschuler J, Kohane IS, Park PJ. Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13544-13549.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mork S, Bo L. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 1998; 338: 278-285.

van Baarsen LG, van der Pouw Kraan TC, Kragt JJ, Baggen JM, Rustenburg F, Hooper T, Meilof JF, Fero MJ, Dijkstra CD, Polman CH, Verweij CL. A subtype of multiple sclerosis defined by an activated immune defense program. *Genes Immun* 2006; 7:522-531.

van Baarsen LG, Vosslamber S, Tijssen M, Baggen JM, van der Voort LF, Killestein J, van der Pouw Kraan TC, Polman CH, Verweij CL. Pharmacogenomics of interferon-beta therapy in multiple sclerosis: baseline IFN signature determines pharmacological differences between patients. *PLoS One* 2008; 3: e1927.

van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, Ibrahim SM, Fero M, Dijkmans BA, Tak PP, Verweij CL. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1008-14.

Vandenbroeck K, Comabella M. Single-nucleotide polymorphisms in response to interferon-beta therapy in multiple sclerosis. *J Interferon Cytokine Res* 2010; 30: 727-732.

Vandenbroeck K, Urcelay E, Comabella M. IFN-beta pharmacogenomics in multiple sclerosis. *Pharmacogenomics* 2010; 11: 1137-1148.

Vandenbroeck K, Alloza I, Swaminathan B, Antigüedad A, Otaegui D, Olascoaga J, Barcina MG, de las Heras V, Bartolomé M, Fernández-Arquero M, Arroyo R, Alvarez-Lafuente R, Cénit MC, Urcelay E. Validation of IRF5 as multiple sclerosis risk gene: putative role in interferon beta therapy and human herpes virus-6 infection. *Genes Immun* 2011; 12: 40-45.

Villoslada P, Barcellos LF, Rio J, Begovich AB, Tintore M, Sastre-Garriga J, Baranzini SE, Casquero P, Hauser SL, Montalban X, Oksenberg JR. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta. *J Neuroimmunol* 2002; 130: 194-201.

Vosslamber S, van der Voort LF, van den Elskamp IJ, Heijmans R, Aubin C, Uitdehaag BM, Crusius JB, van der PouwKraan TC, Comabella M, Montalban X, Hafler DA, De Jager PL, Killestein J, Polman CH, Verweij CL. Interferon regulatory factor 5 gene variants and pharmacological and clinical outcome of Interferon β therapy in multiple sclerosis. *Genes Immun* 2011; 12: 466-472.

Wandinger KP, Lunemann JD, Wengert O, Bellmann-Strobl J, Aktas O, Weber A, Grundstrom E, Ehrlich S, Wernecke KD, Volk HD, Zipp F. TNF-related apoptosis inducing ligand (TRAIL) as a potential response marker for interferon-beta treatment in multiple sclerosis. *Lancet* 2003; 361: 2036-2043.

Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, Niesters HG, Lawitschka A, Lion T. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5189-5198.

Warner HB, Carp RI. Multiple sclerosis and Epstein-Barr virus. *Lancet* 1981; 2: 1290.

Waubant E, Goodkin DE, Gee L, Bacchetti P, Sloan R, Stewart T, Andersson PB, Stabler G, Miller K. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology* 1999; 7: 1397-1401.

Weinshenker BG, Bass B, Rice GPA, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 1. Clinical course and disability. *Brain* 1989; 112: 133-146.

Weinshenker BG, Rice GPA, Noseworthy JH, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 3. Multivariate analysis of predictive factors and models of outcome. *Brain* 1991; 114: 1045-1056.

Wergeland S, Beiske A, Nyland H, Hovdal H, Jensen D, Larsen JP, Maroy TH, Smievoll AI, Vedeler CA, Myhr KM. IL-10 promoter haplotype influence on interferon treatment response in multiple sclerosis. *Eur J Neurol* 2005; 12: 171-175.

Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol* 2001; 50: 169-180.

Wucherpfennig KW, J.L. Strominger JL. Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 1995; 80: 695-705.

Zhang W, Vazquez L, Apperson M, Kennedy MB. Citron binds to PSD-95 at glutamatergic synapses on inhibitory neurons in the hippocampus. *J Neurosci* 1999; 19: 96-108.

Zhang W, Benson DL. Targeting and clustering citron to synapses. *Mol Cell Neurosci* 2006; 31: 26-36.

Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma* 2000; 17: 857-869.

Anexos

11. Anexos

Anexo 1. Genes expresados diferencialmente entre respondedores y no respondedores obtenidos con los *microarrays* antes de iniciar tratamiento con IFN β .

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	Otros alias y designaciones	Localización en el cromosoma	LogFC	P valor*
230233_at	RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	GPIG4	4q21,21-q21,22	-1,01	3,4 x 10 ⁻⁴
239412_at	IRF5*	interferon regulatory factor 5		7q32	-0,93	4,5 x 10 ⁻⁴
204747_at	IFIT3*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	IFI60, ISG60	10q24	-1,17	0,0012
229450_at	IFIT3*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3			-1,13	0,0019
212657_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	IL1RA	2q14,2	-0,62	0,0023
203153_at	IFIT1*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	IFI56, ISG56	10q25-q26	-1,09	0,0043
206115_at	EGR3	early growth response 3	PILOT	8p23-p21	-1,02	0,0045
203231_s_at	ATXN1	ataxin 1	ATX1, SCA1	6p23	-0,74	0,0045
230333_at	SAT	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	SAT, SSAT	Xp22,1	-0,90	0,0054
201670_s_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	80K-L	6q22,2	-0,51	0,0058
204533_at	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	IP-10, IFI10	4q21	-1,18	0,0060

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	Otros alias y designaciones	Localización en el cromosoma	LogFC	P valor*
213002_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate			-0,59	0,0061
205660_at	OASL*	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	TRIP14	12q24,2	-0,75	0,0075
208886_at	H1F0	H1 histone family, member 0	H10	22q13,1	-0,49	0,0076
209969_s_at	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	ISGF-3	2q32,2	-0,60	0,0076
226757_at	IFIT2*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	IFI54, ISG54	10q23-q25	-1,02	0,0077
225897_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate			-0,49	0,0079
226558_at	LOC653071	similar to hypothetical protein MGC27019		4	-0,78	0,0084
207113_s_at	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	TNF-alpha	6p21,3	-0,95	0,0088
241869_at	APOL6	apolipoprotein L, 6		22q12,3	-0,70	0,0103
205067_at	IL1B	interleukin 1, beta	IL-1	2q14	-1,23	0,0103
226702_at	LOC129607	hypothetical protein LOC129607		2p25,2	-0,64	0,0107
205099_s_at	CCR1	chemokine (C-C motif) receptor 1	RANTES receptor	3p21	-0,47	0,0108
228607_at	OAS2*	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa		12q24,2	-0,66	0,0111
213797_at	RSAD2*	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	viperin	2p25,2	-0,86	0,0111

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	Otros alias y designaciones	Localización en el cromosoma	LogFC	P valor*
226022_at	SASH1	SAM and SH3 domain containing 1		6q24,3	-0,58	0,0115
209774_x_at	CXCL2	chemokine (C-X-C motif) ligand 2	MIP-2a, GRO2	4q21	-1,46	0,0119
39402_at	IL1B	interleukin 1, beta			-1,14	0,0127
210797_s_at	OASL*	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like			-0,60	0,0133
212659_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist			-0,47	0,0145
218943_s_at	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	RIG-I	9p12	-0,65	0,0159
238725_at	RAD50	RAD50 homolog (S, cerevisiae)		5q31	-0,45	0,0172
202859_x_at	IL8	interleukin 8	CXCL8	4q13-q21	-1,58	0,0185
217502_at	IFIT2*	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2			-0,90	0,0203
201631_s_at	IER3	immediate early response 3	DIF2, IEX1	6p21,3	-0,62	0,0210
37028_at	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A	GADD34	19q13,2	-0,63	0,0213
242625_at	RSAD2*	radical S-adenosyl methionine domain containing 2			-0,82	0,0218
211506_s_at	IL8	interleukin 8			-1,51	0,0237
217738_at	PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1		7q22,2	-0,46	0,0240
206157_at	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	TNFAIP5	3q25	-0,53	0,0259
219863_at	HERC5	hect domain and RLD 5	CEB1, CEBP1	4q22,1	-0,63	0,0264
225291_at	PNPT1*	polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1	OLD35	2p15	-0,41	0,0265

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	Otros alias y designaciones	Localización en el cromosoma	LogFC	P valor*
204440_at	CD83	CD83 molecule	BL11, HB15	6p23	-0,67	0,0284
229748_x_at	LOC389833	similar to hypothetical protein MGC27019		4	-0,46	0,0285
223218_s_at	NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta	IKBZ, INAP	3p12-q12	-0,56	0,0299
227330_x_at	LOC653071	similar to hypothetical protein MGC27019			-0,45	0,0301
202068_s_at	LDLR	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	FH, FHC	19p13,3	-0,42	0,0323
202672_s_at	ATF3	activating transcription factor 3		1q32,3	-0,85	0,0332
218400_at	OAS3*	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	p100	12q24,2	-0,46	0,0341
220532_s_at	TMEM176B	transmembrane protein 176B	LR8	7q36,1	1,16	0,0366
211748_x_at	PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)	PGD2	9q34,2-q34,3	0,49	0,0369
208727_s_at	CDC42	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)		1p36,1	0,41	0,0379
214453_s_at	IFI44*	interferon-induced protein 44	MTAP44, p44	1p31,1	-0,56	0,0383
223217_s_at	NFKBIZ	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, zeta			-0,71	0,0386
227807_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	BAL, BAL1	3q13-q21	-0,42	0,0396
211663_x_at	PTGDS	prostaglandin D2 synthase 21kDa (brain)			0,42	0,0396
202014_at	PPP1R15A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 15A			-0,60	0,0408

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	Otros alias y designaciones	Localización en el cromosoma	LogFC	P valor*
205483_s_at	ISG15*	ISG15 ubiquitin-like modifier	G1P2	1p36,33	-0,52	0,0410
205220_at	GPR109B	G protein-coupled receptor 109B	PUMAG	12q24,31	-0,69	0,0429
215838_at	LILRA5	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily A (with TM domain), member 5	CD85	19q13,4	-0,66	0,0436

Leyenda. Los genes se encuentran ordenados por su p valor. Para evitar repetición, las designaciones y localizaciones cromosómicas de las sondas correspondientes al mismo gen se muestran sólo la primera vez que aparecen. Los genes conocidos por la literatura que se inducen por los IFNs de tipo 1, ó los genes que se encontraron regulados de forma significativa por el IFN β en el presente estudio se representan en negrita. Los genes que se inducen de forma predominante o selectiva por los IFNs de tipo 1 se representan con un asterisco. LogFC: cambio del logaritmo medio. *P valor: p valores no ajustados. Ninguno de los p valores fue inferior a 0,05 tras corrección por comparaciones múltiples.

Anexo 2. Genes expresados diferencialmente entre respondedores y no respondedores obtenidos con los *microarrays* tras 3 meses de tratamiento con IFN β .

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	LogFC	P valor*
204747_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1,82	4,5 x 10 ⁻⁴
229450_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	1,74	5,1 x 10 ⁻⁴
203153_at	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	1,83	0,0010
230233_at	RASGEF1B	RasGEF domain family, member 1B	1,52	0,0011
217502_at	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	1,72	0,00163
214059_at	IFI44	interferon-induced protein 44	1,55	0,0020
205660_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	1,43	0,0021
226757_at	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	1,58	0,0025
210797_s_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	1,28	0,0038
204533_at	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	1,88	0,0043
213797_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	1,55	0,0047
216598_s_at	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	1,61	0,0060
243934_at	-	unannotated	1,13	0,0067
214453_s_at	IFI44	interferon-induced protein 44	1,07	0,0075
239979_at	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	1,15	0,0081
214453_s_at	IFI44	interferon-induced protein 44	1,11	0,0075
239979_at	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	0,97	0,0081
226702_at	LOC129607	hypothetical protein LOC129607	1,49	0,0084

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	LogFC	P valor*
228607_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	1,19	0,0096
242625_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	1,02	0,0098
205483_s_at	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	0,89	0,0107
235276_at	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	0,94	0,0123
201670_s_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	1,16	0,0125
244447_at	KLF10	Kruppel-like factor 10	1,13	0,0127
219211_at	USP18	ubiquitin specific peptidase 18	0,94	0,0159
219863_at	HERC5	hect domain and RLD 5	1,07	0,0160
232375_at	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	1,15	0,0172
230314_at	-	unannotated	0,96	0,0192
216243_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	0,84	0,0202
206133_at	BIRC4BP	XIAP associated factor-1	0,83	0,0205
209969_s_at	STAT1	signal transducer and activator of transcription 1, 91kDa	0,84	0,0220
210873_x_at	APOBEC3A	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	0,84	0,0225
219519_s_at	SIGLEC1	sialic acid binding Ig-like lectin 1, sialoadhesin	1,29	0,0225
1555464_at	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	1,18	0,0227
205241_at	SCO2	SCO cytochrome oxidase deficient homolog 2 (yeast)	0,83	0,0227
241843_at	EIF5	eukaryotic translation initiation factor 5	0,94	0,0229
214038_at	CCL8	chemokine (C-C motif) ligand 8	1,60	0,0233

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	LogFC	P valor*
218943_s_at	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	0,87	0,0234
242907_at	GBP2	guanylate binding protein 2, interferon-inducible	0,76	0,0239
235157_at	PARP14	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 14	0,85	0,0248
227807_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	0,83	0,0250
241938_at	QKI	quaking homolog, KH domain RNA binding (mouse)	0,87	0,0257
228617_at	BIRC4BP	XIAP associated factor-1	0,78	0,0265
212657_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	0,77	0,0268
235102_x_at	GRAP	GRB2-related adaptor protein	1,12	0,0275
212659_s_at	IL1RN	interleukin 1 receptor antagonist	0,78	0,0278
202086_at	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	0,92	0,0290
219062_s_at	ZCCHC2	zinc finger, CCHC domain containing 2	0,75	0,0299
213002_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	0,72	0,0337
235643_at	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	0,89	0,0338
207113_s_at	TNF	tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)	0,88	0,0341
202269_x_at	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	0,81	0,0353
204439_at	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	1,04	0,0377
201668_x_at	MARCKS	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	0,78	0,0413
231577_s_at	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	0,77	0,0423
1555827_at	CCNL1	cyclin L1	1,04	0,0428

Sonda de Affymetrix	Nombre del gen	Descripción	LogFC	P valor*
218400_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	0,83	0,0453
217738_at	PBEF1	pre-B-cell colony enhancing factor 1	0,73	0,0464
221680_s_at	ETV7	ets variant gene 7 (TEL2 oncogene)	0,68	0,0466
230000_at	C17orf27	chromosome 17 open reading frame 27	0,72	0,0474
1558299_at	SIRPA	signal-regulatory protein alpha	0,72	0,0476
221345_at	FFAR2	free fatty acid receptor 2	1,07	0,0480
1552309_a_at	NEXN	nexilin (F actin binding protein)	0,90	0,0498

Leyenda. Los genes se encuentran ordenados por sus p valores. Los cambios en los niveles de expresión génica inducidos por el IFN β en los 3 primeros meses de tratamiento se compararon entre respondedores (n=21) y no respondedores (n=14). Los genes representados en negrita también se encontraron diferencialmente expresados a tiempo basal. LogFC: cambio del logaritmo medio. *P valor: p valores no ajustados. Ninguno de los p valores fue inferior a 0,05 tras corrección por comparaciones múltiples.

Anexo 3. Análisis de asociación alélica de los SNPs seleccionados a partir de los *arrays* y genotipados en la cohorte de validación de respondedores y no respondedores al IFN β .

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs7965705	Chr. 12	G	2,86	0,97 - 8,48	0,0500
rs1545867	Chr. 4	C	1,91	1,01 - 3,61	0,0500
rs2163788	Chr. 5	A	1,85	1,00 - 3,42	0,0500
rs13169783	Chr. 5	T	1,79	1,00 - 3,20	0,0500
rs3749804	Chr. 5	A	1,79	1,00 - 3,20	0,0500
rs9361884	Chr. 6	T	1,80	0,99 - 3,29	0,0534
rs4626563	Chr. 8	C	1,81	0,99 - 3,31	0,0539
rs12510981	Chr. 4	T	1,90	0,98 - 3,66	0,0544
rs12680655	Chr. 8	C	1,72	0,96 - 3,08	0,0665
rs10207133	Chr. 2	G	1,82	0,95 - 3,45	0,0678
rs7954360	Chr. 12	G	1,72	0,96 - 3,07	0,0681
rs1817324	Chr. 4	G	1,79	0,95 - 3,38	0,0684
rs7654751	Chr. 4	C	1,85	0,95 - 3,61	0,0695
rs1058132	Chr. 16	C	1,76	0,95 - 3,27	0,0706
rs9515399	Chr. 13	A	1,73	0,95 - 3,14	0,0713
rs10920178	Chr. 1	C	1,70	0,95 - 3,03	0,0730
rs6768558	Chr. 3	T	1,90	0,94 - 3,87	0,0735
rs1476581	Chr. 12	G	1,81	0,94 - 3,50	0,0754
rs12430267	Chr. 13	C	1,81	0,94 - 3,50	0,0754
rs6770140	Chr. 3	T	1,78	0,93 - 3,40	0,0813
rs12036328	Chr. 1	A	1,67	0,93 - 2,99	0,0826
rs1020612	Chr. 3	C	1,67	0,93 - 3,00	0,0852
rs12023326	Chr. 1	T	1,81	0,91 - 3,58	0,0887
rs4483986	Chr. 2	T	1,81	0,91 - 3,58	0,0887
rs17727982	Chr. 18	A	2,05	0,88 - 4,75	0,0898
rs771010	Chr. 2	C	1,65	0,92 - 2,95	0,0918
rs2822874	Chr. 21	A	1,76	0,91 - 3,42	0,0927
rs8010726	Chr. 14	A	1,65	0,91 - 3,00	0,0974
rs10927415	Chr. 1	C	1,71	0,89 - 3,31	0,1083

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs1033924	Chr. 10	C	2,14	0,83 - 5,53	0,1087
rs2837853	Chr. 21	C	1,79	0,86 - 3,72	0,1154
rs7537241	Chr. 1	T	1,59	0,89 - 2,87	0,1180
rs814202	Chr. 6	T	1,84	0,83 - 4,10	0,1308
rs9550256	Chr. 13	A	1,58	0,87 - 2,89	0,1332
rs4671584	Chr. 2	G	1,61	0,86 - 3,01	0,1344
rs1754435	Chr. 9	G	1,60	0,86 - 2,95	0,1346
rs6029334	Chr. 20	A	1,56	0,86 - 2,83	0,1384
rs10431923	Chr. 16	G	1,54	0,87 - 2,74	0,1408
rs1534967	Chr. 20	T	1,53	0,86 - 2,72	0,1477
rs10071585	Chr. 5	G	1,54	0,86 - 2,77	0,1489
rs167439	Chr. 12	C	2,67	0,67 - 10,66	0,1500
rs11131042	Chr. 3	G	1,75	0,81 - 3,79	0,1527
rs153970	Chr. 5	T	1,56	0,85 - 2,87	0,1530
rs1935784	Chr. 6	A	1,53	0,85 - 2,74	0,1540
rs12611958	Chr. 2	A	1,54	0,84 - 2,83	0,1598
rs11216033	Chr. 11	T	1,68	0,81 - 3,51	0,1623
rs964764	Chr. 8	C	1,51	0,84 - 2,70	0,1659
rs4785966	Chr. 16	A	1,55	0,82 - 2,91	0,1733
rs9906231	Chr. 17	G	1,49	0,84 - 2,66	0,1734
rs17221707	Chr. 13	T	1,60	0,81 - 3,16	0,1747
rs4964870	Chr. 12	G	1,51	0,83 - 2,74	0,1766
rs6535306	Chr. 4	C	1,51	0,83 - 2,74	0,1766
rs1907119	Chr. 4	C	1,58	0,81 - 3,10	0,1766
rs614488	Chr. 1	C	1,50	0,83 - 2,72	0,1796
rs7554551	Chr. 1	C	1,50	0,83 - 2,72	0,1796
rs1036047	Chr. 14	A	1,53	0,82 - 2,85	0,1808
rs2850092	Chr. 21	G	1,53	0,82 - 2,85	0,1808
rs4861322	Chr. 4	T	1,51	0,82 - 2,79	0,1859
rs13146351	Chr. 4	T	1,48	0,82 - 2,66	0,1923
rs10801517	Chr. 1	C	1,46	0,82 - 2,59	0,1989
rs228050	Chr. 21	T	1,45	0,82 - 2,59	0,2027
rs10934749	Chr. 3	G	1,45	0,81 - 2,58	0,2097

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs6817935	Chr. 4	T	1,63	0,75 - 3,56	0,2138
rs10771294	Chr. 12	C	1,62	0,76 - 3,46	0,2139
rs7002047	Chr. 8	T	1,46	0,80 - 2,67	0,2142
rs7896010	Chr. 10	G	1,44	0,81 - 2,58	0,2162
rs4940009	Chr. 18	A	1,44	0,81 - 2,58	0,2162
rs2242381	Chr. 12	G	1,56	0,76 - 3,22	0,2274
rs1372440	Chr. 2	T	1,46	0,79 - 2,70	0,2303
rs6533351	Chr. 4	G	1,44	0,79 - 2,62	0,2314
rs10980341	Chr. 9	A	1,81	0,67 - 4,89	0,2370
rs13239194	Chr. 7	C	1,43	0,79 - 2,58	0,2371
rs4941466	Chr. 13	T	1,47	0,77 - 2,81	0,2391
rs219226	Chr. 2	C	1,47	0,77 - 2,78	0,2391
rs2129663	Chr. 12	A	1,62	0,72 - 3,64	0,2439
rs555788	Chr. 10	G	1,40	0,79 - 2,49	0,2478
rs1058922	Chr. 2	A	1,63	0,70 - 3,76	0,2530
rs4598774	Chr. 13	G	1,45	0,76 - 2,78	0,2621
rs1498424	Chr. 15	C	1,42	0,77 - 2,60	0,2623
rs1286231	Chr. 1	A	1,39	0,78 - 2,48	0,2655
rs10737812	Chr. 1	C	1,39	0,78 - 2,48	0,2695
rs2807357	Chr. 1	C	1,40	0,77 - 2,56	0,2714
rs7869095	Chr. 9	A	1,40	0,77 - 2,56	0,2714
rs17122519	Chr. 14	G	1,39	0,76 - 2,53	0,2803
rs11002648	Chr. 10	C	1,38	0,76 - 2,48	0,2888
rs10821926	Chr. 10	C	1,36	0,77 - 2,42	0,2916
rs7201437	Chr. 16	C	1,38	0,76 - 2,50	0,2950
rs5757773	Chr. 22	A	1,37	0,76 - 2,47	0,2969
rs10485654	Chr. 20	C	1,91	0,56 - 6,58	0,2974
rs10103201	Chr. 8	A	1,37	0,76 - 2,47	0,2976
rs6700661	Chr. 1	T	1,48	0,70 - 3,13	0,3016
rs9377139	Chr. 6	G	1,38	0,75 - 2,54	0,3033
rs865094	Chr. 16	A	1,46	0,71 - 3,04	0,3047
rs7924009	Chr. 10	G	1,38	0,75 - 2,55	0,3048
rs2163197	Chr. 15	C	1,81	0,57 - 5,77	0,3066

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs2668063	Chr. 5	G	1,38	0,74 - 2,57	0,3067
rs17686362	Chr. 16	T	1,45	0,71 - 2,97	0,3072
rs4785424	Chr. 16	C	1,39	0,73 - 2,64	0,3106
rs2261327	Chr. 10	A	1,42	0,72 - 2,79	0,3113
rs12431986	Chr. 14	T	1,35	0,74 - 2,49	0,3284
rs1891192	Chr. 10	A	1,33	0,75 - 2,39	0,3301
rs7189933	Chr. 16	C	1,33	0,75 - 2,39	0,3301
rs17701746	Chr. 2	A	1,42	0,69 - 2,90	0,3363
rs893174	Chr. 16	C	1,33	0,74 - 2,37	0,3379
rs7817770	Chr. 8	T	1,32	0,74 - 2,35	0,3454
rs2949896	Chr. 13	C	1,46	0,66 - 3,24	0,3464
rs2915888	Chr. 5	A	1,32	0,74 - 2,36	0,3500
rs7657608	Chr. 4	C	1,37	0,71 - 2,66	0,3503
rs11577745	Chr. 1	G	1,47	0,65 - 3,35	0,3534
rs744166	Chr. 17	T	1,32	0,73 - 2,36	0,3560
rs7816085	Chr. 8	T	1,32	0,73 - 2,36	0,3560
rs1620976	Chr. 5	G	1,31	0,74 - 2,32	0,3601
rs1382362	Chr. 16	A	1,31	0,73 - 2,37	0,3680
rs4355154	Chr. 2	A	1,31	0,72 - 2,38	0,3686
rs7605145	Chr. 2	A	1,37	0,69 - 2,73	0,3689
rs13338370	Chr. 16	C	1,33	0,71 - 2,50	0,3699
rs6987192	Chr. 8	T	1,33	0,71 - 2,50	0,3699
rs2056976	Chr. 1	G	1,89	0,46 - 7,80	0,3709
rs10249191	Chr. 7	C	1,31	0,72 - 2,39	0,3725
rs10782601	Chr. 1	C	1,31	0,72 - 2,41	0,3797
rs6805561	Chr. 3	A	1,35	0,69 - 2,65	0,3843
rs2854946	Chr. 14	G	1,39	0,66 - 2,95	0,3878
rs745874	Chr. 2	G	1,39	0,66 - 2,95	0,3878
rs1020440	Chr. 4	T	1,39	0,66 - 2,95	0,3878
rs333321	Chr. 3	A	1,31	0,70 - 2,45	0,3889
rs7578017	Chr. 2	T	1,41	0,64 - 3,13	0,3922
rs7535608	Chr. 1	A	1,34	0,68 - 2,61	0,3942
rs9257879	Chr. 6	G	1,45	0,61 - 3,41	0,3974

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs6457282	Chr. 6	T	1,38	0,65 - 2,94	0,3980
rs9295931	Chr. 6	C	1,38	0,65 - 2,94	0,3980
rs4895051	Chr. 3	T	1,30	0,70 - 2,39	0,4051
rs10750007	Chr. 11	T	1,36	0,65 - 2,84	0,4071
rs950692	Chr. 5	T	1,42	0,61 - 3,32	0,4130
rs10946563	Chr. 6	T	1,27	0,71 - 2,27	0,4130
rs11690189	Chr. 2	T	1,27	0,71 - 2,26	0,4131
rs932150	Chr. 10	A	1,27	0,71 - 2,26	0,4191
rs782584	Chr. 2	G	1,27	0,71 - 2,26	0,4191
rs3911209	Chr. 5	T	1,27	0,71 - 2,27	0,4220
rs2169147	Chr. 4	G	1,28	0,70 - 2,33	0,4272
rs13379162	Chr. 14	T	1,30	0,68 - 2,48	0,4278
rs254399	Chr. 5	A	1,26	0,71 - 2,25	0,4285
rs6508168	Chr. 18	C	1,26	0,71 - 2,26	0,4306
rs7071521	Chr. 10	A	1,42	0,58 - 3,48	0,4379
rs2809901	Chr. 9	T	1,26	0,71 - 2,23	0,4380
rs2087864	Chr. 4	T	1,29	0,68 - 2,44	0,4414
rs1548962	Chr. 10	G	1,25	0,70 - 2,22	0,4460
rs988163	Chr. 4	A	1,25	0,70 - 2,22	0,4460
rs9551840	Chr. 13	C	1,36	0,61 - 3,04	0,4466
rs960631	Chr. 6	A	1,26	0,69 - 2,28	0,4483
rs10501367	Chr. 11	T	1,29	0,66 - 2,52	0,4497
rs6445690	Chr. 3	C	1,25	0,69 - 2,27	0,4522
rs440866	Chr. 2	A	1,24	0,70 - 2,21	0,4539
rs13249669	Chr. 8	A	1,27	0,68 - 2,39	0,4547
rs7174854	Chr. 15	T	1,43	0,56 - 3,68	0,4559
rs6437471	Chr. 3	G	1,30	0,65 - 2,59	0,4603
rs9652104	Chr. 13	A	1,33	0,61 - 2,90	0,4690
rs2212809	Chr. 21	C	1,24	0,70 - 2,19	0,4692
rs12597534	Chr. 16	G	1,27	0,66 - 2,47	0,4709
rs239962	Chr. 1	C	1,24	0,68 - 2,26	0,4740
rs517679	Chr. 11	T	1,23	0,69 - 2,18	0,4766
rs6557369	Chr. 6	A	1,28	0,65 - 2,53	0,4767

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs2317936	Chr. 1	T	1,24	0,69 - 2,22	0,4784
rs973967	Chr. 2	C	1,25	0,67 - 2,32	0,4801
rs2268611	Chr. 11	C	1,51	0,48 - 4,80	0,4814
rs310849	Chr. 12	T	1,25	0,67 - 2,34	0,4842
rs4670550	Chr. 2	T	1,23	0,69 - 2,20	0,4880
rs271766	Chr. 1	A	1,25	0,66 - 2,37	0,4918
rs7025913	Chr. 9	A	1,24	0,67 - 2,29	0,4923
rs1994726	Chr. 11	G	1,25	0,66 - 2,39	0,4953
rs6943535	Chr. 7	G	1,22	0,68 - 2,19	0,4973
rs2194980	Chr. 12	G	1,23	0,67 - 2,28	0,5033
rs2834941	Chr. 21	G	1,23	0,67 - 2,26	0,5042
rs4689558	Chr. 4	G	1,22	0,68 - 2,17	0,5067
rs6999868	Chr. 8	G	1,34	0,57 - 3,15	0,5087
rs7287616	Chr. 22	C	1,27	0,63 - 2,55	0,5090
rs12510614	Chr. 4	T	1,27	0,63 - 2,55	0,5090
rs1144700	Chr. 6	G	1,28	0,61 - 2,70	0,5133
rs5951426	Chr. X	G	1,33	0,56 - 3,13	0,5146
rs6470355	Chr. 8	G	1,33	0,56 - 3,17	0,5147
rs2322668	Chr. 13	G	1,21	0,68 - 2,15	0,5158
rs3824626	Chr. 10	G	1,21	0,68 - 2,16	0,5189
rs6602685	Chr. 10	C	1,20	0,67 - 2,16	0,5321
rs8008963	Chr. 14	T	1,20	0,68 - 2,13	0,5336
rs5761946	Chr. 22	C	1,20	0,68 - 2,13	0,5336
rs7787976	Chr. 7	A	1,20	0,68 - 2,13	0,5336
rs3787397	Chr. 20	T	1,22	0,64 - 2,33	0,5365
rs11642227	Chr. 16	T	1,21	0,66 - 2,19	0,5382
rs5065	Chr. 1	G	1,30	0,56 - 3,00	0,5406
rs277979	Chr. 5	G	1,20	0,66 - 2,17	0,5448
rs2297674	Chr. 1	C	1,21	0,65 - 2,25	0,5459
rs10495987	Chr. 2	C	1,21	0,65 - 2,25	0,5459
rs2712657	Chr. 12	G	1,21	0,64 - 2,29	0,5503
rs6472093	Chr. 8	C	1,20	0,66 - 2,17	0,5572
rs6823423	Chr. 4	T	1,19	0,67 - 2,10	0,5592

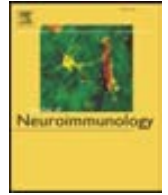
SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs4766674	Chr. 12	G	1,19	0,66 - 2,15	0,5598
rs10735079	Chr. 12	G	1,19	0,66 - 2,15	0,5598
rs5750857	Chr. 22	T	1,19	0,66 - 2,15	0,5598
rs11707585	Chr. 3	G	1,23	0,61 - 2,46	0,5650
rs9849164	Chr. 3	C	1,18	0,66 - 2,13	0,5702
rs4529480	Chr. 8	A	1,18	0,66 - 2,11	0,5805
rs4787432	Chr. 16	T	1,19	0,64 - 2,20	0,5808
rs721637	Chr. 14	G	1,21	0,61 - 2,40	0,5816
rs395843	Chr. 6	T	1,21	0,61 - 2,40	0,5816
rs417812	Chr. 6	A	1,18	0,66 - 2,11	0,5833
rs2823200	Chr. 21	A	1,17	0,66 - 2,08	0,5838
rs1202210	Chr. 6	T	1,17	0,66 - 2,08	0,5918
rs2254535	Chr. 10	C	1,31	0,48 - 3,62	0,5950
rs17101304	Chr. 10	T	1,30	0,50 - 3,38	0,5956
rs4933285	Chr. 10	C	1,30	0,50 - 3,38	0,5956
rs17212214	Chr. 8	G	1,22	0,59 - 2,53	0,5981
rs864643	Chr. 3	T	1,23	0,57 - 2,66	0,5993
rs10050717	Chr. 5	A	1,17	0,66 - 2,08	0,5997
rs225639	Chr. 6	A	1,17	0,65 - 2,08	0,6004
rs287746	Chr. 11	C	1,24	0,55 - 2,78	0,6085
rs1420473	Chr. 3	T	1,16	0,65 - 2,07	0,6102
rs7864052	Chr. 9	C	1,16	0,65 - 2,07	0,6102
rs12910872	Chr. 15	T	1,40	0,38 - 5,14	0,6104
rs1860401	Chr. 10	C	1,17	0,64 - 2,14	0,6137
rs2291853	Chr. 3	T	1,16	0,65 - 2,07	0,6152
rs2383618	Chr. 9	C	1,19	0,61 - 2,32	0,6180
rs4144737	Chr. 8	G	1,16	0,65 - 2,06	0,6198
rs1119845	Chr. 2	G	1,19	0,60 - 2,34	0,6228
rs7186668	Chr. 16	C	1,16	0,64 - 2,12	0,6255
rs786616	Chr. 2	G	1,18	0,61 - 2,26	0,6279
rs7406368	Chr. 17	G	1,16	0,64 - 2,09	0,6305
rs7908867	Chr. 10	A	1,19	0,59 - 2,41	0,6321
rs10498947	Chr. 6	G	1,38	0,36 - 5,32	0,6363

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs878441	Chr. 7	G	1,19	0,58 - 2,44	0,6364
rs17171051	Chr. 7	T	1,19	0,58 - 2,44	0,6364
rs10816	Chr. 13	A	1,15	0,64 - 2,04	0,6423
rs1551592	Chr. 4	C	1,19	0,56 - 2,53	0,6445
rs6420973	Chr. 1	C	1,15	0,64 - 2,07	0,6455
rs461822	Chr. 20	A	1,19	0,57 - 2,46	0,6470
rs11223231	Chr. 11	C	1,15	0,63 - 2,08	0,6482
rs4848725	Chr. 2	C	1,20	0,54 - 2,65	0,6516
rs12711551	Chr. 2	C	1,31	0,40 - 4,28	0,6565
rs1922240	Chr. 7	T	1,14	0,63 - 2,07	0,6602
rs155164	Chr. 6	A	1,25	0,46 - 3,39	0,6609
rs976000	Chr. 4	G	1,17	0,57 - 2,39	0,6649
rs2289025	Chr. 2	G	1,14	0,63 - 2,04	0,6701
rs13101986	Chr. 4	C	1,14	0,62 - 2,08	0,6748
rs7029188	Chr. 9	T	1,13	0,64 - 2,00	0,6748
rs4865194	Chr. 4	T	1,20	0,51 - 2,79	0,6772
rs1474194	Chr. 2	T	1,14	0,62 - 2,10	0,6779
rs11088486	Chr. 21	G	1,13	0,63 - 2,01	0,6912
rs10251504	Chr. 7	A	1,12	0,63 - 1,99	0,6924
rs308956	Chr. 3	G	1,13	0,61 - 2,10	0,6954
rs6470235	Chr. 8	A	1,13	0,60 - 2,11	0,7037
rs7750190	Chr. 6	T	1,14	0,58 - 2,23	0,7137
rs2216414	Chr. 2	C	1,17	0,50 - 2,72	0,7215
rs225604	Chr. 6	A	1,11	0,62 - 1,97	0,7217
rs9998057	Chr. 4	C	1,11	0,62 - 1,96	0,7316
rs16953561	Chr. 16	G	1,12	0,58 - 2,16	0,7324
rs11776584	Chr. 8	G	1,12	0,58 - 2,16	0,7324
rs7634587	Chr. 3	A	1,11	0,62 - 1,98	0,7329
rs13123986	Chr. 4	G	1,11	0,62 - 1,98	0,7354
rs4404277	Chr. 2	T	1,10	0,62 - 1,97	0,7395
rs4834307	Chr. 4	T	1,10	0,62 - 1,95	0,7414
rs6951291	Chr. 7	C	1,10	0,61 - 1,98	0,7524
rs10819954	Chr. 9	C	1,12	0,56 - 2,22	0,7541

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs11655682	Chr. 17	C	1,11	0,58 - 2,12	0,7571
rs986447	Chr. 2	T	1,13	0,53 - 2,39	0,7594
rs13190784	Chr. 6	C	1,13	0,53 - 2,39	0,7594
rs2187297	Chr. 21	A	1,09	0,62 - 1,94	0,7608
rs9373833	Chr. 6	T	1,10	0,61 - 1,98	0,7609
rs7168274	Chr. 15	G	1,11	0,55 - 2,24	0,7614
rs7936310	Chr. 11	A	1,09	0,61 - 1,97	0,7657
rs6750230	Chr. 2	A	1,09	0,61 - 1,97	0,7657
rs2591018	Chr. 8	A	1,09	0,61 - 1,97	0,7657
rs6572814	Chr. 14	T	1,10	0,59 - 2,04	0,7670
rs1795333	Chr. 3	C	1,09	0,61 - 1,93	0,7703
rs12458282	Chr. 18	C	1,10	0,58 - 2,09	0,7705
rs2664057	Chr. 1	A	1,10	0,59 - 2,03	0,7730
rs500507	Chr. 3	G	1,11	0,54 - 2,30	0,7763
rs1984190	Chr. 13	C	1,09	0,61 - 1,92	0,7798
rs7556787	Chr. 2	G	1,10	0,57 - 2,10	0,7853
rs2218115	Chr. 1	C	1,08	0,60 - 1,94	0,7875
rs10500547	Chr. 16	T	1,11	0,51 - 2,42	0,7991
rs377027	Chr. 16	C	1,08	0,59 - 1,99	0,8035
rs776771	Chr. 9	C	1,08	0,58 - 2,01	0,8087
rs6766262	Chr. 3	C	1,12	0,46 - 2,73	0,8091
rs4669493	Chr. 2	T	1,08	0,58 - 2,00	0,8122
rs11929757	Chr. 4	A	1,07	0,60 - 1,90	0,8172
rs3198082	Chr. 12	C	1,07	0,58 - 2,00	0,8209
rs16925235	Chr. 10	G	1,08	0,54 - 2,17	0,8244
rs17366684	Chr. 20	T	1,10	0,45 - 2,68	0,8316
rs1477595	Chr. 8	G	1,16	0,30 - 4,45	0,8329
rs6594882	Chr. 5	G	1,06	0,60 - 1,90	0,8358
rs7723278	Chr. 5	T	1,07	0,57 - 2,02	0,8386
rs644748	Chr. 6	A	1,07	0,54 - 2,12	0,8388
rs2331795	Chr. 17	C	1,10	0,44 - 2,78	0,8403
rs7894605	Chr. 10	C	1,12	0,35 - 3,62	0,8471
rs12068336	Chr. 1	G	1,10	0,42 - 2,90	0,8493

SNP	Localización	Alelo riesgo	OR	IC 95%	P valor
rs6899410	Chr. 6	T	1,06	0,59 - 1,89	0,8544
rs11247171	Chr. 15	G	1,06	0,58 - 1,93	0,8554
rs6439919	Chr. 3	G	1,05	0,59 - 1,89	0,8637
rs10807241	Chr. 6	T	1,05	0,59 - 1,89	0,8637
rs1007408	Chr. 3	G	1,05	0,58 - 1,91	0,8665
rs5940878	Chr. X	C	1,06	0,55 - 2,03	0,8674
rs6726578	Chr. 2	C	1,07	0,48 - 2,39	0,8683
rs7142110	Chr. 14	A	1,05	0,59 - 1,86	0,8692
rs4663891	Chr. 2	A	1,05	0,56 - 1,97	0,8742
rs1630651	Chr. 4	G	1,06	0,54 - 2,06	0,8756
rs1146815	Chr. 13	A	1,05	0,58 - 1,89	0,8774
rs885181	Chr. 2	G	1,05	0,58 - 1,89	0,8774
rs1334598	Chr. 10	G	1,10	0,34 - 3,53	0,8788
rs7040930	Chr. 9	C	1,05	0,59 - 1,85	0,8790
rs564702	Chr. 3	G	1,05	0,58 - 1,89	0,8825
rs6902892	Chr. 6	A	1,04	0,59 - 1,85	0,8888
rs605928	Chr. 15	C	1,05	0,52 - 2,09	0,8953
rs6911207	Chr. 6	G	1,05	0,52 - 2,09	0,8953
rs1395540	Chr. 12	G	1,04	0,55 - 1,97	0,9038

Leyenda. Los SNPs están ordenados por p valor. OR: odds ratio; IC 95%: intervalo de confianza del 95%. Chr.: cromosoma.



Short communication

HLA class I and II alleles and response to treatment with interferon-beta in relapsing–remitting multiple sclerosis

M. Comabella^{a,*}, M. Fernández-Arquero^b, J. Río^a, A. Guinea^a, M. Fernández^a,
M.C. Cenit^b, E.G. de la Concha^b, X. Montalban^a

^a Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Barcelona, Spain

^b Clinical Immunology Department, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 October 2008

Received in revised form 24 December 2008

Accepted 15 January 2009

Keywords:

Multiple sclerosis

HLA class I

HLA class II

Interferon-beta

ABSTRACT

In the present study, we investigated the influence of HLA class I and class II genes in the response to interferon-beta (IFN β) in multiple sclerosis (MS) patients. HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 DNA typing was performed by polymerase chain reaction–sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) in a cohort of 149 relapsing–remitting MS patients classified into IFN β responders ($n = 74$) and non-responders ($n = 75$) based on stringent clinical criteria. Distribution of HLA class I and class II alleles individually and the HLA-DR2 haplotype was similar between responders and non-responders to treatment. These findings do not support a role of the HLA class I and class II genes as modifiers of the response to IFN β .

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Interferon-beta (IFN β) is the most widely prescribed disease modifying therapy for relapsing–remitting multiple sclerosis (RRMS) and has demonstrated a beneficial effect on disease activity (The Interferon β Multiple Sclerosis Study Group, 1993; Jacobs et al., 1996; PRISMS, 1998). However, IFN β is partially effective and its long-term impact on disease progression remains obscure. In addition, there is a relatively large proportion of patients that will show a lack of response to IFN β (Río et al., 2002). Although several pharmacogenetic studies aimed to identify genes that may influence the response to IFN β (Sriram et al., 2003; Cunningham et al., 2005; Leyva et al., 2005; Martínez et al., 2005; Weinstock-Guttman et al., 2007; Byun et al., 2008), to date, there is a lack of markers reliably associated with the response to treatment.

It has long been known that alleles and haplotypes of the HLA class II region on chromosome 6p21 contribute by far the most to genetic susceptibility to MS. In particular, the HLA class II genes -DRB1*1501, -DRB5*0101, -DQA1*0102, and -DQB1*0602 have consistently been found associated with the disease in many genetic studies (Olerup and Hillert, 1991; Haines et al., 1998). Given the important role of the HLA class II region in the immune response, several studies have investi-

gated the influence of HLA class II (DRB1, DQA1 and DQB1) alleles and the HLA-DR2 haplotype in the response to disease modifying therapies in MS (Fusco et al., 2001; Villoslada et al., 2002; Fernández et al., 2005; Grossman et al., 2007). Concerning IFN β , three previous studies showed a lack of association between the HLA class II region and the response to treatment (Fusco et al., 2001; Villoslada et al., 2002; Fernández et al., 2005).

Although far less explored, HLA class I genes have also been associated with MS. In particular, the HLA-A*02 and HLA-C*05 alleles were found to exert a protective effect in susceptibility to MS independent of the HLA-DRB1 locus (Brynedal et al., 2007; Yeo et al., 2007). Despite these observations that point to a role of the HLA class I region in the regulation of the immune response in MS, the influence of HLA class I alleles in the response to IFN β treatment has not been studied.

In the present study we aimed to evaluate an association between HLA class I (-A, -B, -C) and class II (-DRB1, -DQA1, -DQB1) alleles and the response to IFN β in a large cohort of RRMS patients classified into responders and non-responders to treatment based on stringent clinical criteria.

2. Materials and methods

2.1. Study design and clinical assessment

This is a study of RRMS patients treated with IFN β at the outpatient clinic of the CEM-Cat. All these patients were included in a follow-up protocol collecting demographic and basal and longitudinal clinical

* Corresponding author. Unitat de Neuroimmunologia Clínica, CEM-Cat. Edif. EUI 2^a planta, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119-129 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 932746834; fax: +34 932746084.

E-mail address: mcomabel@ir.vhebron.net (M. Comabella).

Table 1

Demographic and baseline clinical characteristics of MS patients responders and non-responders to IFN β treatment.

Characteristics	Responders	Non-responders
n (%)	74 (49.7)	75 (50.3)
Age (years)	32.0 (7.5)	32.3 (9.3)
Female/male (% women)	52/22 (70.3)	58/17 (77.3)
Duration of disease (years)	5.9 (5.7)	5.6 (5.1)
EDSS ^a	2.0 (1.5–3.5)	2.5 (1.5–2.5)
Number of relapses in the two previous years	2.9 (1.0)	2.8 (2.0)
Type of IFN β [n (%)]		
IFN β 1a IM	22 (29.7)	26 (34.7)
IFN β 1b SC	33 (44.6)	27 (36.0)
IFN β 1a SC	19 (25.7)	22 (29.3)

Data are expressed as mean (standard deviation) unless otherwise stated. EDSS: Expanded Disability Status Scale. IM: Intramuscular. SC: subcutaneous.

^a Data are expressed as median (interquartile range).

data, as previously described (Río et al., 2006). The study was approved by the local ethics committee and all patients gave their informed consent to be included in the study.

2.2. Definition of response to IFN β therapy

Clinical criteria of response to IFN β were applied after two years of treatment. Patients were labeled as responders when there was no increase in the Expanded Disability Status Score (EDSS) and no relapses during the follow-up period. Patients were classified as non-responders when one or more relapses occurred during the follow-up period and when an increase of at least 1 point was observed in the EDSS that persisted for a minimum of two consecutive scheduled visits separated by a 6-month interval (Río et al., 2006). Patients with intermediate phenotypes of responses, i.e., presence of relapses and increase of less than 1 point in the EDSS score were not included in the study.

2.3. HLA class I and class II molecular typing

Genomic DNA from peripheral blood samples was obtained using standard methods. HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 DNA typing was performed by polymerase chain reaction-sequence-specific oligonucleotide (PCR-SSO) according to the manufacturer's recommendations (Tepnel Lifecodes Corp, Stamford, CT USA).

Table 2

HLA-A allele frequencies in 74 responders and 75 non-responders to IFN β .

HLA-A	Responders n (%)	Non-responders n (%)	p value
01	13 (18.3%)	12 (16.2%)	0.827
02	30 (42.3%)	30 (40.5%)	0.867
03	14 (19.7%)	21 (28.4%)	0.249
11	12 (16.9%)	10 (13.5%)	0.647
23	6 (8.5%)	7 (9.5%)	1.000
24	10 (14.1%)	11 (14.9%)	1.000
25	3 (4.2%)	3 (4.1%)	1.000
26	10 (14.1%)	9 (12.2%)	0.808
29	10 (14.1%)	9 (12.2%)	0.808
30	9 (12.7%)	5 (6.8%)	0.269
31	1 (1.4%)	4 (5.4%)	0.367
32	5 (7.0%)	8 (10.8%)	0.564
33	2 (2.8%)	1 (1.4%)	0.615
34	0 (0%)	1 (1.4%)	1.000
62	0 (0%)	1 (1.4%)	1.000
66	2 (2.8%)	0 (0%)	0.238
68	8 (11.3%)	5 (6.8%)	0.394
69	1 (1.4%)	0 (0%)	0.490
74	1 (1.4%)	0 (0%)	0.490
80	1 (1.4%)	0 (0%)	0.490

Table 3

Frequency of HLA-B alleles in responders and non-responders to IFN β .

HLA-B	Responders n (%)	Non-responders n (%)	p value
07	24 (34.3%)	17 (23.3%)	0.195
08	7 (10.0%)	4 (5.5%)	0.360
13	0 (0%)	4 (5.5%)	0.120
14	11 (15.7%)	10 (13.7%)	0.815
15	5 (7.1%)	6 (8.2%)	1.000
18	13 (18.6%)	14 (19.2%)	1.000
27	4 (5.7%)	3 (4.1%)	0.715
35	12 (17.1%)	14 (19.2%)	0.830
37	0 (0%)	1 (1.4%)	1.000
38	1 (1.4%)	2 (2.7%)	1.000
39	2 (2.9%)	5 (6.8%)	0.442
40	8 (11.4%)	8 (11.0%)	1.000
41	1 (1.4%)	1 (1.4%)	1.000
44	11 (15.7%)	17 (23.3%)	0.296
45	1 (1.4%)	1 (1.4%)	1.000
49	6 (8.6%)	4 (5.5%)	0.527
50	4 (5.7%)	7 (9.6%)	0.533
51	11 (15.7%)	12 (16.4%)	1.000
53	1 (1.4%)	2 (2.7%)	1.000
55	1 (1.4%)	1 (1.4%)	1.000
56	1 (1.4%)	0 (0%)	0.490
57	5 (7.1%)	6 (8.2%)	1.000
58	2 (2.9%)	0 (0%)	0.238

2.4. Statistical analysis

Statistical analysis was performed by using the SPSS 15.0 package (SPSS Inc, Chicago, IL) for MS-Windows. Differences in the HLA-A, -B, -C, -DRB1, -DQA1, and -DQB1 allele frequencies between responders and non-responders to IFN β were compared using the Fisher's exact test. A *p*-value <0.05 was considered to be statistically significant.

3. Results

A total of 149 RRMS patients fulfilled the response criteria and were included in the study. Of these, 74 (49.7%) patients were classified as responders and 75 (50.3%) classified as non-responders to IFN β . As shown in Table 1, demographic and baseline clinical characteristics were similar between responders and non-responders.

We first compared the HLA class I allele frequencies between responders and non-responders to IFN β . A summary of the absolute numbers and percentages obtained for each allele in responders and non-responders is shown in Tables 1 (HLA-A), 2 (HLA-B), and 3 (HLA-C). No statistically significant differences in the frequency of HLA-A, HLA-B, and HLA-C alleles were observed between the two groups. A trend toward a statistically significantly higher percentage of patients carrying HLA-C*15 alleles was observed in the non-responder group (*p* = 0.064). Nevertheless, these results should be taken with

Table 4

Distribution of HLA-C allele frequencies in responders and non-responders to IFN β .

HLA-C	Responders n (%)	Non-responders n (%)	p value
01	2 (2.9%)	3 (4.1%)	1.000
02	8 (11.8%)	6 (8.2%)	0.578
03	11 (16.2%)	9 (12.3%)	0.631
04	15 (22.1%)	18 (24.7%)	0.843
05	10 (14.7%)	11 (15.1%)	1.000
06	9 (13.2%)	13 (17.8%)	0.494
07	41 (60.3%)	37 (50.7%)	0.310
08	11 (16.2%)	9 (12.3%)	0.631
12	3 (4.4%)	8 (11.1%)	0.210
14	5 (7.4%)	3 (4.1%)	0.482
15	1 (1.5%)	7 (9.6%)	0.064
16	7 (10.3%)	9 (12.3%)	0.794
18	1 (1.5%)	1 (1.4%)	1.000

Table 5
HLA class II allele frequencies in 74 responders and 75 non-responders to IFN β .

HLA-II	Responders n (%)	Non-responders n (%)	p value
<i>DRB1</i>			
01	12 (16.2%)	7 (9.3%)	0.229
03	17 (23.0%)	15 (20.0%)	0.694
04	22 (29.7%)	17 (22.7%)	0.356
07	15 (20.3%)	23 (30.7%)	0.188
08	9 (12.2%)	8 (10.7%)	0.802
09	1 (1.4%)	2 (2.7%)	1.000
10	1 (1.4%)	1 (1.3%)	1.000
11	9 (12.2%)	16 (21.3%)	0.188
13	16 (21.6%)	12 (16.0%)	0.409
14	6 (8.1%)	5 (6.7%)	0.765
15	29 (39.2%)	32 (42.7%)	0.740
16	2 (2.7%)	3 (4.0%)	1.000
<i>DQA1</i>			
01	48 (65.8%)	52 (70.3%)	0.599
02	15 (20.5%)	23 (31.1%)	0.187
03	21 (28.8%)	19 (25.7%)	0.714
04	9 (12.3%)	8 (10.8%)	0.802
05	27 (37.0%)	30 (40.5%)	0.736
<i>DQB1</i>			
02	30 (41.1%)	36 (48.0%)	0.413
03	33 (45.2%)	38 (50.7%)	0.516
04	9 (12.3%)	8 (10.7%)	0.801
05	20 (27.4%)	16 (21.3%)	0.446
06	37 (50.7%)	39 (52.0%)	1.000

caution owing to the low representation of patients HLA-C*15 positive ($n = 8$).

We next compared the frequencies of HLA class II alleles between responders and non-responders to IFN β treatment. As shown in Table 4, the distribution of HLA-DRB1, -DQA1, and -DQB alleles was similar between the two groups, and none of the HLA class II alleles was found associated with the responder status. When we analyzed the distribution of HLA-DR2 haplotypes (DRB1*1501-DQA1*0102-DQB1*0602) in the study patients, 25 (33.8%) responders and 29 (38.7%) non-responders were HLA-DR2 positive, and the difference was not statistically significant ($p = 0.610$).

Finally, when the frequency of HLA-A, -B, and -C alleles was compared between responders and non-responders stratified based on the presence or absence of the HLA-DR2 haplotype, no statistically significant differences were obtained for any of the HLA class I alleles (data not shown).

4. Discussion

In the present study we aimed to identify an association between genes of the HLA class I and class II regions and the response to IFN β . A few studies have addressed the role of the HLA region in the response to IFN β in MS. Fusco et al. (2001) reported a lack of association between the HLA-DRB1*1501 allele and the response to IFN β in a cohort of 39 RRMS patients, of whom 22 were classified as responders and 17 as non-responders to treatment.

In another study by Villoslada et al. (2002), in which the CEM-Cat participated, the authors analyzed the distribution of the HLA-DR2 haplotype in a cohort of RRMS patients treated with IFN β , and was found to be similar between responders ($n = 77$) and non-responders ($n = 57$) to treatment.

In a more recent study, Fernández et al. (2005) investigated the influence of the HLA class II alleles -DRB1, -DQA1, and -DQB1 in 96 MS patients (61 patients with RRMS and 35 with secondary progressive MS), 66 of whom were responders and 30 non-responders to IFN β . No association was found between HLA class II alleles and response to treatment.

In our study, a cohort of 149 RRMS patients was genotyped for HLA class II genes -DRB1, -DQA1, and -DQB1 individually and the HLA-DR2 haplotype. In addition, to evaluate a possible effect of the HLA class I region in the response to treatment, genotyping of the HLA-A, -B, and -C genes was also included in the study. For all the HLA genes typed, allelic frequencies were similar between responders and non-responders to IFN β (Table 5).

Although strong evidence exists in the literature for an association between HLA class I and class II alleles and susceptibility to MS, currently available data do not support a role of the HLA genes as modifiers of the response to IFN β .

For IFN β , no consensus on the definition of lack of response to treatment has been reached yet. However, it is highly unlikely that the use of different criteria for treatment failure would result in a significant association between HLA genes and treatment response. The latter is supported by the fact that different strictness criteria were used to evaluate treatment failure, and ranged from less rigorous criteria requiring one or more relapses or sustained progression of 0.5 or more points on the EDSS after 1 year of IFN β treatment (Fernández et al., 2005), to more stringent criteria requiring presence of relapses and sustained progression of 1 or more points on the EDSS after two years of treatment (present study). In the studies by Fusco et al. (2001) and Villoslada et al. (2002) intermediate criteria were used to define treatment failure.

In conclusion, our results confirm the previously reported lack of association between HLA class II alleles and the HLA-DR2 haplotype and the response to IFN β , and extend this finding to the HLA class I alleles -A, -B, and -C that were also analyzed in our study.

Acknowledgements

This study was supported by a grant from the DANA Foundation's Neuroimmunology program. The authors thank the "Red Española de Esclerosis Múltiple (REEM)" sponsored by the "Fondo de Investigación Sanitaria" (FIS), Ministry of Science and Innovation, Spain, and the "Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (SGR 2005-1081)", sponsored by the "Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca" (AGAUR), Generalitat de Catalunya, Spain.

References

- Brynedal, B., Duvefelt, K., Jonasdottir, G., Roos, I.M., Akesson, E., Palmgren, J., Hillert, J., 2007. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 2, e664.
- Byun, E., Caillier, S.J., Montalban, X., Villoslada, P., Fernández, O., Brassat, D., Comabella, M., Wang, J., Barcellos, L.F., Baranzini, S.E., Oksenberg, J.R., 2008. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* 65, 337–344.
- Cunningham, S., Graham, C., Hutchinson, M., Droogan, A., O'Rourke, K., Patterson, C., McDonnell, G., Hawkins, S., Vandembroeck, K., 2005. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN-beta treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin. Pharmacol. Ther.* 78, 635–646.
- Fernández, O., Fernández, V., Mayorga, C., Guerrero, M., León, A., Tamayo, J.A., Alonso, A., Romero, F., Leyva, L., Alonso, A., Luque, G., de Ramón, E., 2005. HLA class II and response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Acta Neurol. Scand.* 112, 391–394.
- Fusco, C., Andreone, V., Coppola, G., Luongo, V., Guerini, F., Pace, E., Florio, C., Pirozzi, G., Lanzillo, R., Ferrante, P., Vivo, P., Mini, M., Macri, M., Orefice, G., Lombardi, M.L., 2001. HLADRB1*1501 and response to copolymer-1 therapy in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Neurology* 57, 1976–1979.
- Grossman, I., Avidan, N., Singer, C., Goldstaub, D., Hayardeny, L., Eyal, E., Ben-Asher, E., Paperna, T., Pe'er, I., Lancet, D., Beckmann, J.S., Miller, A., 2007. Pharmacogenetics of glatiramer acetate therapy for multiple sclerosis reveals drug-response markers. *Pharmacogenet. Genomics* 17, 657–666.
- Haines, J.L., Terwedow, H.A., Burgess, K., Pericak-Vance, M.A., Rimmler, J.B., Martin, E.R., Oksenberg, J.R., Lincoln, R., Zhang, D.Y., Banatao, D.R., Gatto, N., Goodkin, D.E., Hauser, S.L., 1998. Linkage of the MHC to familial multiple sclerosis suggests genetic heterogeneity. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *Hum. Mol. Genet.* 7, 1229–1234.
- Jacobs, L.D., Cookfair, D.L., Rudick, R.A., Herndon, R.M., Richert, J.R., Salazar, A.M., Fischer, J.S., Goodkin, D.E., Granger, C.V., Simon, J.H., Alam, J.J., Bartoszak, D.M., Bourdette, D.N., Braiman, J., Brownschield, C.M., Coats, M.E., Cohan, S.L., Dougherty, D.S., Kinkel, R.P., Mass, M.K., Munschauer III, F.E., Priore, R.L., Pullicino, P.M., Scherokman, B.J., Whitham, R.H., et al., 1996. Intramuscular interferon beta-1a for disease

- progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann. Neurol.* 39, 285–294.
- Leyva, L., Fernández, O., Fedetz, M., Blanco, E., Fernández, V.E., Oliver, B., León, A., Pinto-Medel, M.J., Mayorga, C., Guerrero, M., Luque, G., Alcina, A., Matesanz, F., 2005. IFNAR1 and IFNAR2 polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *J. Neuroimmunol.* 163, 165–171.
- Martínez, A., de las Heras, V., Mas Fontao, A., Bartolomé, M., de la Concha, E.G., Urcelay, E., Arroyo, R., 2006. An IFNG polymorphism is associated with interferon-beta response in Spanish MS patients. *J. Neuroimmunol.* 173, 196–199.
- Olerup, O., Hillert, J., 1991. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens* 38, 1–15.
- PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group, 1998. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 352, 1498–1504.
- Río, J., Nos, C., Tintoré, M., Borrás, C., Galán, I., Comabella, M., Montalban, X., 2002. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing–remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann. Neurol.* 52, 400–406.
- Río, J., Nos, C., Tintoré, M., Téllez, N., Galán, I., Pelayo, R., Comabella, M., Montalban, X., 2006. Defining the response to interferon-beta in relapsing–remitting multiple sclerosis patients. *Ann. Neurol.* 59, 344–352.
- Sriram, U., Barcellos, L.F., Villoslada, P., Río, J., Baranzini, S.E., Caillier, S., Stillman, A., Hauser, S.L., Montalban, X., Oksenberg, J.R., 2003. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun.* 4, 147–152.
- The Interferon β Multiple Sclerosis Study Group, 1993. Interferon beta-1b is effective in relapsing–remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 43, 655–661.
- Villoslada, P., Barcellos, L.F., Río, J., Begovich, A.B., Tintore, M., Sastre-Garriga, J., Baranzini, S.E., Casquero, P., Hauser, S.L., Montalban, X., Oksenberg, J.R., 2002. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain. Role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta. *J. Neuroimmunol.* 130, 194–201.
- Weinstock-Guttman, B., Tamaño-Blanco, M., Bhasi, K., Zivadinov, R., Ramanathan, M., 2007. Pharmacogenetics of MXA SNPs in interferon- β treated multiple sclerosis patients. *J. Neuroimmunol.* 182, 236–239.
- Yeo, T.W., De Jager, P.L., Gregory, S.G., Barcellos, L.F., Walton, A., Goris, A., Fenoglio, C., Ban, M., Taylor, C.J., Goodman, R.S., Walsh, E., Wolfish, C.S., Horton, R., Traherne, J., Beck, S., Trowsdale, J., Caillier, S.J., Ivinson, A.J., Green, T., Pobywajlo, S., Lander, E.S., Pericak-Vance, M.A., Haines, J.L., Daly, M.J., Oksenberg, J.R., Hauser, S.L., Compston, A., Hafler, D.A., Rioux, J.D., Sawcer, S., 2007. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 61, 228–236.

A type I interferon signature in monocytes is associated with poor response to interferon- β in multiple sclerosis

M. Comabella,¹ J. D. Lünemann,^{2,†} J. Río,¹ A. Sánchez,³ C. López,¹ E. Julià,¹ M. Fernández,¹ L. Nonell,¹ M. Camiña-Tato,¹ F. Deisenhammer,⁴ E. Caballero,⁵ M. T. Tortola,⁵ M. Prinz,⁶ X. Montalban^{1,*} and R. Martin^{7,*}‡

1 Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, CEM-Cat, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona, 08035 Barcelona, Spain

2 Laboratory of Viral Immunobiology, Christopher H. Browne Center for Immunology and Immune Diseases, The Rockefeller University, NY 10021-6399, USA

3 Departament d'Estadística, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

4 Clinical Department of Neurology, Innsbruck Medical University, A-6020 Innsbruck, Austria

5 Servei de Microbiologia, HUVH, 08035 Barcelona, Spain

6 Institute of Neuropathology, Universität Freiburg, D-79106 Freiburg, Germany

7 Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (icrea), 08035 Barcelona, Spain

*These authors contributed equally to this work.

†Present address: Viral Immunobiology, Institute of Experimental Immunology, University Hospital of Zürich, 8091 Zürich, Switzerland

‡Present address: Institute for Neuroimmunology and Clinical multiple sclerosis Research, Center for Molecular Neurobiology Hamburg (ZMNH), University Medical Center Eppendorf, 20251 Hamburg, Germany

Correspondence to: Manuel Comabella, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, CEM-Cat. Edif. EUI 2^a planta, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Pg. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain
E-mail: mcomabel@ir.vhebron.net

The effect of interferon-beta in multiple sclerosis is modest and many patients do not respond to treatment. To date, no single biomarker reliably correlates with responsiveness to interferon- β in multiple sclerosis. In the present study, genome-wide expression profiling was performed in peripheral blood mononuclear cells from 47 multiple sclerosis patients treated with interferon- β for a minimum of 2 years and classified as responders and non-responders based on clinical criteria. A validation cohort of 30 multiple sclerosis patients was included in the study to replicate gene-expression findings. Before treatment,

interferon- β responders and non-responders were characterized by differential expression of type I interferon-induced genes with overexpression of the type I interferon-induced genes in non-responders. Upon treatment the expression of these genes remained unaltered in non-responders, but was strongly upregulated in responders. Functional experiments showed a selective increase in phosphorylated STAT1 levels and interferon receptor 1 expression in monocytes of non-responders at baseline. When dissecting this type I interferon signature further, interferon- β non-responders were characterized by increased monocyte type I interferon secretion upon innate immune stimuli via toll-like receptor 4, by increased endogenous production of type I interferon, and by an elevated activation status of myeloid dendritic cells. These findings indicate that perturbations of the type I interferon signalling pathway in monocytes are related to lack of response to interferon- β , and type I interferon-regulated genes may be used as response markers in interferon- β treatment.

Keywords: multiple sclerosis; monocytes; gene-expression signature; interferon-beta

Abbreviations: EBV = Epstein Barr virus; HHV-6 = human herpesvirus 6; IFN = interferon; IFN β = interferon-beta; PBMC = peripheral blood mononuclear cells; TLR = toll-like receptor

Introduction

Interferons (IFNs) are inducible cytokines with potent antiviral and anti-proliferative effects. IFN-beta (IFN β), a type I IFN, is the most commonly used treatment for relapsing-remitting multiple sclerosis (RRMS). It decreases relapse rates by ~30%, reduces brain magnetic resonance imaging (MRI) activity, and slows progression of disability (The Interferon β Multiple Sclerosis Study Group, 1993; Jacobs *et al.*, 1996; PRISMS, 1998). The effects of IFN β are modest, and a considerable fraction of patients do not respond to treatment (Rio *et al.*, 2002). Criteria to classify patients into responders and non-responders to IFN β are usually applied after 1 or 2 years follow-up. Hence many patients are treated with IFN β without benefit and at high socioeconomic cost. Furthermore, patients on ineffective therapy accumulate further disability and often suffer treatment-related side effects. It is, therefore, highly desirable to identify biomarkers that allow early identification of treatment failure or ideally even predict non-responder status. Although several markers have previously been shown to be of potential use to this end (Baranzini *et al.*, 2005; Soilu-Hanninen *et al.*, 2005; Minagar *et al.*, 2007), to date there is no definitive biomarker that allows one to predict the response to IFN β in multiple sclerosis.

We employed oligonucleotide microarrays to identify differentially expressed genes associated with the response to IFN β treatment in RRMS patients. Our results show that peripheral blood mononuclear cells (PBMs) from patients who will subsequently become non-responders to treatment are characterized by a type I IFN signature that was selectively altered in monocytes.

Materials and methods

Study design and clinical assessment

This is a prospective study of RRMS patients receiving treatment with IFN β . Patients were included in a follow-up protocol collecting basal and longitudinal clinical data (Rio *et al.*, 2006). The study was approved by the local ethics committee and patients gave their informed consent.

Definition of response to IFN β therapy

Clinical criteria of response to IFN β were applied after 2 years of treatment. Patients were classified as responders when there was no increase in the Expanded Disability Status Scale (EDSS) score and no relapses during the follow-up period. Patients were labelled as non-responders when they experienced one or more relapses and an increase of at least one point in the EDSS score that persisted for a minimum of two consecutive visits separated by a 6-month interval (Rio *et al.*, 2006). These stringent clinical criteria were applied in order to discriminate clearly between responders and non-responders and avoid patients having overlapping clinical responses to treatment. Patients with intermediate phenotypes of responses, i.e. presence of relapses and increase of less than one point in the EDSS score or absence of relapses with increase in the EDSS were not included in the study.

Patients

Forty-seven RRMS patients, 29 (61.7%) responders and 18 (38.3%) non-responders, were included as part of the original cohort. Thirty RRMS, 15 (50.0%) responders and 15 (50.0%) non-responders comprised the validation cohort. None of the patients had ever received treatment with IFN β or other immunosuppressive therapy before study entry. No patient had exacerbations or received treatment with corticosteroids during the month before study entry.

Sample collection and microarrays

PBMC were collected from patients before and during IFN β treatment by Ficoll-Isopaque density gradient centrifugation (Gibco BRL, Life Technologies LTD, UK) and stored in liquid nitrogen until used. Gene-expression profiling was performed with oligonucleotide microarrays at baseline in all the patients and after 3 months of treatment in 35 patients (21 responders and 14 non-responders). Total RNA was extracted from PBMC using an RNeasy kit (Quiagen, Santa Clarita, USA) and hybridized to GeneChips (Affymetrix Human Genome U133A Plus 2.0 arrays) according to the manufacturer's protocol (Affymetrix Inc, Santa Clara, CA, USA) (Supplementary Material S1).

Statistical analysis of microarray data

A schematic flow chart summarizing the main steps performed in the analysis of microarray data is represented in Fig. 1. Analysis of the expression data was carried out by using the Bioconductor packages

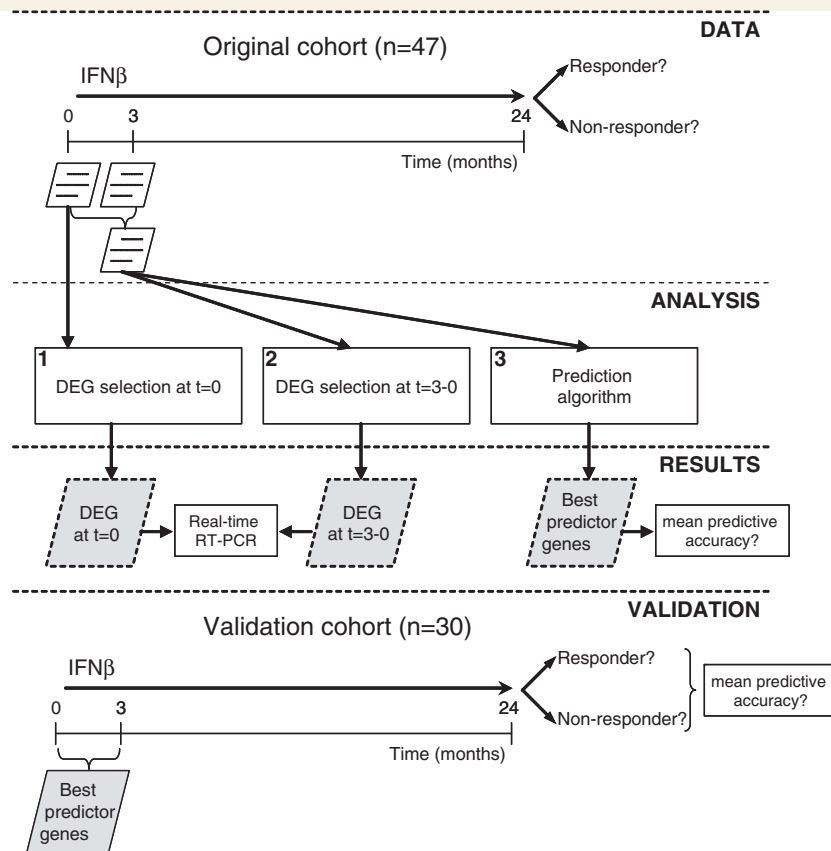


Figure 1 Flow chart summarizing the different steps undertaken in the processing of microarray data. Patients were followed for at least 24 months after initiation of IFN β treatment and then classified into responders and non-responders based on stringent clinical criteria. In the original cohort, data from patients were obtained at baseline ($t=0$) and after 3 months of treatment ($t=3$). Analysis was performed before treatment ($t=0$) comparing differentially expressed genes between responders and non-responders (1), and after 3 months of treatment comparing differences in gene-expression levels between 3 months and baseline samples ($t=3-0$) in responders and non-responders (2). Additionally, we applied a prediction algorithm to analyse whether changes in gene expression induced by IFN β in the first 3 months of treatment could predict therapeutic outcome after 24 months (3). Lists of genes that discriminate between responders and non-responders were obtained at baseline (Supplementary Table S1) and after 3 months of treatment (Supplementary Table 3), and changes in their expression were confirmed by real time RT-PCR (shown in Supplementary Tables 2 and 4, respectively). A list of the best predictive genes of response to IFN β ($n=8$; depicted in Fig. 2) was obtained and applied to the original cohort to compute mean predictive accuracy. Finally, a validation cohort also followed for at least 24 months after initiation of IFN β treatment and classified into responders and non-responders based on the same clinical criteria was used to replicate the gene-expression signature and response prediction observed in the original cohort. To do this, changes in the gene expression of the eight best predictive genes obtained in the original cohort were used to calculate mean predictive accuracy in the validation cohort. DEG: differentially expressed genes.

for the R programming environment. All chips were explored one by one and checked for quality. After that, data obtained from .CEL files were preprocessed using the RMA method (Irizarry *et al.*, 2003). These preprocessed values were the basis for all the analyses. To avoid genes with low signal and little variation in their expression among all patients, a two-step non-specific filtering was carried out: first, genes not reaching a minimum mean signal in all groups were left out of the analysis; second, from the selected genes, only those having variability (standard deviation was chosen as the comparison parameter) between all arrays greater than a certain percentile were kept for further analysis. Both thresholds were chosen after studying the behaviour of the expression data for each step of the analysis. The selection of differentially expressed genes between responders and non-responders at baseline and in the first 3 months of treatment

with IFN β was based on a linear model analysis with empirical Bayes moderation of the variance estimates. In order to deal with the multiple testing issues derived from the fact that many tests are performed simultaneously, as a linear model is generated for each gene, P -values were adjusted to obtain strong control over the false discovery rate, which is defined as the expected proportion of Type 1 or false positives among the rejected hypothesis using Benjamini and Hochberg's method (1995).

Studies on the prediction of response to treatment were performed based on changes in gene expression induced by IFN β in the first 3 months of treatment. Thus, the difference in the expression levels between 3 months and baseline was computed for each gene in responders and non-responders. A prediction algorithm was generated building and comparing several predictors in an iterated process which

was cross-validated in order to avoid well known problems such as overfitting or selection bias (Barrier *et al.*, 2005). In this way, data were partitioned randomly in 10 balanced sets and successively one of the partitions was considered as validation set whereas the other 9 parts were considered as training set. For each training set predictors were constructed and applied to the validation set. This procedure was repeated several times with an increasing subset of genes ranging from 2 to 100. In this process, we considered a maximum of 100 genes, given that our purpose was to find a small list of genes that could help to predict response to treatment. Genes to be included in the predictors were selected using an *F*-test. The following candidate predictors were evaluated: diagonal linear discriminant analysis, *k*-nearest neighbour with one, three, five and seven neighbours, support vector machine with several parameters, nearest shrunken centroids and random forest. The selection of best predictor genes was done taking the subset with the number of genes that had associated the smallest estimated misclassification error. We then calculated the definitive list by using all data and selecting again the best number of genes founded in the feature selection step. The list of best predictor genes selected from the original cohort was applied to the validation cohort to calculate mean predictive accuracy.

The identification of relevant pathways in differentially expressed genes between responders and non-responders was performed with the package 'sigPathway' implemented in R (Tian *et al.*, 2005).

Validation of microarray data with real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to validate differentially expressed genes obtained with microarrays at baseline and in the first months of treatment.

Total RNA was taken from the same samples that had been used for the microarrays. cDNA was synthesized from 150 ng of total RNA using the High Capacity cDNA Archive Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), combined with TaqMan® Universal PCR Master Mix and loaded in duplicates into Taqman® Low-density Arrays containing TaqMan® Gene Expression Assays specific for the genes selected to validate microarray data. The housekeeping gene 18S rRNA was used as an endogenous control. Taqman arrays were run on the ABI PRISM® 7900HT system (Applied Biosystems).

The threshold cycle (C_T) value for each reaction, and the relative level of gene expression for each sample were calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method (Livak and Schmittgen, 2001). Briefly, 18S rRNA was employed for the normalization of the quantity of RNA used. Its C_T value was subtracted from that of the specific genes to obtain a ΔCT value. The difference ($\Delta\Delta CT$) between the ΔCT values obtained for the responders (calibrators) and the ΔCT values for the non-responders was determined. The relative quantitative value was then expressed as $2^{-\Delta\Delta CT}$, representing the fold change in gene expression normalized to the endogenous control and relative to the calibrators.

Detection of basal and IFN β -induced STAT1 phosphorylation by flow cytometry in different PBMC populations

The methodology for the detection of STAT1 phosphorylation by flow cytometry was adapted from that described by Lesinski and

Dhodapkar (Lesinski *et al.*, 2004; Dhodapkar *et al.*, 2007). PBMC obtained at baseline were treated with and without recombinant IFN β -1a (10000 IU/ml) in serum-free conditions at 37°C for 20 min. Cells were fixed immediately and permeabilized with 90% methanol for 30 min on ice. Cells were washed and stained with a PE-coupled mouse anti-human phospho STAT1 antibody (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and an IgG1-PE isotype control antibody as well as with directly coupled monoclonal antibodies specific for CD3, CD14 and CD19 (all BD Biosciences) as per the manufacturer's protocol. Data were acquired on a BD-LSRII flow cytometer and analysed using FlowJo software (TreeStar, Ashland, OR, USA). The geometric mean fluorescence intensity of the IgG1-PE isotype control antibody was subtracted from the geometric mean fluorescence intensity of the phospho STAT1 antibody.

mRNA levels of negative regulators of type I IFN-induced signalling pathway

The mRNA levels of protein inhibitor of activated STAT1 (*PIAS1*), and suppressors of cytokine signalling 1 (*SOC51*) and 3 (*SOC53*) were determined at baseline by real time RT-PCR using TaqMan probes and 18S rRNA as endogenous control in a ABI Prism 7000 Sequence Detection system (Applied Biosystems). Relative quantification was performed using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, as described earlier.

Cell-surface quantification of activation markers and IFN receptors 1 (IFNAR1) and 2 (IFNAR2) in different cell populations

The following monoclonal antibodies were obtained from Pharmingen (San Diego, CA, USA): fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated mouse anti-human CD64, CD86, CD38, phycoerythrin (PE)-conjugated mouse anti-human CD80, HLA-ABC, CD25, CD83, CD14, allophycocyanin (APC)-conjugated mouse anti-human CD14, CD19, CD11c and allophycocyanin-Cyanine 7 (APC-Cy7)-conjugated mouse anti-human CD4. Peridinin chlorophyll protein (PerCP)-conjugated mouse anti-human CD3, HLA-DR and a cocktail of FITC-labelled anti-CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 and CD56 (lineage cocktail) were obtained from Becton Dickinson (Mountain View, CA, USA). PE-conjugated mouse anti-human CD86 was obtained from Caltag Laboratories (Burlingame, CA, USA). FITC-conjugated mouse anti-human IFNAR1 and IFNAR2 were purchased from R&D Systems (Gaithersburg, MD, USA) and PBL InterferonSource (Piscataway, NJ, USA.), respectively. FITC-conjugated mouse IgG1, IgG2a, PE-conjugated mouse IgG1, APC-conjugated mouse IgG1, APC-Cy7-conjugated mouse IgG1, were obtained from Pharmingen. PerCP-conjugated mouse IgG1 and IgG2a were purchased from Becton Dickinson.

To determine expression of activation markers at baseline, PBMC were stained with monoclonal antibodies against CD14, CD64, CD80, CD83, CD86, HLA-ABC and HLA-DR for monocytes, CD19 and CD38 for B cells, CD3, CD4 and CD25 for T cells, CD11c, HLA-DR, CD80, CD83, CD86 and lineage cocktail for dendritic cells (DC), or the corresponding isotype controls.

Cells were analysed using a dual laser FACSCanto (Becton Dickinson) flow cytometer equipped with FACSDiva software.

Lymphocytes and monocytes were gated based on forward and side light scatter properties. To analyse DC, cells were first gated based on forward and side light scatter properties. Myeloid dendritic cells were identified as lineage⁻HLADR⁺CD11c⁺ cells, whereas plasmacytoid DC were lineage⁻HLADR⁺CD11c⁻. Results are presented as percentage of positive cells and as mean fluorescence intensity.

The expression of the surface IFN receptors 1 and 2 (IFNAR1 and IFNAR2) was determined at baseline in T cells, B cells, monocytes, myeloid DC and plasmacytoid DC. Surface immunostaining and data analysis were performed as described earlier.

Toll-like receptor agonist stimulation and IFN quantification

Production of type I and II IFNs was examined at baseline in responders and non-responders after Toll-like receptor (TLR) agonist stimulation. In total, 2×10^5 PBMC per well were seeded in 96-well plates in 10% human AB-serum and stimulated with TLR3- [Poly(I:C); 25 μ g/ml], TLR4- (LPS; 1 μ g/ml), TLR7- (3M-13; 1 μ g/ml), TLR8- (3M-2; 1 μ g/ml) and TLR9- (CpG-C; 500 mM) agonists in duplicates for 48 h. Supernatants were analysed for type I (IFN α 2) and type II (IFN γ) IFN concentrations using a standard sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) according to the manufacturer's recommendations (Mabtech, Cincinnati, OH, USA).

Quantification of type I IFN bioactivity

Type I IFN bioactivity was determined in serum samples at baseline using the iLiteTM Human Interferon Alpha Kit (Neutekbio, Galway, Ireland) according to the manufacturer's recommendations. This bioassay uses a stable transfected cell line derived from a pro-monocytic human cell line (U937). These cells have been characterized as human pro-monocytic and express constitutively MHC Class II antigens on the cell surface. The assay is designed in such a way that no cell culture is needed and detects the luciferase generated bioluminescence intensity, which is proportional to the amount of type I IFN activity (IU/ml) in the sample. A standard curve with different dilutions of IFN α -2b was used for quantification of type IFN bioactivity.

Epstein Barr virus and human herpes virus 6 serologies and viral genome detection

Epstein Barr virus (EBV) and human herpes virus 6 (HHV-6) replication was evaluated at baseline in the study patients. IgG and IgM serologies for EBV were performed using standard titrated immunofluorescence methods for antibodies to viral capsid antigen. HHV-6 antibodies (IgG and IgM) were determined by a commercially available ELISA (Panbio, Brisbane, Australia).

In EBV and HHV-6 seropositive patients, detection of viral genome was performed by PCR in a SmartCycler II Real Time PCR System (Cepheid Inc., Sunnyvale, CA, USA). Briefly, DNA was isolated from 1×10^6 PBMC by means of the NucliSens[®] easyMAGTM automatic system (Biomerieux, Boxtel, The Netherlands). A quantitative PCR assay was used for quantification of EBV DNA viral genome load. The Artus[®] EBV RG PCR Kit (Qiagen, Hamburg, Germany) was utilized for specific amplification of the EBV genome following the manufacturer's recommendations. Detection of HHV-6 genome was carried out with a non-commercial qualitative PCR assay using primers and TaqMan probes as previously described (Watzinger *et al.*, 2004).

Presence of neutralizing antibodies

The presence of neutralizing antibodies to IFN β in serum samples was determined in all patients at baseline and after 12 and 24 months of treatment by means of the myxovirus A induction bioassay, as previously described (Gneiss *et al.*, 2006). Titres of ≥ 20 neutralizing units at 12 or 24 months were considered to be a positive test result.

Results

Clinical and MRI description of the responders and non-responders to IFN β included in the study

Except for EDSS scores, responders and non-responders were comparable for all clinical variables within cohorts (Table 1). The baseline EDSS was higher in non-responders, a pattern that has been reported in previous studies (Byun *et al.*, 2008). In the original cohort, non-responders showed higher inflammatory activity at baseline than responders, as reflected by the higher number of gadolinium (Gd)-enhancing lesions, although these results should be taken with caution owing to the small number of non-responders from whom MRI scans were available ($n=5$) compared with responders ($n=15$). As shown in Table 1, IFN β was associated with a reduction in the number of active lesions after 1 year of treatment; however, as previously reported (Río *et al.*, 2008), non-responders had a higher number of Gd-enhancing lesions and accumulated more new T2 lesions after 1 year of treatment.

Differentially expressed genes at baseline reveal a type I IFN gene-expression signature in non-responders

We first studied differentially expressed genes in RRMS patients before treatment with IFN β . To exclude a confounding role of neutralizing antibodies against IFN β , we measured neutralizing antibodies at baseline and following 12 and 24 months. Two patients in the non-responder group (11.1%) and one patient in the responder group (3.4%) developed neutralizing antibodies at 12 or 24 months (Fisher's Exact Test: $P=0.549$). Since expression analyses focused on the baseline and 3 months treatment time points and since the presence of neutralizing antibodies was not associated with the response to IFN β , all patients were analysed. We found 47 differentially expressed genes ($P<0.05$) at baseline between responders and non-responders (Supplementary Table 1). The vast majority of these were overexpressed in patients subsequently non-responsive to IFN β . Of note, functional annotation revealed the type I IFN-signalling pathway as the most significantly associated with the non-responder 'phenotype' (Table 2), and up to 25% of differentially expressed genes at baseline are known to be predominantly or selectively induced by type I IFNs (Der *et al.*, 1998; Leszczyniecka *et al.*, 2003; Barnes *et al.*, 2004;

Table 1 Demographic, clinical and radiological characteristics of multiple sclerosis patients' responders and non-responders to IFN β treatment

	Original cohort			Validation cohort		
	R	NR	P-values ^a	R	NR	P-values ^a
Baseline characteristics						
n (%)	29 (61.7)	18 (38.3)	–	15 (50.0)	15 (50.0)	–
Age (years)	34.1 (5.9)	35.1 (9.2)	0.463	32.7 (7.6)	35.5 (8.8)	0.412
Female/male (% female)	20/9 (69.0)	13/5 (72.2)	0.812	11/4 (73.3)	10/5 (66.7)	0.690
Duration of disease (years)	6.0 (5.9)	6.4 (4.8)	0.487	2.3 (1.5)	5.5 (4.6)	0.106
EDSS ^b	1.9 (1.3–2.8)	2.5 (1.9–3.0)	0.032	1.6 (1.0–2.0)	2.3 (1.5–3.5)	0.045
Number of relapses ^c	2.6 (1.2)	2.9 (1.7)	0.656	2.1 (0.7)	2.3 (0.9)	0.539
Number of Gd-enhancing lesions ^d	1.3 (1.4)	4.4 (3.2)	0.011	2.4 (3.8)	2.9 (3.6)	0.595
Type of IFN β [n (%)]						
IFN β 1a IM	10 (34.5)	6 (33.3)		3 (20.0)	6 (40.0)	
IFN β 1b SC	10 (34.5)	6 (33.3)	0.987	5 (33.3)	4 (26.7)	0.486
IFN β 1a SC	9 (31.0)	6 (33.3)		7 (46.7)	5 (33.3)	
MRI characteristics at 1-year ^d						
Number of Gd-enhancing lesions	0.07 (0.3)	1.0 (1.2)	0.087	0.0 (0.0)	0.6 (1.8)	0.740
Number of new T2 lesions	1.5 (1.8)	3.6 (1.1)	0.019	1.4 (2.8)	6.0 (8.0)	0.078
Combined cohorts						
	R			NR		P-values^e
Number of Gd-enhancing lesions	0.04 (0.2)			0.7 (1.6)		0.038
Number of new T2 lesions	1.4 (2.3)			5.2 (6.6)		0.043

Data are expressed as mean (standard deviation) unless otherwise stated.

a Refers to *P*-values obtained following comparisons between responders and non-responders within each cohort by means of Student's *t*-test or Mann–Whitney's test depending on the applicability conditions (age, duration, EDSS and number of relapses) and chi-square test (gender and type of IFN β).

b Data are expressed as mean (interquartile range).

c Refers to the number of relapses in the two previous years.

d MRI data were available for a subgroup of 46 patients, 20 patients from the original cohort (15 responders and 9 non-responders) and 26 patients from the validation cohort (14 responders and 12 non-responders). IM: intramuscular. SC: subcutaneous. R: responders to IFN β . NR: non-responders to IFN β .

e Refers to *P*-values obtained following comparisons between responders and non-responders from the combined cohorts.

Table 2 Relevant pathways associated with the response to IFN β obtained with 'sigPathway'

Gene Set Category	Pathway	Set size	Ntk Stat	Ntk q-value	Ntk Rank	NEK* Stat	NEK* q-value	NEK* rank
humanpaths	IFN α,β response	37	−7.64	<0.0001	1.0	−2.89	0.0109	1.0
humanpaths	Nitric oxide	21	−6.45	<0.0001	2.0	−2.17	0.0815	2.0
KEGG	Toll-like_receptor_signaling_pathway	21	−5.02	<0.0001	3.0	−1.80	0.0783	5.0
humanpaths	Stress/Toxicity PathwayFinder	21	−4.33	<0.0001	6.0	−1.96	0.0906	3.0
humanpaths	Dendritic/Antigen Presenting Cell	37	−4.86	<0.0001	4.0	−1.60	0.0747	7.5
GO:0006954	inflammatory response	27	−4.25	<0.0001	7.0	−1.67	0.0851	6.0
humanpaths	Glucocorticoid Signaling I	20	−3.09	0.0028	11.5	−1.84	0.0897	4.0
GO:0005125	cytokine activity	22	−4.68	<0.0001	5.0	−1.39	0.0743	12.0
humanpaths	Toll-Like Receptor Signaling Pathway	20	−4.16	<0.0001	8.0	−1.47	0.0772	9.5
humanpaths	cAMP/Ca ²⁺ Signaling PathwayFinder	26	−3.09	0.0028	11.5	−1.60	0.0747	7.5
humanpaths	Cardiovascular Disease	20	−3.69	<0.0001	10.0	−1.47	0.0772	9.5
humanpaths	G-Protein Coupled Receptors Signaling PathwayFinder	22	−4.04	<0.0001	9.0	−1.28	0.0844	13.0
humanpaths	Signal Transduction in Cancer	22	−2.88	0.0052	13.0	−1.42	0.0771	11.0
humanpaths	JAK/STAT Signalling Pathway	20	−2.14	0.0389	14.0	−0.90	0.1429	14.0

Statistically significant pathways are found through a statistical hypothesis testing framework proposed by Tian *et al.* (2005) for determining whether a specified group of genes for a pathway has a coordinated association with a phenotype of interest. The two null hypotheses are the following: the genes in a gene set show the same pattern of associations with the phenotype compared with the rest of the genes (Q_1). The gene set does not contain any genes whose expression levels are associated with the phenotype of interest (Q_2). Then, two statistics are developed, one for each hypothesis, and to get statistical significance each statistic is compared against the distribution under the null hypothesis. Set Size is the number of genes in the original list contained in the corresponding pathway. Ntk Stat is the value of the statistic corresponding to hypothesis Q_1 . Ntk *q*-value is the adjusted *P*-value corresponding to hypothesis Q_1 . Ntk Rank is the rank corresponding to hypothesis Q_1 . NEK* Stat is the value of the statistic corresponding to hypothesis Q_2 . NEK* *q*-value is the adjusted *P*-value corresponding to hypothesis Q_2 . NEK* Rank is the rank corresponding to hypothesis Q_2 . The global ranking is obtained by adding up rank corresponding to hypotheses Q_1 and Q_2 .

Kirou *et al.*, 2004; Helbig *et al.*, 2005). The majority of the differentially expressed genes were confirmed by PCR with values ranging from 1.6- to 5-fold overexpression in non-responders (Supplementary Table 2). These results point to pre-existing differences between responders and non-responders in the type I IFN pathway.

An activated type I IFN-signalling pathway is associated with lack of response to IFN β

We next analysed changes in gene expression during the first 3 months of treatment. Supplementary Table 3 lists the 43 differentially expressed genes. Interestingly, the highest differences were obtained for genes predominantly or selectively induced by type I IFNs, and data were again confirmed by PCR in a subgroup of genes. For the majority of them, a strong and significant induction was observed in treatment responders as reflected by fold changes from 3 to over 120 (Supplementary Table 4). Conversely, in non-responders, changes in gene expression induced by IFN β were much lower or absent and did not reach statistical significance for any gene. These findings indicate that non-responders have an activated type I IFN system in peripheral blood cells that is refractory to exogenous IFN β .

Type I IFN-induced genes are among the best treatment response predictors

One objective of our study was to predict the response status to IFN β after 24 months prior to or within the first 3 months of treatment. A prediction algorithm was applied comparing several predictors as described in the Methods. Figure 2A lists the eight best discriminating genes between responders and non-responders. Interestingly, five of the eight best predictor genes (*IFIT1-3*, *IFI44* and *OASL*) are selectively induced by type I IFNs. The remaining genes are: *RASGEF1B*, which encodes a small GTP-binding protein of the Ras superfamily; *MARCKS*, which codes for a protein which is a substrate for the protein kinase C and is highly expressed by macrophages; *FADS1*, which encodes a desaturase enzyme that regulates unsaturation of fatty acids.

A mean predictive accuracy of 78% was obtained with these eight genes (Fig. 2B) indicating that the clinical response to IFN β can indeed be predicted early.

Replication of the type I IFN signature in a validation cohort

Analysis of microarray data in a validation cohort of 30 new RRMS patients revealed 99 differentially expressed genes ($P < 0.05$) between responders and non-responders at baseline. Similar to our findings in the original cohort, many of the differentially expressed genes obtained in the validation cohort are induced by type I IFN. As shown in Supplementary Table 5, 25% of the original type I IFN signature was also observed in the validation cohort. Of note, up to 21% of differentially expressed genes at baseline in the validation cohort are known to be predominantly or

selectively induced by type I IFNs (Supplementary Table 5), and the type I IFN-signalling pathway was again ranked in first position (NTK q -value < 0.0001). Finally, the mean predictive accuracy obtained in the smaller validation cohort with the best predictor genes ($n = 8$) was 63%, and thus comparable to the first cohort (Fig. 2C).

IFN β non-responders show increased STAT1 phosphorylation and IFNAR1 expression in monocytes

Next we analysed which molecules of the type I IFN response pathway are involved in IFN-non-responsiveness. First, we examined phosphorylated STAT1 (p-STAT1) protein as a marker for the type I IFN response at the single-cell level. IFN β stimulation of PBMC led to a substantial increase of p-STAT1 levels (Fig. 3A), and monocytes showed the highest IFN β -induced p-STAT1 levels. There were no differences in IFN β -induced p-STAT1 levels between groups indicating that the type I IFN receptor-signalling machinery is not impaired in non-responders (Fig. 3B, lower panels). However, p-STAT1 baseline levels were significantly higher in monocytes derived from non-responders compared with responders (Fig. 3B, upper panels), while no differences were observed in T and B cells. These results indicate that the type I IFN pathway in monocytes is fully activated prior to therapy with IFN β in non-responders and cannot be activated further. Consistent with this notion, we found significantly elevated surface expression of IFNAR1 on monocytes of non-responders (Fig. 3C). In contrast, IFNAR2 was not elevated on monocytes, and neither IFNAR1 nor IFNAR2 expression were altered on other cell populations (Supplementary Fig. 1).

In further functional studies, we examined whether overexpression of type I IFN-responsive genes in non-responders is due to lower expression of negative type I IFN regulators or occurs in the context of global activation of monocytes alone or together with other immune cells. Baseline expression levels of cytokine regulators *SOCS1*, *SOCS3* and *PIAS1* were similar between responders and non-responders (Supplementary Table 6) and no differences of activation marker expression were observed between groups for monocytes or other PBMC populations (Supplementary Table 7).

Innate immune stimulation elicits higher type I IFN responses in IFN β non-responders

Many of the genes that are transcribed at higher levels at baseline in non-responders (*IL1B*, *TNF*, *STAT1*, *CXCL10*, *PTX3*, *CCR1*) suggest increased activation of the innate immune system. Supporting this idea, cellular pathways related with the innate immune system, such as the TLR or the dendritic/antigen presenting cell-signalling pathways were overexpressed in IFN β non-responders (Table 2). To test whether the activated IFN pathway in IFN β non-responders was associated with increased innate immune activation via TLR agonists, we stimulated PBMC with

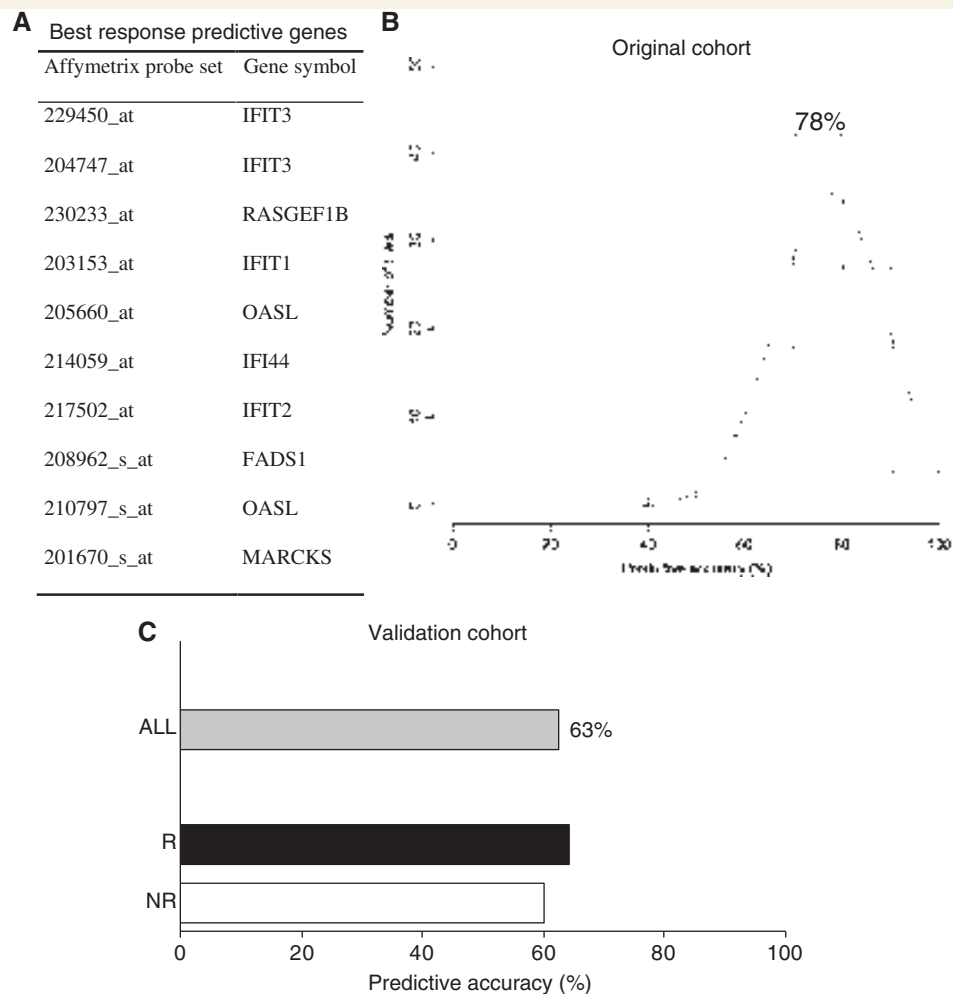


Figure 2 A set of predominantly type I IFN-induced genes are among the best predictors of response to IFN β in the first 3 months of treatment. (A) List of genes discriminating best between responders and non-responders. A total of 6410 genes from the initial list of 54 675 passed the non-specific filtering in their expression between baseline and 3 months. After applying a prediction algorithm to this set of genes, the k -nearest neighbour with one neighbour and with eight genes (10 probe sets) were selected as the method and number of genes that had associated the lowest misclassification error ($\epsilon = 0.3083$). This misclassification error was computed as the mean of 10 cross-validation steps in which nine-tenth of data were used as training data, i.e. to build a predictor, and the left out samples used as validation data, that is, to compute the misclassification error. (B) Histogram showing predictive accuracy of the best predictive genes after random partitions in the original cohort. To compute the histogram, an iterative method of 100 random divisions was applied to the original sample and filtered genes. Each random division selected a balanced set of three-fourth parts of the patients to build a predictor using the k -nearest neighbour method with one neighbour and eight genes (10 probe sets). This predictor was applied to the remaining one-fourth part of patients to compute mean predictive accuracy over the 100 trials. The mean predictive accuracy of all random divisions was 78%, which we used to generate a normal approximation to predictive data, plotted in the figure as a dotted curve. (C) Graph showing mean predictive accuracy in a totally independent validation cohort of 15 responders and 15 non-responders to treatment. The mean predictive accuracy obtained for the whole group was 63%, being similar in responders and non-responders.

classical TLR agonists and analysed the supernatants for IFN α and IFN γ levels. All TLR ligands elicited a robust IFN response (Fig. 4A). Interestingly, non-responders showed significantly higher levels of IFN α only following TLR4 stimulation via LPS, and this effect was most likely mediated by the monocyte lineage since TLR4 expression by plasmacytoid DC, one of the major cell sources of IFN α , is low or absent (Kadowaki et al., 2001).

Increased endogenous production of type I IFNs in non-responders to IFN β

Based on the higher p-STAT1- and IFNAR1-expression levels in non-responders, we next addressed whether type I IFNs, which engage IFNAR1/R2 and induce the downstream events are elevated. Type I IFN bioactivity in serum was indeed significantly higher in IFN β non-responders (Fig. 4B). While we do not know

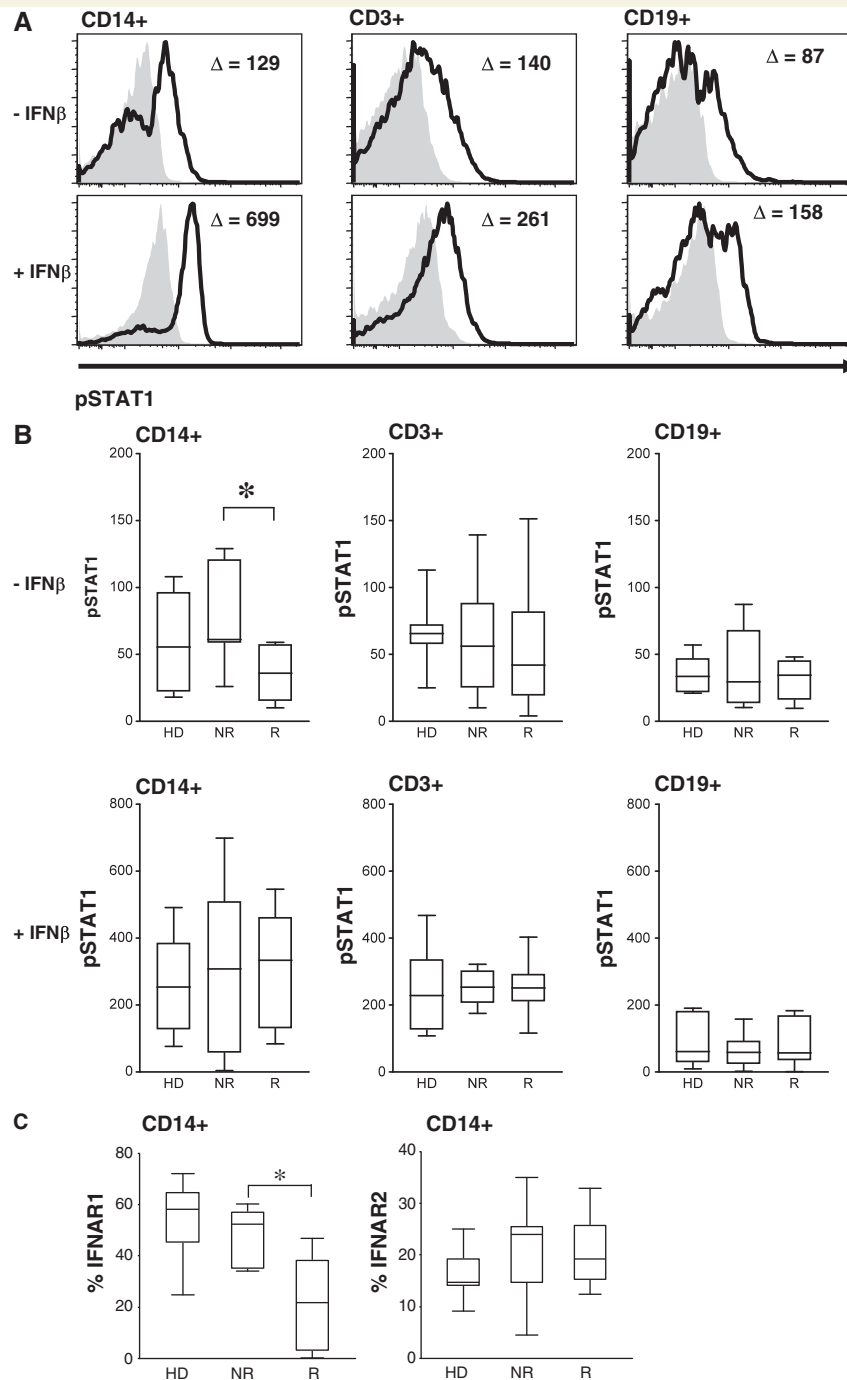


Figure 3 Selective increase of baseline STAT1 phosphorylation and IFNAR1 expression in CD14+ monocytes derived from IFN β non-responders. **(A)** Baseline and IFN β -induced levels of p-STAT1 protein were quantified by intracellular flow cytometry in CD14+ monocytes, CD3+ T cells and CD19+ B cells. IFN β -1a stimulation led to a substantial increase of p-STAT1 levels in CD14+ monocytes, CD3+ T cell and CD19+ B cells. Monocytes showed the highest IFN β induced p-STAT1 levels. **(B)** p-STAT1 baseline levels are significantly higher in monocytes derived from non-responders compared with responders (* $P=0.01$, Mann–Whitney U-test). HD: healthy donors ($n=10$). NR: non-responders ($n=10$). R: responders ($n=10$). **(C)** Boxplots showing mean percentage of positive cells expressing IFNAR1 and IFNAR2 in non-responders (NR, $n=11$), responders (R, $n=11$) and healthy donors (HD, $n=9$). Baseline IFNAR1 expression by monocytes from non-responders is significantly higher compared with responders (* $P=0.008$, Mann–Whitney U-test) and similar to healthy donors.

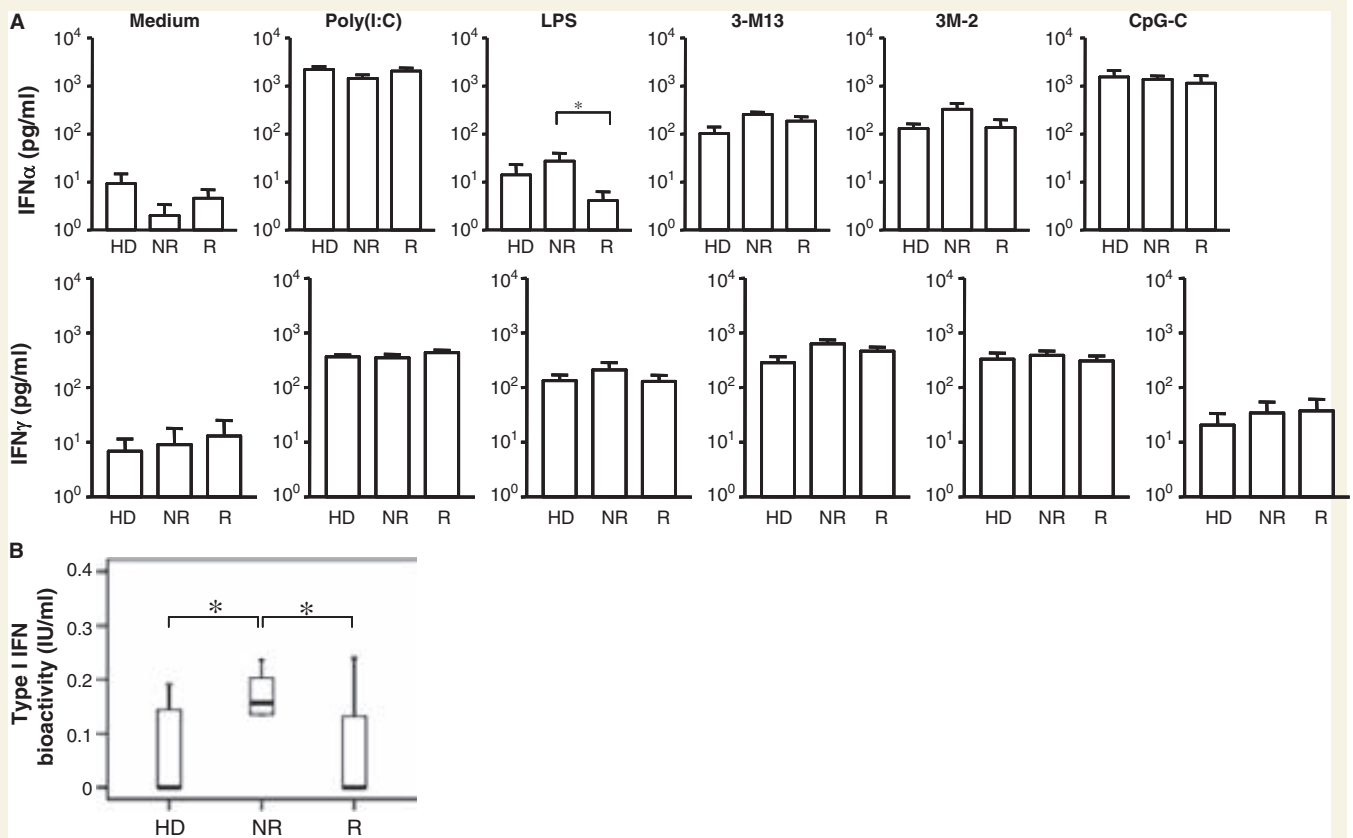


Figure 4 Type I IFN secretion upon innate immune stimulation and serum type I IFN bioactivity are increased in IFN β non-responders. (A) Type I (IFN α 2) and type II (IFN γ) IFN production in PBMC following TLR stimulation. PBMC were stimulated with TLR3- [Poly(I:C); 25 mg/ml], TLR4- (LPS; 1 mg/ml), TLR7- (3M-13; 1 mg/ml), TLR8- (3M-2; 1 mg/ml) and TLR9- (CpG-C; 500 mM) agonists in duplicates for 48 h. Cytokine levels in supernatants were quantified by ELISA. Results are expressed as mean values (SEM). IFN α 2 production following LPS stimulation is substantially higher in non-responders compared with responders ($*P=0.03$, Mann–Whitney U-test). There were no statistically significant differences in cytokine responses to other TLR agonists between healthy donors and multiple sclerosis patients and between IFN β responders and non-responders. (B) Quantification of type I IFN bioactivity. A pro-monocytic cell line was transferred to a 96-well plate and then 25 μ l of serum samples from multiple sclerosis patients and healthy donors were placed in individual wells and tested in duplicate for type I IFN bioactivity. Plates were read in a luminometer after incubation at 37°C for 17 h and type I IFN bioactivity quantified by extrapolation from a standard curve generated with IFN α -2b (range 1.5–25 IU/ml). Type I IFN bioactivity in non-responders is significantly higher compared with responders and healthy donors ($*P=0.04$ for both groups, Mann–Whitney U-test). HD: healthy donors ($n=10$). NR: non-responders ($n=10$). R: responders ($n=10$).

the natural stimuli leading to increased production of type I IFNs in non-responders, we excluded EBV or HHV-6, two viruses that are being discussed as aetiological factors in multiple sclerosis, as likely candidates. Neither responders nor non-responders showed detectable viral DNA levels in PBMC or IgM seropositivity at baseline, and IgG positivity for both viruses was similar (Supplementary Table 8). These results render it unlikely that differences in EBV or HHV-6 reactivation account for the differences of the type I IFN-signalling pathway in both groups.

Increased activation of myeloid dendritic cells in IFN β non-responders

As part of their proinflammatory effects type I IFNs induce the activation and maturation of dendritic cells (DC), the most potent antigen-presenting cells. We therefore assessed the state of

activation and maturation of myeloid and plasmacytoid DC. As shown in Fig. 5, myeloid dendritic cells from non-responders showed a significant increase in CD86 expression, whereas CD80 and CD83 and HLA-DR were expressed at similar levels (Supplementary Fig. 2).

Discussion

The present study aimed at identifying biomarkers that are associated with or even predictive of the response to IFN β treatment in RRMS patients. IFN β responders and non-responders were characterized by stringent criteria previously applied by our group (Río *et al.*, 2006). Interestingly, IFN β non-responders express a substantial fraction of type I IFN-regulated genes at elevated levels prior to IFN β treatment. In contrast, the expression of type I IFN-regulated genes is low at baseline in responders,

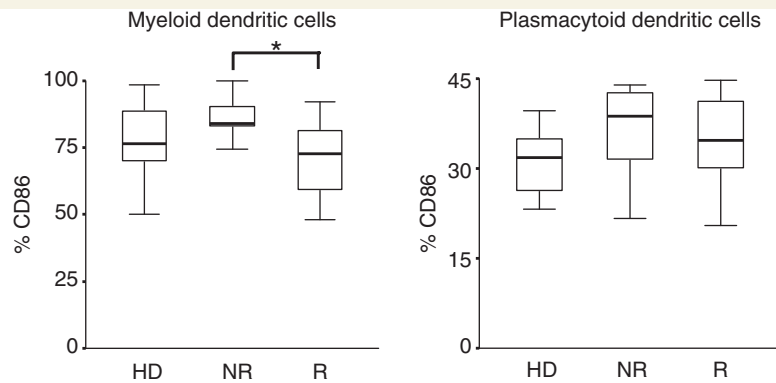


Figure 5 In treatment non-responders myeloid dendritic cells are more activated. Boxplots showing baseline expression of CD86 in myeloid and plasmacytoid dendritic cells. PBMC from responders and non-responders to IFN β were stained with monoclonal antibodies against CD11c, HLA-DR, CD86 and lineage cocktail. Myeloid dendritic cells were identified as lineage⁻HLADR⁺CD11c⁺ cells, whereas plasmacytoid dendritic cells were lineage⁻HLADR⁺CD11c⁻. Results are expressed as mean percentage of positive cells for each marker. CD86 expression is increased in myeloid dendritic cells from non-responders compared with responders (* $P=0.006$, Student's t -test). HD: healthy donors ($n=9$). NR: non-responders ($n=10$). R: responders ($n=10$).

but is inducible during treatment. In addition, genes that are selectively induced by type I IFNs were the best predictors of the therapeutic outcome after 24 months of treatment. This type I IFN gene-expression signature was validated in an independent cohort. When dissecting the type I IFN signature further, IFN β non-responders are characterized by elevated expression of IFNAR1 and increased type I IFN secretion of monocytes upon TLR4 stimuli, and by increased serum type I IFN bioactivity and elevated activation status of myeloid DC.

A type I gene expression IFN signature has been reported in several autoimmune disorders such as rheumatoid arthritis (van der Pouw Kraan *et al.*, 2007), systemic lupus erythematosus (Han *et al.*, 2003), dermatomyositis (Baechler *et al.*, 2007), systemic sclerosis (Tan *et al.*, 2006) and Sjögren's syndrome (Gottenberg *et al.*, 2006). In multiple sclerosis, a recent study also observed the presence of a selective upregulation of the type I IFN-signalling pathway in a subgroup of RRMS patients (van Baarsen *et al.*, 2006), and suggested that common aetiological factors and pathogenetic pathways operate in these autoimmune disorders. Here, we describe a constitutively activated type I IFN system in non-responders to IFN β treatment. These data may indicate the uncoupling of regulatory mechanisms via the recently reported family of TAM receptor tyrosine kinases (Rothlin *et al.*, 2007), which employ IFNAR1 and pSTAT1 to downregulate innate immune activation upon prior TLR signals, IFNAR1 engagement and STAT1 phosphorylation. Alternatively, they could indicate that the desensitization to further IFN α stimulation, which is mediated by IFN β engagement (Severa *et al.*, 2006, 2007), is not functional in non-responders. The lack of changes in gene expression upon exogenous IFN β supports the latter hypothesis. Of note, the type I IFN pathway is selectively perturbed in the monocyte lineage in non-responders, as the increase in p-STAT1 levels and IFNAR1 expression was observed only in this cell population. Furthermore, the increased production of IFN α upon TLR4 stimulation was most likely mediated by monocytes. The fact that LPS

stimulation of monocytoic DC primarily induces IFN β and IFN λ , but not IFN α expression (Coccia *et al.*, 2004) further argues for an uncoupling of the abovementioned desensitization to IFN α by secretion of IFN β .

Monocytes are abundant in inflammatory multiple sclerosis brain lesions, and infiltrating myeloid DC as well as microglia are thought to drive brain inflammation (Heppner *et al.*, 2005; Karni *et al.*, 2006; Bailey *et al.*, 2007). We excluded a deficient expression of negative regulators of the type I IFN pathway or reactivation of latent viral infections by EBV and HHV-6 as causes of the overexpression of type I IFN-responsive genes in monocytes of IFN β non-responders. Furthermore, we did not find a broad activation of monocytes or other PBMC populations. Instead, our results indicate increased signalling via IFNAR upon increased endogenous type I IFNs, as shown by elevated type I IFN bioactivity and increased production of IFN α after TLR4 stimulation.

Based on the above findings it appears that the IFN β non-responders represent a pathogenetically different phenotype of multiple sclerosis with clinically more severe course, altered monocyte function and an activated innate immune system. In these patients the administration of exogenous IFN β failed to induce the expression of a number of type I IFN-regulated genes. At present, we cannot distinguish whether the presence of relapses and progression of disability in non-responders during the 2 years of treatment is due to lack of response to IFN β , more active disease, pathogenetically distinct disease processes, or a combination of factors. We have identified a subgroup of patients who have a constitutively activated and less inducible type I IFN pathway, and these patients fail to respond to IFN β treatment. Furthermore, for yet unknown reasons, the type I IFN pathway is dysregulated in monocytes, which may contribute to more active disease. The biological relevance of this observation is underscored by a recent study that documents that conditional genetic knockout of IFNAR1 in monocytes, but not in T cells,

B cells or CNS cells, leads to enhanced disease severity in the animal model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis (Prinz *et al.*, 2008). It should be taken into account that, in the context of a type I IFN signature, type I IFNs may not be beneficial for multiple sclerosis, as they are known to activate DC (Radvanyi *et al.*, 1999), enhance humoral immunity (Le Bon *et al.*, 2001), and favour Th1 immune responses (Brinkmann *et al.*, 1993). We show that at baseline in non-responders myeloid DC are more activated. In this context, the deleterious effect of type I IFNs is further supported by the recent finding of a strong upregulation of *BAFF* (B cell activating factor of the TNF family) induced by IFN β in multiple sclerosis patients, thus providing a link between type I IFNs and enhanced humoral responses (Krumbholz *et al.*, 2008).

In summary, two conclusions can be drawn from our observations. We believe that IFN β non-responsiveness can be predicted early by the differential expression of a small number of type I IFN-inducible genes. Furthermore, it appears counterintuitive to administer IFN β , a type I IFN, to patients with overexpression of type I IFN-responsive genes under basal conditions and relative unresponsiveness of the type I IFN pathway to the effects of IFN β . Our data raise the important question whether neutralization of type I IFNs would be more appropriate in IFN β non-responder multiple sclerosis patients as has been proposed for other autoimmune disorders characterized by a type I IFN signature (Stewart, 2003). Both points should be explored soon with respect to usefulness for clinical management and individualizing first-line therapies in multiple sclerosis. With respect to a historical perspective of multiple sclerosis therapy, IFN β was the first anti-inflammatory therapy for multiple sclerosis that was approved over a decade ago. Over this long period, clinical experience with individual patients suggest that its modest efficacy is in part due to pathogenetic differences between patients that result in non-responsiveness in some and good clinical response in others. Our data indicate that the continuing exploration of the differential treatment responses to such an 'old' drug merits further studies and may eventually be useful for treatment individualization. Independent of IFN β the latter aspect will rapidly gain importance with a growing number of effective drugs that are currently in late stages of clinical development.

Acknowledgements

The authors thank the 'Red Temática de Investigación Cooperativa (C03/06)', the 'Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (SGR 2005-1081)' and the NABINMS (Neutralising Antibodies in multiple sclerosis) funded by the EEC. R. Martin was a member of the Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (ICREA). The Institute for Neuroimmunology and Clinical multiple sclerosis Research is supported by the Gemeinnützige Hertie Stiftung.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

- Baechler EC, Bauer JW, Slattery CA, Ortmann WA, Espe KJ, Novitzke J, et al. An interferon signature in the peripheral blood of dermatomyositis patients is associated with disease activity. *Mol Med* 2007; 13: 59–68.
- Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol* 2007; 8: 172–80.
- Baranzini SE, Mousavi P, Rio J, Caillier SJ, Stillman A, Villoslada P, et al. Transcription-based prediction of response to IFN β using supervised computational methods. *PLoS Biol* 2005; 3: e2.
- Barnes BJ, Richards J, Mancl M, Hanash S, Beretta L, Pitha PM. Global and distinct targets of IRF-5 and IRF-7 during innate response to viral infection. *J Biol Chem* 2004; 279: 45194–207.
- Barrier A, Lemoine A, Boelle PY, Tse C, Brault D, Chiappini F, et al. Colon cancer prognosis prediction by gene expression profiling. *Oncogene* 2005; 24: 6155–64.
- Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J Roy Stat Soc B* 1995; 57: 289–300.
- Brinkmann V, Geiger T, Alkan S, Heusser CH. Interferon alpha increases the frequency of interferon gamma-producing human CD4+ T cells. *J Exp Med* 1993; 178: 1655–63.
- Byun E, Caillier SJ, Montalban X, Villoslada P, Fernández O, Brassat D, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2008; 65: 337–44.
- Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, et al. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004; 34: 796–805.
- Der SD, Zhou A, Williams BRG, Silverman RH. Identification of genes differentially regulated by interferon α , β , or γ using oligonucleotide arrays. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 15623–8.
- Dhodapkar KM, Banerjee D, Connolly J, Kukreja A, Matayeva E, Veri MC, et al. Selective blockade of the inhibitory Fc γ receptor (Fc γ R1B) in human dendritic cells and monocytes induces a type I interferon response program. *J Exp Med* 2007; 204: 1359–69.
- Gneiss C, Tripp P, Reichartseder F, Egg R, Ehling R, Lutterotti A, et al. Differing immunogenic potentials of interferon beta preparations in multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2006; 12: 731–7.
- Gottenberg JE, Cagnard N, Lucchesi C, Letourneur F, Mistou S, Lazure T, et al. Activation of IFN pathways and plasmacytoid dendritic cell recruitment in target organs of primary Sjögren's syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 2770–5.
- Han GM, Chen SL, Shen N, Ye S, Bao CD, Gu YY. Analysis of gene expression profiles in human systemic lupus erythematosus using oligonucleotide microarray. *Genes Immun* 2003; 4: 177–86.
- Helbig KJ, Lau DT, Semendric L, Harley HA, Beard MR. Analysis of ISG expression in chronic hepatitis C identifies viperin as a potential antiviral effector. *Hepatology* 2005; 42: 702–10.
- Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hövelmeyer N, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med* 2005; 11: 146–52.
- Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics* 2003; 4: 249–64.
- Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Ann Neurol* 1996; 39: 285–94.
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different

- toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001; 194: 863–9.
- Karni A, Abraham M, Monsonog A, Cai G, Freeman GJ, Hafler D, et al. Innate immunity in multiple sclerosis: myeloid dendritic cells in secondary progressive multiple sclerosis are activated and drive a proinflammatory immune response. *J Immunol* 2006; 177: 4196–5202.
- Kirou KA, Lee C, George S, Louca K, Papagiannis IG, Peterson MG, et al. Coordinate overexpression of interferon-alpha-induced genes in systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 3958–67.
- Krumbholz M, Faber H, Steinmeyer F, Hoffmann LA, Kämpfel T, Pellkofer H, et al. Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity. *Brain* 2008; 131: 1455–63.
- Le Bon A, Schiavoni G, D'Agostino G, Gresser I, Belardelli F, Tough DF. Type I interferons potently enhance humoral immunity and can promote isotype switching by stimulating dendritic cells in vivo. *Immunity* 2001; 14: 461–70.
- Lesinski GB, Kondadasula SV, Crespin T, Shen L, Kendra K, Walker M, et al. Multiparametric flow cytometric analysis of inter-patient variation in STAT1 phosphorylation following interferon Alfa immunotherapy. *J Natl Cancer Inst* 2004; 96: 1331–42.
- Leszczyniecka M, Su ZZ, Kang DC, Sarkar D, Fisher PB. Expression regulation and genomic organization of human polynucleotide phosphorylase, hPNPase(old-35), a Type I interferon inducible early response gene. *Gene* 2003; 316: 143–56.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 2001; 25: 402–8.
- Minagar A, Adamashvili I, Kelley RE, Gonzalez-Toledo E, McLarty J, Smith SJ. Saliva soluble HLA as a potential marker of response to interferon-beta1a in multiple sclerosis: a preliminary study. *J Neuroinflammation* 2007; 4: 16.
- Prinz M, Schmidt H, Mildner A, Knobloch KP, Hanisch UK, Raasch J, et al. Distinct and nonredundant in vivo functions of ifnar on myeloid cells limit autoimmunity in the central nervous system. *Immunity* 2008; 28: 675–86.
- PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. *Lancet* 1998; 352: 1498–504.
- Radvanyi LG, Banerjee A, Weir M, Messner H. Low levels of interferon-alpha induce CD86 (B7.2) expression and accelerates dendritic cell maturation from human peripheral blood mononuclear cells. *Scand J Immunol* 1999; 50: 499–509.
- Rio J, Nos C, Tintoré M, Borrás C, Galán I, Comabella M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol* 2002; 52: 400–6.
- Rio J, Nos C, Tintoré M, Tellez N, Galán I, Pelayo R, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 2006; 59: 344–52.
- Rio J, Rovira A, Tintoré M, Hueriga E, Nos C, Tellez N, et al. Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Mult Scler* 2008; 14: 479–84.
- Rothlin CV, Ghosh S, Zuniga EI, Oldstone MB, Lemke G. TAM receptors are pleiotropic inhibitors of the innate immune response. *Cell* 2007; 131: 1124–36.
- Severa M, Remoli ME, Giacomini E, Ragimbeau J, Lande R, Uzé G, et al. Differential responsiveness to IFN-alpha and IFN-beta of human mature DC through modulation of IFNAR expression. *J Leukoc Biol* 2006; 79: 1286–94.
- Severa M, Remoli ME, Giacomini E, Annibaldi V, Gafa V, Lande R, et al. Sensitization to TLR7 agonist in IFN-beta-preactivated dendritic cells. *J Immunol* 2007; 178: 6208–16.
- Soilu-Hanninen M, Laaksonen M, Hanninen A, Eralinna JP, Panelius M. Downregulation of VLA-4 on T cells as a marker of long term treatment response to interferon beta-1a in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 2005; 167: 175–82.
- Stewart TA. Neutralizing interferon alpha as a therapeutic approach to autoimmune diseases. *Cytokine Growth Factor Rev* 2003; 14: 139–54.
- Tan FK, Zhou X, Mayes MD, Gourh P, Guo X, Marcum C, et al. Signatures of differentially regulated interferon gene expression and vasculotrophism in the peripheral blood cells of systemic sclerosis patients. *Rheumatology* 2006; 45: 694–702.
- The Interferon β Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology* 1993; 43: 655–61.
- Tian L, Greenberg SA, Kong SW, Altschuler J, Kohane IS, Park PJ. Discovering statistically significant pathways in expression profiling studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102: 13544–9.
- van Baarsen LG, van der Pouw Kraan TC, Kragt JJ, Baggen JM, Rustenburg F, Hooper T, et al. A subtype of multiple sclerosis defined by an activated immune defense program. *Genes Immun* 2006; 7: 522–31.
- van der Pouw Kraan TC, Wijbrandts CA, van Baarsen LG, Voskuyl AE, Rustenburg F, Baggen JM, et al. Rheumatoid arthritis subtypes identified by genomic profiling of peripheral blood cells: assignment of a type I interferon signature in a subpopulation of patients. *Ann Rheum Dis* 2007; 66: 1008–14.
- Watzinger F, Suda M, Preuner S, Baumgartinger R, Ebner K, Baskova L, et al. Real-time quantitative PCR assays for detection and monitoring of pathogenic human viruses in immunosuppressed pediatric patients. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 5189–98.

Genome-wide Scan of 500 000 Single-Nucleotide Polymorphisms Among Responders and Nonresponders to Interferon Beta Therapy in Multiple Sclerosis

Manuel Comabella, MD; David W. Craig, BSc; Carlos Morcillo-Suárez, BSc; Jordi Río, MD; Arcadi Navarro, PhD; Marta Fernández, BSc; Roland Martin, MD; Xavier Montalban, MD, PhD

Background: Interferon beta is 1 of 2 first-line treatments for relapsing-remitting multiple sclerosis (MS). However, not all patients respond to interferon beta therapy, and to date there is a lack of surrogate markers that reliably correlate with responsiveness to interferon beta therapy in MS.

Objective: To identify allelic variants that influence response to interferon beta therapy in patients with MS.

Design: Genome-wide scan.

Setting: Academic research.

Patients: Two hundred patients having relapsing-remitting MS treated with interferon beta and having a follow-up period of at least 2 years were classified as responders or nonresponders to treatment based on stringent clinical criteria.

Main Outcome Measures: In the first phase of the study, a pooling-based genome-wide association study of 428 867 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) was

performed in 53 responders and 53 nonresponders to interferon beta therapy. After applying several selection criteria, 383 SNPs were individually genotyped in an independent validation cohort of 49 responders and 45 nonresponders to interferon beta therapy using a different genotyping platform.

Results: Eighteen SNPs had uncorrected $P < .05$ associated with interferon beta responder status in the validation cohort. Of these, 7 SNPs were located in genes that code for alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid–type glutamate receptor GRIA3, type 1 interferon–related proteins ADAR and IFNAR2, cell cycle–dependent protein CIT, zinc finger proteins ZFAT and ZFH4, and guanosine triphosphatase–activating protein STARD13.

Conclusions: This study supports an underlying polygenic response to interferon beta treatment in MS and highlights the importance of the glutamatergic system in patient response to interferon beta therapy.

Arch Neurol. 2009;66(8):972-978

Author Affiliations are listed at the end of this article.

RECOMBINANT HUMAN INTERFERON beta therapy is a mainstay of multiple sclerosis (MS) treatment and has demonstrated a beneficial effect on disease activity, as measured by clinical and magnetic resonance imaging variables.¹⁻³ However, interferon beta therapy is only partially effective, and 20% to 55% of treated patients will show a lack of response to treatment.⁴ Unfortunately, clinical and radiologic criteria to classify patients as interferon beta therapy responders or nonresponders are usually applied late, after 1 or 2 years of follow-up. To improve the efficacy of treatments for MS, it is desirable to find biomarkers that allow early identification of treat-

ment responders or ideally that predict responder status.

Several pharmacogenetic studies⁵⁻¹¹ aimed to identify allelic variants that influence response to interferon beta therapy in MS. In these studies, interferon beta–regulated genes or HLA class II alleles were proposed as potential biomarkers for treatment response. Unfortunately, results from these studies revealed no association or weak and unreplicated associations of candidate genes with response to interferon beta therapy. To date, only one genome-wide pharmacogenetic study¹² has been published in the field of MS. The study identified candidates with response to interferon beta treatment and found an overrepresentation of genes related to ion chan-

Table 1. Demographic and Clinical Characteristics of Responders and Nonresponders to Interferon Beta Therapy

Characteristics	Original Cohort ^a			Validation Cohort ^b			P Value ^d
	Responders (n=53)	Nonresponders (n=53)	P Value ^c	Responders (n=49)	Nonresponders (n=45)	P Value ^c	
Age, y	33.5 (8.5)	35.5 (8.5)	.23	34.5 (8.0)	35.0 (9.7)	.79	.87
Female to male ratio (% female)	37:16 (69.8)	37:16 (69.8)	>.99	33:16 (67.3)	37:8 (82.2)	.10	.46
Duration of disease, mean (SD), y	6.2 (6.3)	7.1 (5.6)	.47	5.5 (5.1)	5.4 (5.3)	.94	.15
EDSS score, mean (IQR)	2.1 (1.0-2.8)	2.8 (1.5-3.5)	.01	2.2 (1.5-2.5)	2.6 (2.0-3.5)	.047	.84
No. of relapses, mean (SD) ^e	2.6 (1.0)	2.9 (1.4)	.21	2.9 (1.0)	2.6 (2.2)	.41	.94
Type of interferon beta treatment, No. (%)							
1a IM	11 (20.8)	10 (18.9)	.97	17 (34.7)	18 (40.0)	.62	.02
1b SC	25 (47.2)	26 (49.1)		20 (40.8)	14 (31.1)		
1a SC	17 (32.1)	17 (32.1)		12 (24.5)	13 (28.9)		

Abbreviations: EDSS, Expanded Disability Status Scale; IM, intramuscular; IQR, interquartile range; SC, subcutaneous.

^aPatients included in DNA pooling.

^bPatients included in genotyping of individual DNA samples.

^cComparisons between responders and nonresponders within each cohort using *t* test (age, duration of disease, EDSS score, and number of relapses) and χ^2 test (sex and type of interferon beta treatment).

^dComparisons between original and validation cohorts using 2-way analysis of variance (age, duration of disease, EDSS score, and number of relapses) and χ^2 test (sex and type of interferon beta treatment).

^eIn the previous 2 years.

nels and signal transduction pathways such as γ -amino-butyric acid or glutamate receptor genes.

Herein, we present the results of a genome-wide scan. Our pharmacogenetic study was performed using pooled DNA and single-nucleotide polymorphism (SNP) genotyping arrays.

METHODS

STUDY DESIGN AND CLINICAL ASSESSMENT

We studied patients having relapsing-remitting MS (RRMS) treated with interferon beta at the outpatient clinic of the Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Barcelona, Spain. All patients were included in a follow-up protocol that collected demographic and basal and longitudinal clinical data, including number of relapses and Expanded Disability Status Scale (EDSS) scores, as previously described.¹³ The study was approved by the local ethics committee, and all patients gave their informed consent.

DEFINITION OF RESPONSE TO INTERFERON BETA THERAPY

Clinical criteria of response to interferon beta therapy were applied after 2 years of treatment. Patients were considered responders if there was no increase in the EDSS score and no relapses during the follow-up period. Patients were considered nonresponders if during the follow-up period there was 1 or more relapses and an increase of at least 1 point in the EDSS score that persisted for at least 2 consecutive scheduled visits separated by a 6-month interval.¹³

ORIGINAL COHORT

One hundred six patients with RRMS, 53 (50.0%) responders and 53 (50.0%) nonresponders, were included in the study. Demographic and baseline clinical characteristics of the patients are summarized in **Table 1**.

SAMPLE POOLING AND HIGH-DENSITY SNP GENOTYPING

DNA samples were checked for quality using 2% agarose gel electrophoresis, and degraded samples were excluded from the pooling analysis. The genomic DNA concentration of each subject was determined in triplicate using a kit (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit; Invitrogen, Carlsbad, California) according to the manufacturer's recommendations. These triplicate values were used to calculate a median concentration for each DNA sample. Individual DNA samples were then added to their respective pools in equivalent molar amounts. Once created, each pool was diluted to 50 ng/ μ L with sterile water in preparation for genotyping. DNA samples from responders and nonresponders were pooled separately. All samples were pooled 3 times to account for pipetting variability. Each of these replicates was genotyped on 3 replicate arrays to account for assay and array variability. Nine early access arrays (500K; Affymetrix, Inc, Santa Clara, California) were used, following the protocols of the manufacturer (<http://www.affymetrix.com>).

ANALYSIS OF POOLED DATA FROM THE SNP ARRAYS

Probe intensity data were directly read from cell intensity files, and relative allele signal values were calculated for each quartet. Relative allele signal values correspond to the ratio of the A probe to the sum of the A and B probes (in which A is the major allele and B is the minor allele) and provide a quantitative index correlating to allele frequencies in pooled DNA. These values yield independent measures of different hybridization events and are consequently treated as individual data points. Quality control was assessed by determination of the correlation coefficient of the relative allele signal values across replicates, followed by unsupervised hierarchical clustering. Quantitatively, Pearson product moment correlation coefficients were also used, and all arrays exceeded a correlation coefficient of 0.95. In this experiment, no poor-performing arrays were identified. Although not performed in this study, we advise using intraclass correlations between arrays because they provide a better indication of agreement between arrays for quality control. Analysis was completed in an identical fashion to several

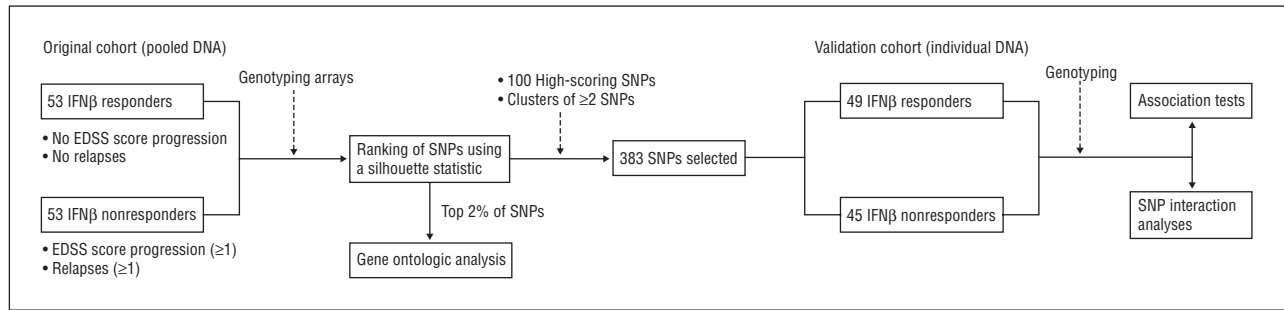


Figure. Flowchart showing the phases in the analysis of the study data. With the use of genotyping arrays (500K; Affymetrix, Inc, Santa Clara, California), a ranked list of single-nucleotide polymorphisms (SNPs) was obtained on pooled DNA from 53 responders and 53 nonresponders to interferon beta (IFN β) therapy classified on the basis of stringent clinical criteria such as score progression on the Expanded Disability Status Scale (EDSS) and number of relapses (original cohort). Gene ontologic enrichment analysis was performed in the top-scoring SNPs. After applying criteria based on SNP ranking and clustering, 383 SNPs were selected for individual genotyping in an independent cohort of 49 responders and 45 nonresponders to treatment (validation cohort) using a genotyping assay (GoldenGate; Illumina Inc, San Diego, California). Finally, association statistical tests and SNP interaction analyses were performed on the selected SNPs.

other investigations using pooled genomic DNA, and further description is available elsewhere.^{14,15} A silhouette statistic, which represents the mean of the distance of a point to all other points in its class (ie, responder pool) vs points in the other class (ie, nonresponder pool), was used to rank all genotyped SNPs. This test statistic has been heuristically shown to perform well in identifying SNPs with large allelic frequency differences.

GENE ONTOLOGIC ANALYSIS

Gene ontologic enrichment analysis was performed in the top 2% of SNPs using commercially available software (Metacore; GeneGo, Inc, St Joseph, Michigan), whereby genes were tested for preferential membership in 1 of several predefined pathways. Statistical significance was obtained from the manufacturer's suite.

VALIDATION OF TOP CANDIDATE SNPs BY INDIVIDUAL GENOTYPING

We applied 2 criteria to select candidate SNPs for validation in an independent cohort of responders and nonresponders. A first criterion was to select the top 100 high-scoring SNPs from the arrays obtained after ranking SNPs using a silhouette statistic, as described in the preceding subsection. A second criterion was to identify clusters of 2 or more SNPs located in close proximity and scoring in the top 2% and subsequently to select from each cluster the SNPs having the highest scores.

Three hundred eighty-three SNPs were chosen for individual genotyping in a validation cohort comprising 94 patients with interferon beta-treated RRMS who attended the outpatient clinic of the Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya and were classified as responders or nonresponders to therapy based on the same stringent clinical criteria as those used in the original pooled cohort. There were 49 responders (52.1%) and 45 nonresponders (47.9%) to therapy. None of these patients were part of the original cohort used for DNA pooling. Demographic and clinical characteristics of responders and nonresponders are summarized in Table 1. Except for EDSS score, responders and nonresponders were comparable on all cohort variables. The baseline EDSS score was higher in nonresponders compared with responders, a finding that has been reported previously.¹² Comparisons between cohorts revealed a higher percentage of patients treated with interferon beta-1b (subcutaneous administration) and a lower percentage of patients treated with interferon beta-1a (intramuscular administration) in the original cohort compared with the validation cohort.

DNA samples from the validation cohort were quantitated at the National Genotyping Center (Madrid, Spain) using the pre-

viously described assay (Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit). Another assay (GoldenGate; Illumina Inc, San Diego, California) was used to individually genotype SNPs selected from the platform (Affymetrix 500K). Seventeen SNPs were discarded because of problems in the genotyping process. One SNP was discarded because of significant departure from Hardy-Weinberg equilibrium. Statistical significance of individual genotype data was calculated as an allelic χ^2 value. This statistical model was chosen because it is analogous to the type of allelic associations that would be detectable using a pooling-based genome-wide association study. Quality control processes and allelic and genotypic association tests were performed using software available on the Internet (SNPator [http://www.snpator.com]).¹⁶

INTERACTION ANALYSIS OF TOP CANDIDATE SNPs

Genotype interactions were tested for all combinations of 2 and 3 SNPs. The default configuration of available software (MDR 1.2.5; http://www.epistasis.org) was used.¹⁷

RESULTS

We found an association between the X-linked *GRIA3* gene (OMIM 305915), an alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid (AMPA)-type glutamate receptor, and response to interferon beta therapy. Response to treatment was also associated with polymorphisms located in type 1 interferon-related genes. Overall, the study findings reflect the complex and polygenic nature underlying response to interferon beta therapy in MS and underscore the importance of the glutamatergic system in response to treatment. The details of our findings follow.

GENOTYPING OF THE ORIGINAL POOLED COHORT USING SNP ARRAYS

A flowchart summarizing the main steps of the study design and analysis is shown in the **Figure**. In a first phase of the study, pooled DNA samples from 106 patients with RRMS classified as responders or nonresponders to interferon beta therapy based on stringent clinical criteria were hybridized to genotyping arrays (Affymetrix 500K). A ranked list of 428 867 SNPs was obtained from analysis of the probe intensity differences between pools of 53 responders and 53 nonresponders.

Table 2. Gene Ontologic Categories Overrepresented in the Top 2% of SNPs Obtained From the Arrays With Pooled DNA Samples

Category	Cell Process	Genes	P Value
Immune response–antiviral actions of interferons	Immune response	<i>ADAR, IFNAR2, NOS2, OAS3</i>	<.001
Immune response–interleukin 6 signaling pathway	Cytokine- and chemokine-mediated signaling pathway, immune response	<i>ADAM10, STAT3</i>	.03
Cytoskeleton remodeling–RafA regulation pathway	Small guanosine triphosphatase–mediated signal transduction	<i>CDC42, PGGT1B</i>	.03

Abbreviations: RafA, Ras-like protein A; SNP, single-nucleotide polymorphism.

GENE ONTOLOGIC ANALYSIS OF TOP SNPs

Functional data mining by gene ontologic analysis revealed that the immune response category associated with the antiviral actions of interferons was most represented in the top-ranked SNPs that best discriminated between responders and nonresponders. As summarized in **Table 2**, representative genes from this category are *ADAR* (OMIM 146920), *IFNAR2* (OMIM 602376), *NOS2* (OMIM 163730), and *OAS3* (OMIM 603351). Two other less-represented categories among top-scoring SNPs were the interleukin 6 signaling and Ras-like protein A regulation pathways.

INDIVIDUAL GENOTYPING OF SELECTED SNPs IN A VALIDATION COHORT

In a second phase of the study, from the ranked list of SNPs and after applying the 2 selection criteria described in the “Methods” section, 383 SNPs were chosen for genotyping in a replication cohort to validate results from the pooled SNP arrays. We did not perform genotyping in our original pooled cohort because the objective of the study was not to evaluate pooling. Instead, we genotyped selected SNPs in individual DNA samples from a totally independent cohort of 94 interferon beta therapy responders and nonresponders by using a different genotyping platform. Calculated association statistics are given in **Table 3** for the intragenic SNPs showing statistical significance ($P < .05$ after allelic frequency comparisons).

The SNP rs12557782 showed the greatest association with response to interferon beta therapy, with $P = .002$ and an odds ratio of 2.7 (Table 3). This SNP resides in chromosome X and is positioned in intron 2 of the *GRIA3* gene, which codes for an AMPA-type glutamate receptor. At the genotype level, this X-linked gene showed different behavior between the sexes; a positive association with response to treatment was observed among women ($P < .001$; odds ratio, 8.5) but not among men ($P = .56$; odds ratio, 1.7). It cannot be ruled out that the validation failure in men is not due to power because fewer men were included in the study and men contribute only 1 copy of the X chromosome per individual. The second strongest association signal, with $P = .006$ and an odds ratio of 2.4, was found for SNP rs7308076, which is located in the *CIT* gene (OMIM 605629) and codes for a cell cycle–dependent protein. Two SNPs associated with response to treatment reside in genes that are directly associated with the type 1 interferon pathway. One is SNP

rs2229857, which is located in the RNA-specific adenosine deaminase *ADAR* gene and encodes an interferon-inducible protein with antiviral functions; this is a non-synonymous SNP that results in an amino acid change (arginine to lysine) in exon 2 of *ADAR*. The other is rs2248202, an intronic SNP positioned in *IFNAR2*, a gene that encodes 1 of 2 subunits that compose the type 1 interferon receptor heterodimer.

Three others SNPs were associated with treatment response (Table 3). These include rs733254 and rs11787532 (located in genes that code for the zinc finger proteins ZFAT and ZFH4, respectively) and rs9527281 (positioned in the *STARD13* gene (OMIM 609866), which encodes a Rho family guanosine triphosphatase–activating protein).

The following intergenic SNPs were also associated with response to treatment in comparisons of allelic frequencies between interferon beta therapy responders and nonresponders: rs4425528 (chromosome 5, $P = .009$), rs1501173 (chromosome 4, $P = .02$), rs10424648 (chromosome 19, $P = .03$), rs274947 (chromosome 9, $P = .03$), rs8180631 (chromosome 6, $P = .03$), rs7517690 (chromosome 1, $P = .03$), rs1948577 (chromosome 16, $P = .03$), rs11956421 (chromosome 5, $P = .03$), rs1382673 (chromosome 12, $P = .04$), rs236855 (chromosome 6, $P = .04$), and rs9297235 (chromosome 8, $P = .04$). The remaining SNPs were unassociated with responder status. The full list of SNPs is given in the eTable (<http://www.archneurology.com>).

INTERACTION ANALYSIS BETWEEN SNPs

Finally, interaction analysis between the selected SNPs used for validation was performed to evaluate whether combinations of SNPs increased the strength of association with response to treatment. No statistically significant interactions were obtained in combinations of pairs or triplets of SNPs. The strongest pair and triplet interactions selected by the software program (MDR 1.2.5) were pair rs417812-rs12557782 (testing balanced accuracy, 0.56; $P = .72$) and triplet rs2322668-rs417812-rs12557782 (testing balanced accuracy, 0.49; $P = .97$) (χ^2 test for both).

COMMENT

The growing number of new therapeutic strategies for MS and their potential risk for lack of response at the individual patient level make personalized therapy a ne-

Table 3. Association Analysis of Statistically Significant SNPs After Genotyping in the Validation Cohort

SNP	Chromosome Location	Gene	Location	Allelic Association			Genotypic Association		
				Risk Allele	OR (95% CI)	P Value	Risk Genotype	OR (95% CI)	P Value
rs12557782	X	Glutamate receptor, ionotropic, AMPA 3 (<i>GRIA3</i>)	Intron 2	G	2.7 (1.5-5.2)	.002	AG + GG in women, G in men	8.5 (2.2-32.8) in women, 1.7 (0.3-9.5) in men	<.001 in women, .56 in men
rs7308076	12	Citron (Rho-interacting, serine-threonine kinase 21) (<i>CIT</i>)	Intron 9	C	2.4 (1.3-4.4)	.006	CC	3.7 (1.5-8.8)	.003
rs2229857	1	Adenosine deaminase, RNA-specific (<i>ADAR</i>)	Exon 2 (missense)	A	2.1 (1.1-4.0)	.02	AA	8.6 (1.0-71.7)	.02
rs733254	8	Zinc finger and autoimmune thyroid hook domain-containing (<i>ZFAT</i>)	Intron 3	G	2.1 (1.1-4.0)	.02	GG + GT	22.4 (1.3-401.2) ^a	.002
rs9527281	13	Steroidogenic acute regulatory gene-related lipid transfer domain-containing 13 (<i>STARD13</i>)	Intron 1	T	2.0 (1.1-3.7)	.02	GT + TT	5.1 (1.0-25.4)	.03
rs11787532	8	Zinc finger homeobox 4 (<i>ZFX4</i>)	Intron 3	C	2.3 (1.0-5.2)	.04	CC + CG	2.6 (1.1-6.5)	.03
rs2248202	21	Interferon (alpha, beta, and omega) receptor 2 (<i>IFNAR2</i>)	Intron 1	C	1.9 (1.0-3.7)	.04	CC	5.4 (1.1-26.2)	.02

Abbreviations: AMPA, alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole-propionic acid; CI, confidence interval; OR, odds ratio; SNP, single-nucleotide polymorphism.

^aHaldane correction applied to calculation.

cessity for MS. Pharmacogenomics is a new field that incorporates genome technologies such as gene expression profiling, SNP screens, and proteomics to predict treatment response. Although pharmacogenomics holds great promise for individualized therapy, it is still in its infancy in the field of MS.

Several technologies have been used in an attempt to identify genes associated with response to interferon beta therapy, and several surrogate markers for interferon beta treatment response have been proposed.⁵⁻¹¹ Unfortunately, results from these studies were disappointing: many genetic associations with treatment response that were identified in some investigations were not confirmed in others. To date, only one genome-wide pharmacogenomic study¹² on interferon beta therapy in MS has been published. This study, in which the Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya was one of 4 collaborating centers, aimed to identify genes associated with response to interferon beta therapy and was performed among responder and nonresponder DNA pools using genotyping arrays (Affymetrix 100K). Although previously reported genetic associations⁵⁻¹¹ were not confirmed, the study identified candidate genes and underscored the genetic heterogeneity underlying response to interferon beta therapy in MS.

Herein, we also conducted a genome-wide association study with pooled DNA samples from responders and nonresponders to interferon beta therapy but used higher-density SNP arrays (Affymetrix 500K) and more stringent clinical criteria to identify treatment failure. The study was conducted in 2 phases. In the first phase of the study, a ranked list of SNPs was obtained from the analysis of the SNP microarrays. In the second phase of the study, top-scoring SNPs were individually geno-

typed in an independent replication cohort using a different genotyping platform. It is well known in replicated association studies that most SNPs do not show association in the replication cohort. In our study, only 18 of 383 SNPs selected from the microarrays showed statistical significance in the validation cohort. None of the reported allelic and genotypic associations exceeded multiple test correction. Nevertheless, lack of correction for multiple testing would have resulted in a high risk for false-positive results.

The strongest association signal corresponded to SNP rs12557782, a polymorphism located in the *GRIA3* gene, which encodes an AMPA-type glutamate receptor. This finding is relevant from the pathogenetic point of view. A potential connection between genes that encode neurotransmitter-gated channels and response to interferon beta therapy was suggested by Byun and colleagues¹² based on their findings of an overrepresentation of genes that code for glutamate and γ -aminobutyric acid receptors in gene ontologic analysis. Our results support the relationship between neuronal excitation and interferon beta treatment response. Glutamate has important roles in the central nervous system,^{18,19} and AMPA-type glutamate receptors mediate most excitatory synaptic transmission in the central nervous system^{20,21} and are expressed in oligodendrocytes.²² Overactivation of AMPA receptors leads to excitotoxic oligodendroglial cell death and may be involved in the pathogenesis of demyelinating disorders.²²⁻²⁸ Although the mechanism is unknown whereby allelic variants of the *GRIA3* gene may influence response to interferon beta therapy, this finding together with the observation that genetic association was restricted to women represents a new range of perspectives in the field of interferon beta pharmacogenomics.

The SNP rs7308076 showed the second strongest association signal with response to interferon beta therapy. This polymorphism is located in intron 9 of the *CIT* gene, which codes for a Rho-interacting protein kinase. *CIT* is concentrated at postsynaptic sites of γ -aminobutyric acid and glutamatergic neurons in association with the postsynaptic scaffold protein PSD-95,²⁹⁻³¹ and possible cross talk between the Rho signaling system and glutamate receptor-mediated signaling has been suggested.²⁹ These observations further support the potential link between neuronal excitation and response to interferon beta therapy.

As revealed by gene ontologic analysis, top-scoring SNPs that best discriminated between interferon beta therapy responders and nonresponders in our study belonged to the immune response category of genes associated with the antiviral actions of interferons. Polymorphisms located in 2 (*ADAR* and *IFNAR2*) of 4 genes representative of this category were validated in the replication cohort. *ADAR* encodes an interferon-inducible enzyme with important roles in the editing of viral RNA transcripts and cellular pre-messenger RNAs.³² Consistent with our findings, Byun et al¹² reported an SNP located 54 kilobases downstream of the *ADAR* gene (rs4131514) that was significantly different between interferon beta therapy responders and nonresponders.

A direct relationship between response to interferon beta therapy and the type 1 interferon pathway is suggested by the finding of an association between treatment response and SNP rs2248202. This polymorphism is positioned in intron 1 of the *IFNAR2* gene and codes for a subunit of the type 1 interferon receptor. However, our results are in disagreement with previous studies^{6,8,9,12} that showed a lack of association between polymorphisms of the *IFNAR2* gene and response to interferon beta therapy.

Little evidence exists in the literature regarding the function of the zinc finger proteins ZFAT and ZFHx4 and the guanosine triphosphatase-activating protein STARD13, and their possible association with response to treatment is unknown to date. Finally, the intergenic SNPs that were validated in the replication cohort may be located in genomic regions that are in high linkage disequilibrium with genes involved in response to interferon beta therapy.

In conclusion, our findings are in line with previous evidence suggesting a role of neurotransmitter-gated channels in response to interferon beta therapy. Furthermore, our study supports a role of genes directly associated with the type 1 interferon pathway and their potential connection with the glutamatergic system in response to interferon beta therapy. However, it is unknown whether these findings are associated with response to interferon beta therapy or reflect the natural history of the disease because of the lack of a placebo group of untreated patients with MS followed up for at least 2 years. Finally, additional replication studies will be needed to further implicate these genes in response to interferon beta therapy in patients with MS.

Accepted for Publication: March 12, 2009.

Author Affiliations: Centre d'Esclerosi Múltiple de Cata-

lunya, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona (Drs Comabella, Río, and Montalban and Ms Fernández), Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra (Mr Morcillo-Suárez and Dr Navarro), Instituto Nacional de Bioinformática (Mr Morcillo-Suárez), and Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats (Drs Navarro and Martin), Barcelona, Spain; and Neurogenomics Division, Translational Genomics Research Institute, Phoenix, Arizona (Mr Craig). Dr Martin is now with the Institute for Neuroimmunology and Clinical Multiple Sclerosis Research, Center for Molecular Neurobiology Hamburg, University Medical Center Eppendorf, Hamburg, Germany.

Correspondence: Manuel Comabella, MD, Centre d'Esclerosi Múltiple de Catalunya, Unitat de Neuroimmunologia Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Edifici Escola d'Infermeria 2^a planta, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain (mcomabel@ir.vhebron.net).

Author Contributions: Drs Comabella and Craig had full access to all of the data in the study and takes responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis. Drs Comabella and Craig contributed equally to this work. *Study concept and design:* Comabella, Craig, and Montalban. *Acquisition of data:* Comabella, Craig, Morcillo-Suárez, Río, Navarro, Fernández, and Martin. *Drafting of the manuscript:* Comabella, Craig, Morcillo-Suárez, Río, Navarro, and Martin. *Critical revision of the manuscript for important intellectual content:* Comabella, Craig, Río, Navarro, Fernández, Martin, and Montalban. *Statistical analysis:* Craig, Morcillo-Suárez, Río, Navarro, and Martin. *Study supervision:* Comabella, Craig, and Montalban.

Financial Disclosure: None reported.

Funding/Support: This study was supported in part by a grant from the DANA Foundation's neuroimmunology program (Dr Comabella).

Additional Information: The eTable is available at <http://www.archneuro.com>.

Additional Contributions: We thank the Red Española de Esclerosi Múltiple, sponsored by the Fondo de Investigación Sanitaria, Ministry of Science and Innovation, Spain, and the Ajuts per donar Suport als Grups de Recerca de Catalunya (SGR 2005-1081), sponsored by the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca, Generalitat de Catalunya, Spain.

REFERENCES

1. IFNB Multiple Sclerosis Study Group. Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I: clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Neurology*. 1993;43(4):655-661.
2. Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, et al; Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 1996;39(3):285-294.
3. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon Beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis [published correction appears in *Lancet*. 1999;353(9153):678]. *Lancet*. 1998;352(9139):1498-1504.

4. Río J, Nos C, Tintore M, et al. Assessment of different treatment failure criteria in a cohort of relapsing-remitting multiple sclerosis patients treated with interferon beta: implications for clinical trials. *Ann Neurol*. 2002;52(4):400-406.
5. Villoslada P, Barcellos LF, Río J, et al. The HLA locus and multiple sclerosis in Spain: role in disease susceptibility, clinical course and response to interferon-beta. *J Neuroimmunol*. 2002;130(1-2):194-201.
6. Sriram U, Barcellos LF, Villoslada P, et al. Pharmacogenomic analysis of interferon receptor polymorphisms in multiple sclerosis. *Genes Immun*. 2003;4(2):147-152.
7. Fernández O, Fernández V, Mayorga C, et al. HLA class II and response to interferon-beta in multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand*. 2005;112(6):391-394.
8. Cunningham S, Graham C, Hutchinson M, et al. Pharmacogenomics of responsiveness to interferon IFN-beta treatment in multiple sclerosis: a genetic screen of 100 type I interferon-inducible genes. *Clin Pharmacol Ther*. 2005;78(6):635-646.
9. Leyva L, Fernández O, Fedetz M, et al. *IFNAR1* and *IFNAR2* polymorphisms confer susceptibility to multiple sclerosis but not to interferon-beta treatment response. *J Neuroimmunol*. 2005;163(1-2):165-171.
10. Martínez A, de las Heras V, Mas Fontao A, et al. An IFNG polymorphism is associated with interferon-beta response in Spanish MS patients. *J Neuroimmunol*. 2006;173(1-2):196-199.
11. Weinstock-Guttman B, Tamaño-Blanco M, Bhasi K, Zivadinov R, Ramanathan M. Pharmacogenetics of *MXA* SNPs in interferon-beta treated multiple sclerosis patients. *J Neuroimmunol*. 2007;182(1-2):236-239.
12. Byun E, Caillier SJ, Montalban X, et al. Genome-wide pharmacogenomic analysis of the response to interferon beta therapy in multiple sclerosis. *Arch Neurol*. 2008;65(3):337-344.
13. Río J, Nos C, Tintore M, et al. Defining the response to interferon-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Ann Neurol*. 2006;59(2):344-352.
14. Pearson JV, Huentelman MJ, Halperin RF, et al. Identification of the genetic basis for complex disorders by use of pooling-based genomewide single-nucleotide-polymorphism association studies. *Am J Hum Genet*. 2007;80(1):126-139.
15. Homer N, Tembe WD, Szelinger S, et al. Multimer analysis and imputation of multiple platform pooling-based genome-wide association studies. *Bioinformatics*. 2008;24(17):1896-1902.
16. Morcillo-Suarez C, Alegre J, Sangros R, et al. SNP analysis to results (SNPator): a Web-based environment oriented to statistical genomics analyses upon SNP data. *Bioinformatics*. 2008;24(14):1643-1644.
17. Moore JH, Gilbert JC, Tsai CT, et al. A flexible computational framework for detecting, characterizing, and interpreting statistical patterns of epistasis in genetic studies of human disease susceptibility. *J Theor Biol*. 2006;241(2):252-261.
18. Zipfel GJ, Babcock DJ, Lee JM, Choi DW. Neuronal apoptosis after CNS injury: the roles of glutamate and calcium. *J Neurotrauma*. 2000;17(10):857-869.
19. Barnes GN, Slevin JT. Ionotropic glutamate receptor biology: effect on synaptic connectivity and function in neurological disease. *Curr Med Chem*. 2003;10(20):2059-2072.
20. Seeburg PH. The TINS/TiPS Lecture: the molecular biology of mammalian glutamate receptor channels. *Trends Neurosci*. 1993;16(9):359-365.
21. Mayer ML, Armstrong N. Structure and function of glutamate receptor ion channels. *Annu Rev Physiol*. 2004;66:161-181.
22. Steinhäuser C, Gallo V. News on glutamate receptors in glial cells. *Trends Neurosci*. 1996;19(8):339-345.
23. Matute C. Characteristics of acute and chronic kainite excitotoxic damage to the optic nerve. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998;95(17):10229-10234.
24. McDonald JW, Althomsons SP, Hyrc KL, Choi DW, Goldberg MP. Oligodendrocytes from forebrain are highly vulnerable to AMPA/kainate receptor-mediated excitotoxicity. *Nat Med*. 1998;4(3):291-297.
25. Sánchez-Gómez MV, Matute C. AMPA and kainate receptors each mediate excitotoxicity in oligodendroglial cultures. *Neurobiol Dis*. 1999;6(6):475-485.
26. Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nat Med*. 2000;6(1):67-70.
27. Smith T, Groom A, Zhu B, Turski L. Autoimmune encephalomyelitis ameliorated by AMPA antagonists. *Nat Med*. 2000;6(1):62-66.
28. Werner P, Pitt D, Raine CS. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann Neurol*. 2001;50(2):169-180.
29. Furuyashiki T, Fujisawa K, Fujita A, et al. Citron, a Rho-target, interacts with PSD-95/SAP-90 at glutamatergic synapses in the thalamus. *J Neurosci*. 1999;19(1):109-118.
30. Zhang W, Vazquez L, Apperson M, Kennedy MB. Citron binds to PSD-95 at glutamatergic synapses on inhibitory neurons in the hippocampus. *J Neurosci*. 1999;19(1):96-108.
31. Zhang W, Benson DL. Targeting and clustering citron to synapses. *Mol Cell Neurosci*. 2006;31(1):26-36.
32. Samuel CE. Antiviral actions of interferons. *Clin Microbiol Rev*. 2001;14(4):778-809.