

lek. Mikołaj Radziszewski

Zaburzenia metylacji całogenomowej w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u pacjentów z orbitopatią tarczycową w przebiegu choroby Gravesa i Basedowa, w trakcie leczenia dożylnymi pulsami glikokortykosteroidów

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu

w dyscyplinie nauki medyczne

Promotor: prof. dr hab. n.med. Tomasz Bednarczuk

Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum
Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego



Obrona rozprawy doktorskiej przed Radą Dyscypliny Nauk Medycznych

Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Warszawa 2025 r.

Słowa kluczowe

Choroba Gravesa i Basedowa, orbitopatia tarczycowa, metylacja DNA, epigenetyka

Key words

Graves' disease, Graves' orbitopathy, DNA methylation, epigenetics

Badania obejmujące rozprawę doktorską zostały współfinansowane i zrealizowane w ramach następujących projektów:

Projekt 1. (główny)

Zaburzenia metylacji genomowej w komórkach krwi obwodowej u pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa oraz orbitopatią tarczycową w trakcie leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami.

Narodowe Centrum Nauki, Grant Preludium-20: NCN57, 2021/41/N/NZ5/02975

Kierownik projektu: lek. Mikołaj Radziszewski

Opiekun projektu: Prof. dr hab. n.med. Tomasz Bednarczuk

Projekt 2.

Zaburzenia metylacji całogenomowej w komórkach krwi obwodowej u osób dorosłych i dzieci z chorobą Gravesa i Basedowa

Grant Młodego Badacza Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego: 1WN/M/MB/N/20

Kierownik projektu: lek. Mikołaj Radziszewski

Opiekun projektu: Prof. dr hab. n.med. Tomasz Bednarczuk

Pragnę wyrazić podziękowania Osobom, bez których realizacja pracy doktorskiej nie byłaby możliwa. Szczególne podziękowania kieruję w stronę Promotora pracy, Pana Prof. dr hab. n. med. Tomasza Bednarczuka. Bardzo dziękuję za cierpliwość, okazane wsparcie, motywację, a także przekazaną wiedzę i kluczowe uwagi dotyczące projektów na każdym etapie ich realizacji.

Dziękuję Pani Prof. dr hab. n. med. Urszuli Ambroziak oraz całemu Zespołowi Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego za inspiracje, wieloletnią pomoc w pracy klinicznej i naukowej oraz zdobyte więzy przyjaźni.

Dziękuję Paniom Małgorzacie Zawierusze, Teresie Marczak oraz dr n. przyr. Agnieszce Kondrackiej za pomoc w gromadzeniu materiału do badań. Dziękuję Panu dr n. przyr. Zbigniewowi Bartoszewiczowi za bezcenne doświadczenie w pracy laboratoryjnej zdobyte w czasie studiów.

Kolejne szczególne podziękowania składam Panu Prof. dr hab. n. med. Rafałowi Płoskiemu oraz dr n. med i n. o zdr. Piotrowi Gasperowiczowi za możliwość realizacji pracy doktorskiej. Panu Piotrowi Gasperowiczowi dziękuję również za wyrozumiałość, cierpliwość, przekazaną wiedzę oraz pomoc przy analizie wyników projektów w duchu profesjonalnej współpracy.

Dziękuję Panu Prof. dr hab. n. med. Arturowi Bossowskiemu za zaufanie i profesjonalną współpracę między ośrodkami.

Dziękuję Panu dr n. med. Zbigniewowi Lewandowskiemu za poświęcony czas, nieocenioną wiedzę i bezinteresowne wsparcie w rozwoju naukowym.

Dziękuję Panu Jerzemu Szczęchorowi za zaszczepienie we mnie ducha wysiłku, nieustępowania przeszkodom i pewności siebie, a Państwu: Małgorzacie Libmann-Sokołowskiej, Renacie Mazur, Paulinie Skibie, Łukaszowi Czarnockiemu, Jolancie Klimas-Góreckiej oraz Edycie Rybakowskiej dziękuję za wkład pracy w moją edukację i wrażliwość.

Szczególne podziękowania kieruję również w stronę moich Rodziców – Doroty i Piotra, którzy wierzyli we mnie przez całe życie, wspierając moje wybory i liczne zainteresowania artystyczne, sportowe i najważniejsze, te naukowe.

I wreszcie, najgłębsze ukłony składam swojej własnej Rodzinie, na której polegać mogę zawsze, a ich wiara w spełnienie moich zobowiązań była od lat niezachwiana. Pracę doktorską w całości dedykuję mojej wspaniałej Żonie Magdalenie oraz Dzieciom – Alicji i Antoniemu. Bez ich wsparcia i wyrzeczeń realizacja pracy byłaby niemożliwa.

Spis treści

I Spis tabeli i rycin	8
II Wykaz stosowanych skrótów	10
III Streszczenie w języku polskim	26
IV Streszczenie w języku angielskim	30
V Wstęp	33
V.1. Definicja i epidemiologia choroby Gravesa i Basedowa.....	33
V.2. Etiopatogeneza choroby Gravesa i Basedowa.....	33
V.2.1. Czynniki genetyczne choroby Gravesa i Basedowa.....	33
V.2.2. Czynniki środowiskowe choroby Gravesa i Basedowa.....	35
V.2.3. Czynniki endogenne choroby Gravesa i Basedowa.....	35
V.3. Obraz kliniczny choroby Gravesa i Basedowa.....	36
V.4. Leczenie choroby Gravesa i Basedowa.....	38
V.5. Rola epigenetyki w patogenezie oraz przebiegu choroby Gravesa i Basedowa.....	39
V.5.1. Epigenetyka.....	39
V.5.2. Metylacja DNA.....	40
V.5.3. Metylacja DNA w chorobie Gravesa i Basedowa.....	41
V.5.4 Związek działania glikokortykosteroidów i zmian metylacji DNA.....	48
V.5.5. Inne zaburzenia epigenetyczne w chorobie Gravesa i Basedowa.....	49
VI Założenia i cel pracy	50
VI.1. Założenia projektów.....	50
VI.2. Cele projektów.....	50
VII Materiał i Metody	51
VII.1. Grupy badane.....	51
VII.1.1. Rekrutacja, kryteria włączenia do badania, Projekt 1. i Projekt 2.	51
VII.1.2. Rekrutacja uczestników, kryteria włączenia do badania, Projekt 1.	53
VII.1.3.. Protokół Projektu 1.	53
VII.1.4. Rekrutacja uczestników, kryteria włączenia do badania, Projekt 2.	55

VII.1.5.. Protokół Projektu 2.	55
VII.2. Metody laboratoryjne.....	55
VII.2.1. Materiał biologiczny.....	56
VII.2.2. Izolacja DNA i ocena ilościowa uzyskanego materiału.....	56
VII.2.3. Przygotowanie bibliotek metylacyjnych.....	57
VII.2.3.1. Fragmentacja wyizolowanego DNA oraz ocena ilościowa i jakościowa materiału.....	57
VII.2.3.2. Reparatcja końców, adenylacja i konwersja bisulfitowa.....	58
VII.2.3.3. Amplifikacja.....	59
VII.2.3.4. Ocena ilościowa i jakościowa biblioteki.....	59
VII.2.4. Sekwencjonowanie nowej generacji.....	60
VII.2.5. Oznaczenia parametrów funkcji tarczycy oraz przeciwciał tarczycowych.....	60
VII.3. Analiza wyników.....	60
VII.3.1. Analiza bioinformatyczna.....	60
VII.3.2. Analiza statystyczna.....	61
VIII Wyniki.....	64
VIII.1. Wyniki Projektu 1.	64
VIII.1.1. Charakterystyka chorych Projektu 1.	64
VIII.1.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem GO oraz skutecznością leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami.	64
VIII.1.2.1 Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem GO.....	64
VIII.1.2.2. Analiza wzbogacenia funkcjonalnego.....	74
VIII.1.2.3. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a skutecznością leczenia orbitopatii tarczycowej dożylnymi glikokortykosteroidami oraz analiza eksploracyjna.....	78
VIII.2. Wyniki Projektu 2.	86
VIII.2.1. Charakterystyka chorych Projektu 2.	86
VIII.2.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem choroby Gravesa i Basedowa.....	87
VIII.2.2.1. Analiza całogenomowej i szczegółowej metylacji DNA w grupie dorosłych chorych z chorobą Gravesa i Basedowa oraz zdrowych kontroli.....	87

VIII.2.2.2. Analiza całogenomowej i szczegółowej metylacji DNA w grupie dzieci z chorobą Gravesa i Basedowa oraz zdrowych kontroli.....	94
VIII.2.2.3. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a wiekiem rozwoju choroby Gravesa i Basedowa.....	98
VIII.2.3. Analiza wzbogacenia funkcjonalnego oraz eksploratywna Projektu 2.	103
IX Dyskusja.....	109
IX.1. Grupy badane.	110
IX.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem orbitopatii tarczycowej oraz skutecznością leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami. (Projekt 1.).	111
IX.2.1. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem GO.....	111
IX.2.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a skutecznością leczenia orbitopatii tarczycowej dożylnymi glikokortykosteroidami.....	117
IX.3. Ocena związku całogenomowej metylacji DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem choroby Gravesa i Basedowa u dorosłych i dzieci ze świeżym rozpoznaniem choroby Gravesa i Basedowa (Projekt 2.).	118
IX.3.1. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem choroby Gravesa i Basedowa.....	118
IX.3.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a wiekiem rozwoju choroby Gravesa i Basedowa.....	121
IX.4. Związek zaburzeń metylacji DNA w chorobie Gravesa i Basedowa oraz orbitopatii tarczycowej z czynnikami środowiskowymi.....	123
IX.5. Ograniczenia Projektów.....	125
IX.5.1. Heterogenność badanych grup.....	125
IX.5.2. Materiał biologiczny i uwikłanie czynników związane ze stosowaniem dożylnych glikokortykosteroidów.....	126
IX.5.3. Metoda laboratoryjna oceny metylacji DNA i analiza wyników.....	128
IX.5.4. Podsumowanie.....	130
X Wnioski.....	131
XI Piśmiennictwo.....	132
XII Opinia Komisji Bioetycznej.....	150

I Spis tabeli i rycin

Tabela 1. Podsumowanie dotychczasowych badań dotyczących metylacji DNA w chorobie Gravesa.....	42
Tabela 2. Podsumowanie dotychczasowych badań dotyczących metylacji DNA w orbitopatii tarczycowej.....	46
Tabela 3. Charakterystyka pacjentów z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO.....	65
Tabela 4(a-d). Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy GO vs. HC.....	70
Tabela 5.. Podsumowanie stopnia zmian DNAm u wszystkich chorych z GO leczonych ivGCS.....	75
Tabela 6. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG.....	77
Tabela 7. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG.....	83
Tabela 8. Charakterystyka pacjentów dorosłych (AGD) i dzieci (PGD) ze świeżym rozpoznaniem GD.....	86
Tabela 9 (a-c). Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy AGD vs. HC.....	91
Tabela 10. Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy PGD vs. pHc.....	97
Tabela 11. Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy PGD vs. AGD.....	102
Tabela 12. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG.....	105
Tabela 13. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG.....	107
Tabela 14. Porównanie ilościowe i jakościowe CpG anotowanych na <i>loci</i> w pracy Xin i wsp.....	112
Rycina 1. Wieloczynnikowe podłoże choroby Gravesa i Basedowa.....	35
Rycina 2. Schemat obejmujący grupy badane i kontrolne uczestników Projektów.....	52
Rycina 3. Protokół Projektu 1.....	53
Rycina 4. Zdjęcie elektroforezy horyzontalnej.....	57
Rycina 5. Zestawienie metod laboratoryjnych zastosowanych podczas Projektów.....	58
Rycina 6. Przykład prawidłowej biblioteki metylacyjnej.....	59
Rycina 7. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami GO i HC.....	67
Rycina 8. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej grupy GO oraz HC.	67
Rycina 9. Wyniki analizy porównawczej w postaci głównych komponentów składowych (PCA).....	68
Rycina 10. Prezentacja dystrybucji <i>loci</i> zawierających DMRs w kontekście całego genomu.....	68
Rycina 11. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie GO vs. HC.....	69

Rycina 12. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków (GeneO: GO vs. HC).....	74
Rycina 13. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków (KEGG: GO vs. HC).....	76
Rycina 14. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami GO-P2 i HC.....	79
Rycina 15. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej grupy GO-P2 oraz HC.	79
Rycina 16. Wyniki analizy porównawczej w postaci głównych komponentów składowych (PCA).....	80
Rycina 17. Prezentacja dystrybucji <i>loci</i> zawierających DMRs w kontekście całego genomu.....	80
Rycina 18. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie GO-P2 vs. HC.....	81
Rycina 19. Wyniki analizy PCA dla chorych z GO podgrup: R i NR	82
Rycina 20 A-D. Analiza eksploratywna względem dawki metyloprednizolonu dożylnego u chorych z GO-P2...	85
Rycina 21. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami AGD i HC.....	88
Rycina 22. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej grupy AGD oraz HC.	88
Rycina 23. Wyniki analizy porównawczej w postaci głównych komponentów składowych (PCA).....	89
Rycina 24. Prezentacja dystrybucji <i>loci</i> zawierających DMRs w kontekście całego genomu.....	89
Rycina 25.. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie AGD vs. HC.....	90
Rycina 26.. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami PGD i pHC.....	95
Rycina 27. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej grupy PGD oraz pHC.	95
Rycina 28. Wyniki analizy porównawczej w postaci głównych komponentów składowych (PCA).....	96
Rycina 29. Prezentacja dystrybucji <i>loci</i> zawierających DMRs w kontekście całego genomu.....	96
Rycina 30. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie PGD vs. pHC.....	97
Rycina 31. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami PGD i AGD.....	99
Rycina 32 A-B.. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej grupy PGD oraz AGD.	100
Rycina 33. Wyniki analizy porównawczej w postaci głównych komponentów składowych (PCA).....	101
Rycina 34. Prezentacja dystrybucji <i>loci</i> zawierających DMRs w kontekście całego genomu.....	101
Rycina 35. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie PGD i AGD.....	102
Rycina 36. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków (GeneO: AGD vs. HC).....	104
Rycina 37. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków (KEGG: AGD vs. HC).....	106
Rycina 38. Wykresy analiz dla podgrup chorych dorosłych z GD w zależności od palenia papierosów.....	108

II Wykaz stosowanych skrótów

5h-MC (ang. 5-hydroxymethylcytosine) – 5-hydroksymetylocytozyna

5-MC (ang. 5-methylcytosine) – 5-metylocytozyna

ABHD3 (ang. abhydrolase domain containing 3, phospholipase) – fosfolipaza ABHD3

ABHD5 (ang. abhydrolase domain containing 5, phospholipase) – fosfolipaza ABHD5

ADAMTS (ang. ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Motif) – metaloproteinaza ADAM z motywem trombospondyny

ADAMTS20 (ang. ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 20 Motif) – metaloproteinaza ADAM z motywem 20 trombospondyny typu 1

ADRB2 (ang. beta-2 adrenergic receptor) – receptor adrenergiczny beta-2

AGD (ang. adult Graves' disease) – grupa dorosłych z chorobą Gravesa i Basedowa

aGO (ang. active Graves' orbitopathy) – aktywna orbitopatia tarczycowa (Gravesa)

AIRE (ang. autoimmune regulator) – białko regulacji autoimmunologicznej

AITD (ang. autoimmune thyroid disease) – autoimmunologiczna choroba tarczycy

ALK (ang. ALK Receptor Tyrosine Kinase) – kinaza ALK

ALL (ang. acute lymphoblastic leukemia) – ostra białaczka limfoblastyczna

AMPK (ang. 5'AMP-activated protein kinase) – kinaza aktywowana przez AMP

ANGEL1 (ang. Angel Homolog 1) – białko ANGEL 1

ARHGAP (ang. Rho GTPase Activating Protein) – białko aktywujące GTP-azę Rho

ATD (ang. antithyroid drug) – lek przeciwtarczycowy

ATP (ang. adenosine triphosphate) – adenozynotrifosforan

ATP2B4 (ang. ATPase Phospholipid Transporting 2B4) – ATP-aza transportująca fosfolipidy 2B4

ATP8B3 (ang. ATPase Phospholipid Transporting 8B3) – ATP-aza transportująca fosfolipidy 8B3

ATXN3 (ang. ataxin3) – ataksyna 3

ATXN7 (ang. Ataxin7) – ataksyna 7

AVEN (ang. Apoptosis And Caspase Activation Inhibitor) – inhibitor apoptozy i aktywacji kaspaz

B3GNT2 (ang. UDP-GlcNAc:BetaGal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 2) – beta-13-N-acetyloglukozaminylotransferaza typu 2

B3GNT3 (ang. UDP-GlcNAc:BetaGal Beta-1,3-N-Acetylglucosaminyltransferase 2) – beta-13-N-acetyloglukozaminylotransferaza typu 3

BAGE2 (ang. BAGE Family Member 2) – białko BAGE2

BCL2 (ang. BCL2 Apoptosis Regulator BCL2 Apoptosis Regulator) – czynnik apoptotyczny BCL2

BCL2L11 (ang. BCL2 Like 11) – białko apoptotyczne BCL2L11 (inaczej: BIM)

BECN1 (ang. beclin-1) – beklina-1

BOLL (ang. Boule Homolog gene) – białko BOLL

bp (ang. base pairs) – liczba par zasad (azotowych)

BSND (ang. barttin CLCNK type accessory subunit beta) – białko związane z zespołem Barrtera

BS-PCR (ang. bisulfite polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowa polimerazy z bisulfitem

C (ang. cytosine) – cytozyna

C2orf49 (ang. Chromosome 2 open reading frame 49) – białko C2orf49

C2orf57 (ang. Chromosome 2 open reading frame 57) – białko C2orf57

C6orf52 (ang. Chromosome 6 open reading frame 52) – białko C6orf52

C9orf92 (ang. Chromosome 9 open reading frame 92) – białko C9orf92

CACNA (ang. Calcium Voltage-Gated Channel A) – podjednostka alfa kanału wapniowego bramkowanego napięciem

CACNG4 (ang. Calcium Voltage-Gated Channel G4) – podjednostka gamma 4 kanału wapniowego bramkowanego napięciem

CACNG8 (ang. Calcium Voltage-Gated Channel G8) – podjednostka gamma 8 kanału wapniowego bramkowanego napięciem

CALML5 (ang. Calmodulin Like 5) – kalmodulina 5

CALML6 (ang. Calmodulin Like 6) – kalmodulina 6

CAMK (ang. Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase) – kinaza zależna od wapnia/kalmoduliny

CAMK2A (ang. calcium/calmodulin dependent protein kinase II alpha) – podjednostka alfa zależnej od wapnia i kalmoduliny kinazy typu 2

cAMP (ang. cyclic adenosine monophosphate) – cykliczny adenozymonofosforan

CAPN10 (ang. calpain-10) – kalpaina-10

CAS (ang. clinical activity score) – skala aktywności orbitopatii tarczycowej

CCL (ang. C-C Motif Chemokine Ligand) – chemokine z motywem C-C

CCN (ang. CCN protein family) – białka macierzy zewnątrzkomórkowej z rodziny CCN

CCR7 (ang. C-C chemokine receptor type 7) – receptor C-C chemokiny typu 7

CCRL2 (ang. C-C chemokine receptor-like 2) – białko podobne do receptora C-C chemokiny 2

CD14 (ang. cluster of differentiation 14) – antygen różnicowania komórkowego CD14

CD151 (ang. cluster of differentiation 151) – antygen różnicowania komórkowego CD151

CD2 (ang. cluster of differentiation 2) – antygen różnicowania komórkowego CD2

CD200 (ang. cluster of differentiation 200) – antygen różnicowania komórkowego CD200

CD274 (ang. cluster of differentiation 274) – antygen różnicowania komórkowego CD274

CD28 (ang. cluster of differentiation 28) – antygen różnicowania komórkowego CD28

CD3 (ang. cluster of differentiation 3) – antygen różnicowania komórkowego CD3

CD34 (ang. cluster of differentiation 34) – antygen różnicowania komórkowego CD34

CD38 (ang. cluster of differentiation 38) – antygen różnicowania komórkowego CD38

CD4 (ang. cluster of differentiation 4) – antygen różnicowania komórkowego CD4

CD40 (ang. cluster of differentiation 40) – antygen różnicowania komórkowego CD40

CD44 (ang. cluster of differentiation 44) – antygen różnicowania komórkowego CD44

CD5 (ang. cluster of differentiation 5) – antygen różnicowania komórkowego CD5

CD55 (ang. cluster of differentiation 55) – antygen różnicowania komórkowego CD55

CD7 (ang. cluster of differentiation 7) – antygen różnicowania komórkowego CD7

CD72 (ang. cluster of differentiation 72) – antygen różnicowania komórkowego CD72

CD8 (ang. cluster of differentiation 8) – antygen różnicowania komórkowego CD8

CD82 (ang. cluster of differentiation 82) – antygen różnicowania komórkowego CD82

CD8A (ang. cluster of differentiation 8A) – antygen różnicowania komórkowego CD8A

CDK1 (ang. cyclin-dependent kinase 1) – cyklinozależna kinaza 1

CDK2AP2P2 (ang. cyclin dependent kinase 2 associated protein 2 pseudogene 2) – pseudogen 2 dla białka związanego z kinazami typu 2 zależnymi od cyklin 2

CDK5 (ang. cyclin-dependent kinase 5) – cyklinozależna kinaza 5

CDKN (ang. cyclin Dependent Kinase Inhibitor) – inhibitor kinaz zależnych od cyklin

CDKN2C (ang. cyclin Dependent Kinase Inhibitor 2C) – inhibitor kinazy cyklinozależnej 2C

CEP (ang. Centrosomal protein) – białko centrosomalne

CGI (ang. CpG islands) – wyspy CpG

CI (ang. Confidence Interval) – przedział ufności

CK5 (ang. cytokeratin 5) – cytokeratyna 5

CKS2 (ang. CDC28 Protein Kinase Regulatory Subunit 2) – podjednostka 2 kinazy regulatorowej białka CDC28

CLDN17 (ang. Claudin-17) – kładyna 17

CLDN3 (ang. Claudin-3) – kładyna 3

CLDN5 (ang. Claudin-5) – kładyna 5

CLDN6 (ang. Claudin-6) – kładyna 6

COL (ang. collagen) – kolagen

COL18A1 (ang. collagen type XVIII alpha 1 chain) – łańcuch alfa-1 kolagenu typu 18

COL2A1 (ang. collagen type II alpha 1 chain) – łańcuch alfa-1 kolagenu typu 2

COL6A1 (ang. collagen type VI alpha 1 chain) – łańcuch alfa-1 kolagenu typu 6

COL9A2 (ang. collagen type IX alpha 2 chain) – łańcuch alfa-2 kolagenu typu 9

Corf(ang. Chromosome open reading frame) – białko Corf (otwartej ramki odczytu)

CpG (ang. CpG site) – dinukleotyd CpG

CRABP1 (ang. Cellular Retinoic Acid Binding Protein 1) – białko wiążące komórkowy kwas retinowy

CRH (ang. corticotropin) – kortykoliberyna

CRHR1 (ang. corticotropin-releasing hormone receptor 1) – białko receptorowe uwalniające kortykotropinę

CSS (ang. clinical severity score) – wskaźnik ciężkości choroby (Gravesa i Basedowa)

CTBP2 (ang. C-terminal binding protein 2) – białko wiążące fragment C-końcowy typu 2

CTCF (ang. CCCTC-binding factor) – białko wiążące sekwencję CCCTC

CTLA-4 (ang. cytotoxic T-cell antigen 4) – antygen limfocytów cytotoksycznych typu 4

CXCL12 (ang. C-X-C motif chemokine ligand 12) – chemokina z motywem CXC typu 12

CXCL16 (ang. C-X-C motif chemokine ligand 16) – chemokina z motywem CXC typu 16

CXCR5 (ang. CXC chemokine receptor type 5) – receptor chemokiny CXC typu 5

CYP (ang. Cytochrome P450) – cytochrom P450

CYP1A1 (ang. Cytochrome P450A1) – białko cytochromu P450 A1

CYP26A1 (ang. Cytochrome P45026A1) – białko cytochromu P450 26A1

DCs (ang. dendritic cells DCs) – komórki dendrytyczne

DGCR6 (ang. DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 6) – związane z zespołem DiGeorge’a białko typu 6

DGKH (ang. Diacylglycerol Kinase Eta) – kinaza diacyloglicerolu

DHX32 (ang. DEAH Asp-Glu-Ala-His box polypeptide 32) – DEAH-box helikaza typu 32

DIABLO (ang. DIABLO homolog) – białko mitochondrialne DIABLO

DICER1 (ang. endoribonuclease DICER1) – enzym DICER1 (również rybonukleaza typu III)

DLX1 (ang. Homeobox protein DLX-1) – białko DLX1

DMC (ang. differentially methylated cytosine) – odmiennie zmetylowana cytozyna

DMG (ang. differentially methylated gene) – odmiennie zmetylowany gen/ metylowany gen ryzyka

DMR (ang. differentially methylated region) – odmiennie zmetylowany region DNA/ metylowany region DNA ryzyka

DMRTA2 (ang. DMRT Like Family A2) – białko DMRTA2

DMS (ang. differentially methylated site) – odmiennie zmetylowany dinukleotyd CpG/ metylowany dinukleotyd CpG ryzyka

DNA (ang. deoxyribonucleic acid) – kwas deoksyrybonukleinowy

DNAm (ang. DNA methylation) – metylacja DNA

DNMT (ang. DNA methyltransferase) – DNA-metylotransferaza

DNMT1 (ang. DNA methyltransferase-1) – DNA-metylotransferaza typu-1

DNMT-3A (ang. DNA methyltransferase-3a) – DNA-metylotransferaza-3A

DNMT-3B (ang. DNA methyltransferase-3b) – DNA-metylotransferaza-3B

DNMT-3L (ang. DNA methyltransferase-3l) – DNA-metylotransferaza-3L

DON (ang. dysthyroid optic neuropathy) – neuropatia nerwu wzrokowego

DPH3P1 (ang. diphthamide biosynthesis 3 pseudogene 1) – pseudogen typu 1 biosyntezy diftamidu 3

DRD2 (ang. dopamine receptor D2) – receptor dopaminowy D2

DRD4 (ang. dopamine receptor D4) – receptor dopaminowy D4

EBV (ang. Epstein–Barr virus) – wirus Epsteina-Barr

ECM (ang. extracellular matrix) – macierz zewnątrzkomórkowa

EDTA (ang. ethylenediaminetetraacetic acid) – kwas etylenodiaminotetraoctowy

EFCAB1 (ang. EF-hand calcium binding domain 1) – białko z domeną wiążącą wapń EF

EGFR (ang. epidermal growth factor receptor) – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu

ELFN1 (ang. Extracellular Leucine Rich Repeat And Fibronectin Type III Domain Containing 1) – białko zewnątrzkomórkowe bogate w leucynę i zawierające domenę fibronektyny typu (III) typu 1

ELISA (ang. enzyme-linked immunosorbent assay) – test immunoenzymatyczny

ELOVL1 (ang. ELOVL fatty acid elongase 1) – elongaza długołańcuchowych kwasów tłuszczowych typu 1

ELOVL4 (ang. ELOVL fatty acid elongase 4) – elongaza długołańcuchowych kwasów tłuszczowych typu 4

ERK (ang. extracellular signal-regulated kinases) – kinazy ERK

ETA (ang. European Thyroid Association) – Europejskie Towarzystwo Tyreologiczne

EUGOGO (ang. European Group on Graves' Orbitopathy) – Europejską Grupą ds. Orbitopatii Tarczycowej

EZH2 (ang. enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit) – metylotransferaza EZH2

FAF (ang. FAS-associated factor) – czynnik związany z FAS

FANK1 (ang. Fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains protein 1) – białko 1 z domenami fibronektyny typu III i ankiryiny

Fc (ang. Fc receptor) – receptor Fc

FCGRT (ang. Fc gamma receptor and transporter) – receptor transportowy fragment Fc IgG

FCRLB (ang. Fc receptor like B) – białko podobne do receptora Fc typu B

FDR (ang. false discovery rate) – spodziewany odsetek wyników fałszywie dodatnich

FGF (ang. fibroblast growth factor) – czynnik wzrostu fibroblastów

FGF6 (ang. fibroblast growth factor 6) – czynnik wzrostu fibroblastów 6

FGFR (ang. fibroblast growth factor receptor) – receptor dla czynnika wzrostu fibroblastów

FGFR1 (ang. fibroblast growth factor receptor 1) – receptor typu 1 dla czynnika wzrostu fibroblastów

fMC (ang. fetal microchimerism) – mikrochimerizm płodowy

FOXC1 (ang. forkhead box C1) – czynnik transkrypcyjny FOXC1

FOXD1 (ang. forkhead box D1) – czynnik transkrypcyjny FOXD1

FOXO3 (ang. forkhead box O3) – czynnik transkrypcyjny FOXO3

FOXP1 (ang. forkhead box P1) – czynnik transkrypcyjny FOXP1

FOXP2 (ang. forkhead box P2) – czynnik transkrypcyjny FOXP2

FOXP3 (ang. forkhead box P3) – czynnik transkrypcyjny FOXP3

ft3 (ang. free triiodothyronine) – wolna trijodotyronina

ft4 (ang. free thyroxine) – wolna tyroksyna

FU (ang. fluorescent units) – jednostki fluorescencyjne

G (ang. guanine) – guanina

GATA (ang. GATA transcription factor) – czynnik transkrypcyjny GATA

GATA2 (ang. GATA transcription factor 2) – czynnik transkrypcyjny GATA2

GATA5 (ang. GATA transcription factor 5) – czynnik transkrypcyjny GATA5

GCS (ang. glucocorticoids) – glikokortykosteroidy

GD (ang. Graves' disease) – choroba Gravesa i Basedowa

GDF (ang. Growth differentiation factor) – czynnik wzrostu GDF

GDNF (ang. Glial cell line-derived neurotrophic factor) – czynnik neurotroficzny komórek glejowych

GeneO (ang. Gene Ontology) – baza ontologiczna (uwaga: typowy skrót bazy ontologicznej „GO” został przeznaczony dla orbitopatii tarczycowej)

GLI2 (ang. GLI family zinc finger 2) – białko z motywem palca cynkowego z rodziny GLI2

GLI3 (ang. GLI family zinc finger 3) – białko z motywem palca cynkowego z rodziny GLI3

GNAS (ang. guanine nucleotide binding protein alpha subunit) – podjednostka alfa białka wiążącego nukleotydy zawierający guaninę

GNAS-AS1 (ang. guanine nucleotide binding protein alpha subunit antisense RNA) – lincRNA antysensowny dla podjednostki alfa stymulującego białka G wiążącego nukleotydy

GO (ang. Graves' orbitopathy) – orbitopatia tarczycowa (Gravesa)

GOLT1A (ang. Golgi Transport 1A) – białko transportowe Aparatu Golgiego 1A

GREAT (ang. Graves' Recurrent Events After Therapy) – wskaźnik ryzyka nawrotu choroby (Gravesa i Basedowa) po terapii

GRM1 (ang. metabotropic glutamate receptor 1) – receptor metabotropowy glutaminianu 1

GRM2 (ang. metabotropic glutamate receptor 2) – receptor metabotropowy glutaminianu 2

GTP (ang. guanosine-5'-triphosphate) – guanozyno-5'-trifosforan

GTP-aza (ang. GTP-ase) – enzym hydrolizujący GTP

GTPBP8 (ang. GTP Binding Protein 8) – białko wiążące GTP typu 8

GWAS (ang. genome wide association study) – całogenomowe badanie asocjacyjne

H3F3AP6 (ang. H3 histone, family 3A, pseudogene 6) – pseudogen 6 histonu H3 z rodziny 3A

HAND1 (ang. eart and neural crest-derived transcript-1) – białko HAND1

HC (ang. healthy controls) – zdrowe kontrole

HCG (ang. high CpG content) – regiony promotorowe o wysokiej zawartości miejsc metylacji CpG

HCP5 (ang. HLA Complex P5) – białko typu 5 kompleksu zgodności tkankowej

HCV (ang. hepatitis C virus) – wirus zapalenia wątroby typu C

HDAC (ang. histone deacetylase) – deacetylaza histonowa

HDAC1 (ang. histone deacetylase 1) – deacetylaza histonowa 1

HDAC2 (ang. histone deacetylase 2) – deacetylaza histonowa 2

HES2 (ang. es Family BHLH Transcription Factor 2) – czynnik transkrypcyjny HES2

HGNC (ang. HUGO Gene Nomenclature Committee) – nomenklatura genów człowieka

HIVP3 (ang. Human Immunodeficiency Virus Type I Enhancer Binding Protein 3) – czynnik transkrypcyjny wirusa HIVP3

HLA (ang. human leukocyte antigen gene) – gen antygenu zgodności tkankowej

HLA-A (ang. human leukocyte antigen-A) – antygen zgodności tkankowej A

HLA-AS1 (ang. human leukocyte antigen-A antisense RNA) – antysensowne RNA dla antygenu zgodności tkankowej typu A

HLA-C (ang. human leukocyte antigen-C) – antygen zgodności tkankowej typu C

HLA-DPA1 (ang. human leukocyte antigen-DPA1) – antygen zgodności tkankowej typu DPA1

HMG (ang. high methylation gene) – gen z wysokim odsetkiem metylacji DNA

HMX1 (ang. H6 Family Homeobox 1) – czynnik transkrypcyjny HMX1

HMX2 (ang. H6 Family Homeobox 2) – czynnik transkrypcyjny HMX2

HOXD4 (ang. Homeobox D4) – czynnik transkrypcyjny HOXD4

HOXD8 (ang. Homeobox D8) – czynnik transkrypcyjny HOXD8

HPV (ang. Human Papillomavirus) – wirus brodawczaka ludzkiego

HSBP1 (ang. heat shock factor protein binding 1) – białko wiążące czynnik szoku cieplnego typu 1

HT (ang. Hashimoto thyroiditis) – choroba Hashimoto

ICAM-1 (ang. intercellular adhesion molecule 1) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-1

ICAM-3 (ang. intercellular adhesion molecule 3) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-3

ICAM-5 (ang. intercellular adhesion molecule 5) – międzykomórkowa cząsteczka adhezyjna-5

ICG (ang. intermediate CpG content) – regiony promotorowe o średniej zawartości miejsc metylacji CpG

IFNAR1 (ang. interferone-alpha/beta receptor alpha chain) – łańcuch alfa receptora interferonu alfa/beta

IFN-gamma (ang. interferon gamma) – interferon gamma

iGD (ang. intractable Graves' Disease) – Choroba Gravesa i Basedowa oporna w leczeniu

IGF-1 (ang. insulin-like growth factor-1) – insulinopodobny czynnik wzrostu-1

IGF-1R (ang. insulin-like growth factor-1 receptor) – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu-1

IGFBP3 (ang. insulin-like growth factor-binding protein 3) – białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 3

IGHG1 (ang. Ig gamma-1 chain C region) – białko regionu C łańcucha Ig gamma typu 1

IL-10 – (ang. interleukin 10) interleukina 10

IL-12RB1 (ang. interleukin 12 receptor subunit beta-1) – podjednostka beta-1 receptora interleukiny 12

IL17RD (ang. interleukin 17 receptor D) – receptor D dla interleukiny 17

IL17RE (ang. interleukin 17 receptor E) – receptor E dla interleukiny 17

IL17REL (ang. interleukin 17 receptor E-like) – białko podobne do receptora E dla interleukiny 17

IL-1A (ang. interleukin 1 alfa subunit) – interleukina 1A

IL-1B (ang. interleukin 1 beta subunit) – podjednostka beta interleukiny 1

IL-1RA (ang. interleukin 1 receptor subunit alpha) – podjednostka alfa receptora dla interleukiny 1

IL-2 (ang. interleukin 2) – interleukina 2

IL-2RA (ang. interleukin 2 receptor subunit alpha) – podjednostka alfa receptora dla interleukiny 2

IL-6 (ang. interleukin 6) – interleukina 6

IL-6R (ang. interleukin 6 Receptor) – receptor dla interleukiny 6

INHBB (ang. inhibin, beta B) – podjednostka beta B inhibiny

INSR (ang. insulin receptor) – receptor dla insuliny

IQR (ang. interquartile range) – zakres międzykwartylowy

IRAK3 (ang. interleukin-1 receptor-associated kinase 3) – kinaza związana z receptorem interleukiny-1

IRF (ang. Interferon regulatory factor) – czynnik regulujący interferon

IRS2 (ang. insulin receptor substrate 2) – związane z receptorem insuliny białko typu 2

IRS4 (ang. insulin receptor substrate 4) – związane z receptorem insuliny białko typu 4

IRX3 (ang. Iroquois Homeobox 3) – białko IRX3

ITGA4 (ang. integrin-alfa superfamily member 4) – integryna alfa typu 4

ITGA6 (ang. integrin-alfa superfamily member 6) – integryna alfa typu 6

ITGB (ang. integrin-beta superfamily member) – integryna-beta

iv (ang. intravenous) – dożylny

JAK2 (ang. Janus kinase 2) – kinaza janusowa JAK2

KCN (ang. potassium channel) – kanał potasowy KCN

KCNJ5 (ang. potassium inwardly rectifying channel subfamily J member 15) – kanał potasowy KCNJ5

KEGG (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) – baza ontologiczna (genów genomów) Kioto

KLF9 (ang. Krueppel-like factor 9) – czynnik transkrypcyjny KLF-9

KPRP (ang. keratinocyte proline rich protein) – bogate w prolinę białko keratynocytów

KRTAP13-1 (ang. keratin associated protein 13-1) – białko związane z keratyną 13-1

LCG (ang. low CpG content) – regiony promotorowe o niskiej zawartości miejsc metylacji CpG

LCK (ang. Tyrosin-protein kinase Lck) – kinaza tyrozynowa z rodziny Src

LC-MS/MS (ang. liquid chromatography tandem-mass spectrometer) – chromatografia cieczowa połączona z tandemową spektrometrią mas

LDLR (ang. low density lipoprotein receptor) – receptor lipoprotein o niskiej gęstości

LEF1 (ang. Lymphoid enhancer-binding factor 1) – czynnik wiążący wzmacniacz limfoidalny 1

LIF (ang. Leukemia Inhibitory Factor) – białko hamujące białaczkę

LIM2 (ang. lens intrinsic membrane protein 2) – białko typu 2 wewnętrznej błony soczewki

LINC (ang. lincRNA) – długi niekodujący RNA

LINC00472 (ang. lincRNA472) – długi niekodujący RNA 472

LLGL2 (ang. LLGL Scribble Cell Polarity Complex Component 2) – białko LLGL2

LMG (ang. low methylation gene) – gen z niskim odsetkiem metylacji DNA

LMO4 (ang. LIM Domain Only 4) – czynnik transkrypcyjny z domeną LIM

LOXL3 (ang. Lysyl Oxidase Like 3) – oksydaza lizylowa typu 3

LRCOL1 (ang. leucine rich colipase like 1) – kolipaza bogata w leucynę typu 1

LRRC31 (ang. Leucine rich repeat containing 31) – białko bogate w powtórzenia leucyny typu 31

LSO (ang. lymphocyte-specific open chromatin domains) – interakcje specyficznych-otwartych domen chromatyny limfocytów

LTA (ang. Lymphotoxin Alpha) – limfotoksyna A

LTB (ang. Lymphotoxin Beta) – limfotoksyna B

LTK (ang. Leukocyte Receptor Tyrosine Kinase) – kinaza tyrozynowa receptora leukocytów

LYAR (ang. Ly-1 antibody reactive clone) – białko jądrowe regulujące wzrost komórkowy

LYL1 (ang. L YL1 Basic Helix-Loop-Helix Family Member) – białko LYL1

LYPD3 (ang. LY6/PLAUR Domain Containing 3) – białko zawierające domenę LY6/PLAUR typu 3

MAD1L1 (ang. mitotic arrest deficient 1 like 1) – białko punktu kontrolnego składania wrzeciona mitotycznego MAD1

MAFK (ang. MAF BZIP Transcription Factor K) – czynnik transkrypcyjny MAFK

MAGI3 (ang. Membrane-associated guanylate kinase WW and PDZ domain-containing protein 3) – związana z błoną komórkową cyklaza guanylowa zawierająca domeny WW i PDZ typu 3

MAP2K3 (ang. Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase 3) – kinaza-3 kinazy aktywowanej mitogenami (również MKK3)

MAPK (ang. Mitogen-Activated Protein Kinase) – kinazy aktywowane mitogenami

MBD-seq (ang. methylated DNA binding domain sequencing) – technika sekwencjonowania kwasów nukleinowych oparta na wiązaniu DNA z domenami bogatymi w CpG

MBP (ang. methyl-binding protein) – białko wiążące CpG

MDGA1 (ang. MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 1) – białko MDGA1

MDGA2 (ang. MAM domain-containing glycosylphosphatidylinositol anchor protein 2) – białko MDGA2

mdn (ang. median) – mediana

MDS2 (ang. Myelodysplastic Syndrome 2 Translocation Associated) – lncRNA związane z zespołem mielodysplastycznym i translokacją

MECP2 (ang. methyl-CpG-binding protein 2) – białko wiążące metylo-CpG 2

MEDIP (ang. methylated DNA immunoprecipitation) – technika immunoprecypitacji metylowanego DNA

METRNL (ang. Meteorin-like protein) – miokina METRNL

METTL10 (ang. methyltransferase-Like Protein 10) – metylotransferaza METTL10

MHC (ang. major histocompatibility complex) – główny układ zgodności tkankowej

mHT (ang. mild Hashimoto thyroiditis) – łagodna choroba Hashimoto

MICA (ang. MHC Class I Polypeptide-Related Sequence A) – sekwencja A związana z MHC klasy I

MICALL2 (ang. MICAL Like 2) – białko podobne do MICAL typu 2

MIF (ang. Macrophage Migration Inhibitory Factor) – czynnik hamujący migrację makrofagów

MIR (ang. microRNA) – miRNA

MIR146B (ang. microRNA 146b) – miRNA 146B

MIR152 (ang. microRNA 152) – miRNA 152

miRNA (ang. micro ribonucleic acid) – mikroRNA

MLF2 (ang. Myeloid Leukemia Factor 2) – czynnik białaczki szpikowej 2

MMI (ang. methimazole) – metimazol

MMP (ang. metalloproteinase) – metaloproteinaza

MMP14 (ang. metalloproteinase-14) – metaloproteinaza 14

MP (ang. methylprednisolone) – metyloprednizolon

MSP (ang. methylation-specific polymerase chain reaction) – łańcuchowa reakcja polimerazy specyficzna dla metylacji

MSX1 (ang. msh homeobox 1) – białko MSX1

MTHFR (ang. methylenetetrahydrofolate reductase) – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa

MTOR (ang. Mammalian Target Of Rapamycin Kinase) – kinaza treoninowo-serynowa mTOR

MTRR (ang. methionine synthase reductase) – reduktaza syntazy metioniny

MUC20 (ang. Mucin-20) – mucyna 20

MUC5AC (ang. Mucin-5AC) – mucyna 5AC

MUC6 (ang. Mucin-6) – mucyna 6

MYOD1 (ang. myoblast determination protein 1) – czynnik transkrypcyjny MYOD 1

n (ang. numer of participants) – liczba uczestników

NCL (ang. nucleolin) – nukleolina

NCSTN (ang. nicastrin) – nikastryna

NDUFA4L2 (ang. NDUFA4 Mitochondrial Complex Associated Like 2) – białko związane z kompleksem mitochondrialnym NDUFA4 typu 2

NEXN (ang. nexilin) – neksilina

NFKB1 (ang. Nuclear Factor Kappa-B DNA Binding Subunit1) – podjednostka 1 jądrowego czynnika transkrypcyjnego Kappa B

NFRKB (ang. Nuclear Factor Related To KappaB Binding Protein) – białko wiążące czynnik jądrowy związany z KappaB

nGD (ang. not classified Graves' diseases) – niesklasyfikowana choroba Gravesa i Basedowa

nGO (ang. non-active Graves' orbitopathy) – nieaktywna orbitopatia tarczycowa (Gravesa)

NGS (ang. next generation sequencing) – sekwencjonowanie nowej generacji

nHT (ang. not classified Hashimoto thyroiditis) – niesklasyfikowana choroba Hashimoto

NKD-2 (ang. naked cuticle homolog 2) – białko naskórka 2

NKs (ang. natural killers, lymphocytes) – limfocyty NK

NKX6-3 (ang. NK6 Homeobox 3) – czynnik transkrypcyjny NKX6-3

NNAT (ang. neuronatin) – neuronatyna

NR (ang. non-responsive group) – grupa bez odpowiedzi na leczenie glikokortykosteroidami dożylnymi

NUDT14 (ang. Nudix hydrolase 14) – hydrolaza Nudix typu 14

ONECUT1 (ang. one cut homeobox 1) – białko ONECUT1

OR (ang. odds ratio) – iloraz szans

OR2AD1P (ang. Olfactory Receptor Family 2 Subfamily AD Member 1 Pseudogene) – pseudogen dla receptora węchowego z rodziny 2 (AD) typu 1

ORTH (ang. orbital radiotherapy) – radioterapia oczodołów

OSM (ang. Oncostatin M) – onkostatyna M

OSR1 (ang. Odd-Skipped Related Transcription Factor 1) – czynnik transkrypcyjny OSR1

OTP (ang. Orthopedia Homeobox Protein) – czynnik transkrypcyjny OTP

P (ang. p value) – istotność statystyczna

P1 (ang. Project-point no.1) – punkt 1. Projektu 1.

P2 (ang. Project-point no.2) – punkt 2. Projektu 1.

p53 (ang. tumor supressor p53) – białko supresujące rozwój nowotworu/czynnik transkrypcyjny p53

PAX (ang. paired box protein) – czynnik transkrypcyjny PAX

PAX2 (ang. paired box protein 2) – czynnik transkrypcyjny PAX2

PAX3 (ang. paired box protein 3) – czynnik transkrypcyjny PAX3

PAX5 (ang. paired box protein 5) – czynnik transkrypcyjny PAX5

PAX7 (ang. paired box protein 7) – czynnik transkrypcyjny PAX7

PC (ang. principal component) – główny komponent składowy

PC1 (ang. principal component 1) – główny komponent składowy 1

PC2 (ang. principal component 2) – główny komponent składowy 2

PCA (ang. principal component analysis) – analiza komponentów składowych

PCR (ang. polymerase chain reaction) – łańcuchowa reakcja polimerazy

PCSK6 (ang. proprotein convertase subtilisin/kexin type 6) – konwertaza probiałkowa typu 6

PDGFB (ang. Platelet-Derived Growth Factor subunit B) – podjednostka beta dla płytkopochodnego czynnika wzrostu

PDGFRA (ang. Platelet-Derived Growth Factor receptor subunit alfa) – podjednostka alfa receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu

PGD (ang. pediatric Graves' Disease) – dzieci z chorobą Gravesa i Basedowa

PHF (ang. PHD finger protein) – białko PHF

PI3K-Akt (ang. phosphoinositide 3-kinase-Protein Kinase B) – szlak kinazy 3-fosfatydyloinozytolu i kinazy białkowej AKT

PIK3CB (ang. phosphatidylinositol-45-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit beta isoform) – katalityczna podjednostka beta kinazy fosfatydyloinozytolo-45-bisfosfonianu typu 3

POMT2 (ang. Protein O-mannosyl-transferase 2) – O-mannozylotransferaza typu 2

POTEB (ang. POTE ankyrin domain family, member B) – ankiryne z domeną POTE typu B

PPARA (ang. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor alpha) – receptor aktywowany proliferatorami peroksysomów alfa

PPI (protein-protein interaction analysis) – analiza funkcjonalna białek

PRDM13 (ang. PR Domain-Containing Protein 13) – białko z domeną PR typu 13

PRDM14 (ang. PR Domain-Containing Protein 14) – białko z domeną PR typu 14

PRDM16 (ang. PR Domain-Containing Protein 16) – białko z domeną PR typu 16

PREDIGO (ang. predictive score for the development or progression of GO) – wskaźnik predykcyjny rozwoju lub progresji orbitopatii tarczycowej (Gravesa)

PRICKLE1 (ang. – Prickle Planar Cell Polarity Protein 1) – białko planarnej polarności komórek typu 1

PRKAA2_3 (ang. Protein Kinase AMP-Activated Catalytic Subunit Alpha 2) – katalityczna podjednostka alfa kinazy aktywowanej AMP

PTH (ang. parathormone) – parathormon

PTPN11 (ang. protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11) – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa-11

PTPN14 (ang. protein tyrosine phosphatase non-receptor type 14) – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa-14

PTPN22 (ang. protein tyrosine phosphatase non-receptor type 22) – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa-22

PTPN5 (ang. protein tyrosine phosphatase non-receptor type 5) – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa-5

PTPRA (ang. protein tyrosine phosphatase receptor type A) – receptor fosfatazy tyrozynowej typu A

PTPRU (ang. protein tyrosine phosphatase receptor type U) – receptor fosfatazy tyrozynowej typu U

PTU (ang. propylthiouracil) – propylotiouracyl

q (ang. q value) – istotność statystyczna po poprawce wielokrotnych porównań

QoL (ang. quality of life) – jakość życia

R (ang. response group) – grupa z odpowiedzią na leczenie glikokortykosteroidami dożylnymi

RAB18 (ang. Ras-Related Protein Rab-18) – GTP-aza RAB18

RAB8A (ang. Ras-Related Protein Rab-8A) – GTP-aza RAB8A

RAI (ang. radioiodine) – jod radioaktywny I¹³¹

RANBP9 (ang. RAN Binding Protein 9) – białko 9 wiążącego białko RAN

Rap1 (ang. Ras-related protein Rap-1) – związane z RAS białko typu 1

RAP1A (ang. Ras-related protein Rap-1A) – związane z RAS białko typu 1

RARA (ang. Retinoic Acid Receptor Alpha) – receptor alfa dla kwasu retinowego

RASA1 (ang. RAS p21 protein activator) – białko aktywujące RAS

RCOR2 (ang. REST corepressor 2) – korepresor REST typu 2

RFLP (ang. restriction fragment length polymorphism) – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych

rGD (ang. remission-Graves Disease) – choroba Gravesa i Basedowa w remisji

RIG-1 (ang. retinoic acid-inducible gene 1) – receptor cytozolowy RIG-1

RIN3 (ang. Ras And Rab Interactor 3) – interaktor Ras/Rab 3

RNA (ang. ribonucleic acid) – kwas rybonukleinowy

RND3 (ang. Rho Family GTPase 3) – GTP-aza 3 z rodziny Rho

RNU6-2 (ang. RNA, U6 small nuclear 2) – snRNA RNU6-2

RNU6-328P (ang. RNA, U6 small nuclear 328 pseudogene) – snRNA RNU6-328P

RPS9 (ang. Ribosomal Protein S9) – rybosomalne białko S9

RPSAP4 (ang. Ribosomal Protein SA Pseudogene 4) – pseudogen typu 4 dla rybosomalnego białka SA

RRBS (ang. reduced representation bisulfite sequencing) – zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe

RTA (ang. Real Time Analysis) – analiza czasu rzeczywistego

RT-PCR (ang. reverse-transcription polymerase chain reaction) – reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym

RYR3 (ang. Ryanodine receptor 3) – receptor rianodynowy typu 3

S100A10 (ang. S100 calcium-binding protein A10) – białko wiążące wapń S100A10

S100A11 (ang. S100 calcium-binding protein A11) – białko wiążące wapń S100A11

S100A2 (ang. S100 calcium-binding protein A2) – białko wiążące wapń S100A2

SAM (ang. s-adenylomethionine) – S-adenylometionina

SCAMP1 (ang. Secretory Carrier Membrane Protein 1) – białko błonowe SCAMP1

SCAND1 (ang. SCAN box domain-containing protein 1) – białko SCAND1

SCAP (ang. SREBP cleavage-activating protein) – białko aktywujące hydrolizę SREBP (również: chaperon SREBP)

SCGB1D4 (ang. Secretoglobin Family 1D Member 4) – sekretoglobulina rodziny B1 typu D4

SCGB3A2 (ang. secretoglobin family 3A member 2) – sekretoglobulina 2 z rodziny 3A

SCN3B (ang. Sodium channel subunit beta-3) – podjednostka beta 3 kanału sodowego bramkowanego napięciem

SCN4B (ang. Sodium channel subunit beta-4) – podjednostka beta 4 kanału sodowego bramkowanego napięciem

SCN8A (ang. Sodium channel subunit alfa-8) – podjednostka alfa 8 kanału sodowego bramkowanego napięciem

sCTLA-4 (ang. soluble cytotoxic T cell antigen 4) – rozpuszczalny antygen limfocytów cytotoksycznych typu 4

SEPT3 (ang. septin-3) – septyna 3

SERPINA1 (ang. serpin family A member 1) – białko 1 z rodziny serpin A

SERPINE1 (ang. serpin family E member 1) – białko z rodziny serpin E1

sHT (ang. severe Hashimoto thyroiditis) – ciężka choroba Hashimoto

SIX1 (ang. SIX1 Homeobox protein) – czynnik transkrypcyjny SIX1

SIX2 (ang. SIX2 Homeobox protein) – czynnik transkrypcyjny SIX2

SLC (ang. Solute Carrier Family) – białko z rodziny SLC

SLC25A18 (ang. Solute Carrier Family 25 Member A18) – białko SLC25A18

SLC32A1 (ang. Solute Carrier Family 32 Member A1) – białko SLC32A1

SLC35D3 (ang. Solute Carrier Family 35 Member D3) – białko SLC35D3

SLC35E2B (ang. Solute Carrier Family 35 Member E2B) – białko SLC35E2B

SLC39A12 (ang. Solute Carrier Family 39 Member A12) – białko SLC39A12

SLC39A8 (ang. solute carrier family 39 member A8) – białko SLC39A8

SLC9C1 (ang. solute carrier family 9 member C1) – białko SLC9C1

SLF13 (ang. S-locus F-box-13) – białko SLF13

SMAD (ang. SMAD family member) – czynnik transkrypcyjny SMAD

SMAD4 (ang. SMAD family member 4) – czynnik transkrypcyjny SMAD4

SMOC2 (ang. SPARC-related modular calcium-binding protein 2) – białko SMOC2

SMPD1 (ang. sphingomyelin phosphodiesterase 1) – kwaśna sfingomielinaza

SNAI1 (ang. snail family transcriptional repressor 1) – białko SNAI1

SNAI3 (ang. snail family transcriptional repressor 3) – białko SNAI3

SNP (ang. single nucleotide polymorphism) – polimorfizm pojedynczego nukleotydu

snRNA (ang. small nuclear RNA) – mały jądrowy RNA

SRSF11 (ang. Serine And Arginine Rich Splicing Factor 11) – czynnik bogaty w serynę i argininę 11

STAT3 (ang. Signal Transducer and Activator of Transcription 3) – czynnik transkrypcyjny STAT3

SD (ang. standard deviation) – odchylenie standardowe

T (ang. thymine) – tymina

T1DM (ang. type 1 diabetes mellitus) – cukrzyca typu 1

TA-DMG – (ang. thyroid-associated orbitopathy-differentially methylated gene) – odmiennie zmetylowany gen/ metylowany gen ryzyka związany z orbitopatią tarczycową

TAGLN (ang. transgelin) – transgelina

TBII (ang. TSH-binding inhibitory immunoglobulins) – przeciwciała hamujące receptor dla tyreotropiny

TCR (ang. T-cell receptor) – receptor limfocytów T

Tet (ang. ten–eleven translocation) – oksygenaza metylocytozyny z rodziny Tet

TET2 (ang. ang. ten–eleven translocation-2) – oksygenaza z rodziny Tet typu 2

TFR2 (ang. transferrin receptor 2) – receptor transferyny typu 2

TG (ang. thyroglobulin) – tyreoglobulina

TGAb (ang. anti-thyroglobulin antibody) – przeciwciało przeciw tyreoglobulinie

TGF (ang. transforming growth factor) – transformujący czynnik wzrostu

TGFB1 (ang. transforming growth factor beta-1) – transformujący czynnik wzrostu (izoforma) beta-1

TGFB2 (ang. transforming growth factor beta-2) – transformujący czynnik wzrostu (izoforma) beta-2

TGF-beta (ang. transforming growth factor beta) – transformujący czynnik wzrostu beta

TGFR2 (ang. transforming growth factor beta receptor type 2) – receptor typu 2 dla transformującego czynnika wzrostu beta

Th (ang. lymphocyte T-helper) – limfocyt T pomocniczy

Th1 (ang. lymphocyte T-helper-1) – limfocyty pomocniczy Th1

Th17 (ang. lymphocyte T-helper-17) – limfocyt pomocniczy Th17

Th2 (ang. lymphocyte T-helper-2) – limfocyty pomocniczy Th2

THEM6 (ang. Thioesterase Superfamily Member 6) – tioesteraza typu 6

THSD7B (ang. Thrombospondin Type 1 Domain Containing 7B) – trombospondyna typu 1 zawierająca domenę typu 7B

TIMP4 (ang. Metalloproteinase inhibitor 4) – tkankowy inhibitor metaloproteinaz typu 4

TMEM (ang. transmembrane protein) – białko przezbłonowe

TMEM14C (ang. transmembrane protein 14C) – białko przezbłonowe 14C

TNF (ang. tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotowru

TNF-alfa (ang. tumor necrosis factor) – czynnik martwicy nowotoworu alfa

TNFRSF10B (ang. tumor necrosis factor receptor superfamily member 10B) – receptor śmierci 5 (również:DR5)

TNFRSF1B (ang. tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B) – receptor czynnika martwicy nowotowru TNFR2

TNFRSF25 (ang. tumor necrosis factor receptor superfamily member 25) – receptor czynnika martwicy nowotowru

TNNI3K (ang. serine/threonine-protein kinase TNNI3K) – kinaza serynowo-treoninowa TNNI3K

TNS3 (ang. tensin-3) – tensyna-3

TPO (ang. thyroid peroxidase) – tyreoperoksydaza

TPOAb (ang. anti-thyroid peroxidase antibody) – przeciwciało przeciw tyreoperoksydazie

TRAb (ang. thyrotropin receptor antibody) – przeciwciało przeciw receptorowi dla tyreotropiny

TRAF1 (ang.) – związany z receptorem dla TNF czynnik typu 1

TRIP4 (ang. thyroid hormone receptor interactor 4) – białko TRIP4

TRPV4 (ang. transient receptor potential cation channel subfamily V member 4) – kanał jonowy rodziny TRP typu 4

TSH (ang. thyroid stimulating hormone) – hormon tyreotropowy

TSH-R (ang. thyroid stimulating hormone receptor) – receptor dla hormonu tyreotropowego

TSI-Ab (ang. thyroid-stimulating immunoglobulins antibody) – przeciwciało stymulujące receptor tyreotropiny

TSPAN (ang. tetraspanin) – tetraspanina

TSPAN15 (ang. tetraspanin-15) – tetraspanina-15

UHRF (ang. ubiquitin-like with PHD and RING finger protein 1) – białko podobne do ubikwityny posiadające domeny PHD i RING

UTF1 (ang. Undifferentiated embryonic cell transcription factor 1) – czynnik transkrypcyjny UTF1

VEGFC (ang. Vascular endothelial growth factor C) – czynnik wzrostu śródbłónka naczyń typu C

WGBS (ang. whole genome bisulfite sequencing) – sekwencjonowanie bisulfitowe całego genomu

Wnt (ang. Wnt signaling pathway) – szlak sygnalizacyjny Wnt

WNT2 (ang. WNT2 protein) – białko WNT2

WZW C (ang. hepatitis type C) – wirus zapalenia wątroby typu C

XCI (ang. skewed X-chromosome inactivation) – skośna inaktywacja chromosomu X

ZC3H3 (ang. Zinc Finger CCCH-Type Containing 3) – białko z domeną palca cynkowego ZC3H3

ZC3H4 (ang. Zinc Finger CCCH-Type Containing 4) – białko z domeną palca cynkowego ZC3H4

ZCCHC (ang. zinc finger CCHC domain containing) – białko z motywem palca cynkowego i domeną CCHC

ZCCHC6 (ang. zinc finger CCHC domain containing 6) – białko z motywem palca cynkowego i domeną CCHC6

ZCCHC9 (ang. zinc finger CCHC domain containing 9) – białko z motywem palca cynkowego i domeną CCHC9

ZCF (ang. zinc-finger protein) – białko z motywem palca cynkowego

ZDHHC (ang. protein-cysteine S-palmitoyltransferase ZDHHC) – transferaza kwasu palmitynowego ZDHHC

ZFP (ang. ZFP Zinc Finger Protein) – białko z domeną palca cynkowego ZFP

ZFP37 (ang. ZFP37 Zinc Finger Protein) – białko z domeną palca cynkowego ZFP37

ZFP42 (ang. ZFP42 Zinc Finger Protein) – białko z domeną palca cynkowego ZFP42

ZGPAT (ang. Zinc Finger CCCH-Type And G-Patch Domain Containing) – białko z domeną palca cynkowego ZGPAT

ZIC4 (ang. Zinc finger of the cerebellum Member 4) – białko z domeną palca cynkowego ZIC4

ZIC5 (ang. Zinc finger of the cerebellum Member 5) – białko z domeną palca cynkowego ZIC5

ZMIZ (ang. Zinc Finger MIZ-Type) – białko z domeną palca cynkowego ZMIZ

ZMIZ1 (ang. Zinc Finger MIZ-Type Containing 1) – białko z domeną palca cynkowego ZMIZ1

ZNF (ang. zinc finger protein) – białko z domeną palca cynkowego

ZNF2 (ang. zinc finger protein 2) – białko z domeną palca cynkowego ZNF2

ZNF304 (ang. zinc finger protein 304) – białko z domeną palca cynkowego ZNF304

ZNF843 (ang. zinc finger protein 843) – białko z domeną palca cynkowego ZNF843

ZNF844 (ang. zinc finger protein 844) – białko z domeną palca cynkowego ZNF844

III Streszczenie w języku polskim: Zaburzenia metylacji całogenomowej w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u pacjentów z orbitopatią tarczycową w przebiegu choroby Gravesa i Basedowa, w trakcie leczenia dożylnymi pulsami glikokortykosteroidów

Choroba Gravesa i Basedowa (ang. Graves' disease, GD) jest autoimmunizacyjną chorobą tarczycy (ang. autoimmune thyroid disease, AITD), prowadzącą do nadczynności gruczołu. Etiopatogeneza i obraz kliniczny GD są uwarunkowane wieloma czynnikami – przede wszystkim wariantami genetycznymi, ale także środowiskowymi (w tym głównie paleniem tytoniu) i endogennymi (np. płcią żeńską). Jednocześnie, poznane czynniki genetyczne odpowiadają jedynie za ok. 10% spodziewanej podatności na zachorowanie, a zarówno kliniczne i genetyczne determinanty powodzenia leczenia GD pozostają nieznane. Terapia GD obejmuje leki przeciwtarczycowe (ang. anti-thyroid drugs, ATD) oraz leczenie radykalne (terapię radiojodem i tyreidektomię) i charakteryzuje się dużym odsetkiem niepowodzenia i nawrotu choroby, szczególnie w grupie dzieci.

Jednym z fenotypów GD jest orbitopatia tarczycowa (ang. Graves orbitopathy, GO), będąca najczęstszą pozatarczycową manifestacją GD. GO jest zespołem objawów ocznych wtórnych do procesów autoimmunizacyjnych w obrębie tkanek miękkich oczodołu, mogąca prowadzić do utraty wzroku. Występuje u ok. 30% chorych, ujawnia się w różnym czasie GD i jest szczególnie heterogenna w obrazie klinicznym a także związana z paleniem papierosów. W terapii aktywnej, umiarkowanej do ciężkiej GO kluczowe znaczenie, poza zaprzestaniem palenia, mają dożylnie pulsy glikokortykosteroidów (ang. intravenous glucocorticoids, ivGCS) oraz leczenie biologiczne.

Wobec modelu choroby wieloczynnikowej, wpływ innych czynników – epigenetycznych (np. metylacji), możliwie łączących genetyczne i środowiskowe przyczyny zachorowania, wydaje się wkręcać występowanie, przebieg i odpowiedź kliniczną na zastosowane leczenie w GD. W literaturze dostępne są obecnie wstępne doniesienia dotyczące zaburzeń metylacji kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. deoxyribonucleic acid methylation, DNAm) komórek krwi obwodowej w chorobach autoimmunizacyjnych, w tym w GD. Co interesujące, podkreślono występowanie hipometylacji w GD oraz wzrostu stopnia DNAm po przeprowadzeniu leczenia tyreostatykami oraz radiojodem. Ponadto, zwracało uwagę przedstawienie odmiennie zmetylowanych dinukleotydów CpG (ang. CpG sites) w regionach cytokin prozapalnych, cząsteczek adhezyjnych i uczestniczących w przekazaniu drugiego sygnału podczas prezentacji antygenów – ważnych elementów patofizjologicznych chorób autoimmunizacyjnych, również

dla patogenezy samej GD i GO. Wykazano też związek zaburzeń DNAm z nikotynizmem, co może mieć kluczowe znaczenie dla patofizjologii omawianych w rozprawie doktorskiej schorzeń tarczycy.

Cele dwóch Projektów tworzących niniejszą rozprawę doktorską obejmowały ocenę zaburzeń całogenomowej DNAm komórek krwi obwodowej u pacjentów i) z GO przed i w trakcie 12-tygodniowego leczenia pulsami ivGCS (metyloprednizolonem; Projekt Główny) wg protokołu Europejskiej Grupy ds. Orbitopatii tarczycowej (ang. European Group on Graves' Orbitopathy, EUGOGO) oraz ii) chorych ze świeżym rozpoznaniem GD, w zależności od wieku: dorosłych (ang. adult GD, AGD) i dzieci (ang. pediatric GD, PGD). W projektach został porównany obraz DNAm w grupie chorych i kontroli, a także zostały przeprowadzone analizy chorych z różną prezentacją kliniczną oraz poświęcone skuteczności leczenia.

W Projekcie 1. pobrano próbki krwi obwodowej do badań laboratoryjnych u wszystkich chorych z umiarkowaną do ciężkiej GO (n=24) w eutyreozie: przed rozpoczęciem leczenia ivGCS (punkt 1., P1) oraz następnie po zakończeniu protokołu 12 pulsów ivGCS (punkt 2., P2), zgodnie z aktualnymi zaleceniami grupy EUGOGO. Chorzy zostali podzieleni na grupy według odpowiedzi na leczenie (response, R, n=14 vs. no-response, NR, n=10). W Projekcie 2. wszyscy chorzy z GD pozostawali w hipertyreozie (AGD, n=12 oraz PGD, n=6) i nie byli leczeni przeciwtarczycowo przed włączeniem do badania. Zrekrutowano również dorosłych (ang. healthy controls, HC, n=7) i dzieci (pediatric healthy controls, pHC, n=5), bez chorób autoimmunizacyjnych oraz schorzeń tarczycy. Procedury laboratoryjne obejmowały stworzenie bibliotek (n=78) DNA bogatych w zmetylowane fragmenty oraz sekwencjonowanie nowej generacji - zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe (ang. reduced representation bisulfite sequencing, RRBS). Analizę wyników przeprowadzono z pomocą środowiska bioinformatycznego, stosując poprawkę dla wielokrotnych porównań oraz uwzględniając wzbogacenie funkcjonalne. Do analizy statystycznej włączono odmiennie zmetylowane cytozyny (stosunek 5-metyloctyozyna: cytozyna) odczytane co najmniej dziesięciokrotnie (10x), a stopień minimalnej różnicy w DNAm wynosił 25% (0,25).

W Projekcie 1. odnotowano wyraźną separację chorych z GO i zdrowych w analizie głównych komponentów składowych (principal component analysis, PCA), a także całogenomowe, hipometylowane wzorce osób chorych przed podjęciem leczenia ivGCS (P1). Wykazano zmiany grupowania próbek i wzorców DNAm po odbytych leczeniu chorych z GO (P2). Na poziomie pojedynczych, odmiennie zmetylowanych dinukleotydów CpG anotowanych na

regiony genowe, zidentyfikowano łącznie $n=2894$ istotnych DMRs (ang. differentially methylated regions), głównie hipometylowanych (99,17%), obejmujących mnogie *loci* układu transdukcji sygnału i odpowiedzi układu odpornościowego (m.in. *CD55*, *ICAM*, *TNFRSF1B*) oraz uczestniczących w patogenezie GD i GO (m.in. *IL-2RA*, *LOXL3*, *IL-6R*, *IGF1R*), a także inne przedstawione w literaturze (m.in. *DRD4*, *KLF9*). Pokazano także wzbogacenie licznych szlaków metabolicznych związanych z genami, na które zmapowano CpG, m.in. dojrzewania limfocytów, odpowiedzi układu immunologicznego, wzrostu i komunikacji komórek, a także rozwoju narządu wzroku. Po zastosowaniu terapii ivGCS uwidoczniło się istotne zmiany stopnia DNAm u chorych z osobna, jednak w skali grupy odpowiedź na leczenie nie była związana ze zmianą stopnia DNAm na poziomie wspólnych, pojedynczych CpG.

W Projekcie 2. również odnotowano dominującą hipometylację chorych z GD, w skali każdego z chromosomów autosomalnych oraz całogenomowych wzorców DNAm, a także wyraźne klastrowanie chorych w analizie PCA (uwidaczniając przy tym uwikłanie wpływu nikotynizmu). Zidentyfikowano $n=10700$ istotnych DMRs (99,58% hipometylowanych), a wśród nich *loci* uczestniczące w patogenezie AITD i GO (m.in. *IL2RA*, *IL6R*, *IGF1R*), transdukcji sygnału i odpowiedzi układu odpornościowego (m.in. *ICAM1*, *AIRE*, *STAT3*, *SMAD4*, *ALK*, *TNFRSF1B*, *CD5*, *CD7*, *CD8A*, *IL12RB1*), procesów apoptotycznych (*BCL2*) oraz epigenetycznych (*MIR146B*, *DNMT3B*, *EZH2*). Przeciwnie, różnica między DNAm dzieci zdrowych (pHC) i chorych (PGD) nie była wyraźna, zarówno w skali całogenomowej, jak i istotnych różnicujących DMRs ($n=18$; w tym: *TAGLN*, *ONECUT1*, *CALML5*, *NKX6-3*). Podobnie, chorzy dorośli i dzieci z GD różnili się istotnie na poziomie pojedynczych CpG (łącznie $n=29$ istotnych DMRs, w tym: *FANK1*, *GRM2*, *CDK2AP2P2*), a w analizie całogenomowych wzorców chorych z GD różnicował osobny czynnik – nikotynizm (a nie wiek). Wreszcie, wykazano wzbogacenie szlaków metabolicznych dla znalezionych DMRs grupy osób dorosłych ze świeżym rozpoznaniem GD. W analizie eksploratywnej chorzy dorośli-palący z GD prezentowali inne wzorce DNAm (dominująca hipermetylacja) od pacjentów niepalących (łącznie $n=2183$ istotnych DMRs).

Podsumowując, w projektach rozprawy doktorskiej wykazano, że pacjenci z GD oraz z GO prezentują odmienne wzorce DNAm i znamienne hipometylację DNA względem osób zdrowych, zarówno w ujęciu całogenomowym jak i na poziomie regionów związanych z licznymi procesami immunologicznymi, wzrostu i różnicowania komórek, a także stanu zapalnego. Dzieci z GD wykazują pojedyncze różnice stopnia DNAm na poziomie pojedynczych CpG, a ich całogenomowe wzorce DNAm są zbliżone do tych u niepalących

chorych dorosłych oraz nie różnią się wyraźnie od dzieci zdrowych. Wpływ terapii ivGCS w GO wyraża się w postaci zmiany wzorców i stopnia DNAm niezależnie od odpowiedzi na terapię. Z uwagi obecny stan wiedzy dotyczący natury procesu powstawania DNAm, jej zmienności i możliwej dwustronnej zależności od czynników genetycznych, endogennych i środowiskowych (szczególnie nikotynizmu), a także specyfiki oceny DNAm we wszystkich leukocytach krwi obwodowej oraz heterogenności obrazu klinicznego GO i GD, konieczne są kolejne, uzupełniające badania w tym polu.

IV Streszczenie w języku angielskim: The genome-wide DNA methylation pattern alterations in the peripheral mononuclear cells in Graves' disease patients and thyroid-associated orbitopathy treated with intravenous glucocorticoids

Graves' disease (GD) is a type of the autoimmune thyroid disease (AITD) leading to hyperthyroidism. Etiopathology and clinical view of GD are compound and multifactorial, while genetic variants occur in the first place, but also environmental (mainly smoking) and endogenous (female sex) ones contribute to it. Simultaneously, genetic variants explain only about 10% expected susceptibility to GD and both clinical and genetic determinants of therapy response still remain unknown. GD treatment includes anti-thyroid drugs (ATD), as well as radical one (radioiodine, thyroidectomy) and is characterized by frequent failure and relapse rate, especially in children.

Graves orbitopathy (GO) is a phenotype and the main extrathyroidal sign of GD. It is a syndrome secondary to autoimmune processes in orbital soft tissue and might lead to vision loss. GO is present in about 30% of all GD patients, it occurs at various disease's stage and is characterized by heterogeneity; as regards to its risk factors, smoking seems to be of great importance. In active, moderate-to-severe GO treatment, apart from cigarettes cessation, intravenous glucocorticoids (ivGCS) and biological agents play a vital role.

As multifactorial disease model makes clear, other factors – like epigenetics (e.g. methylation), might link to genetic and environmental ones, worsen course and therapy response in GD. In literature, there are initial reports focusing on deoxyribonucleic acid methylation (DNAm) alterations in peripheral blood in autoimmune diseases, including GD. Interestingly, both antithyroid drugs (ATD) and radioiodine therapy have been shown to cause DNAm restoration in newly-diagnosed GD patients with global hypomethylation at baseline. Moreover, aberrant DNAm patterns occur in cytokines', adhesive particles and second-signal agents *loci* – important autoimmune factor), including GD and GO themselves. The DNAm association with smoking has been addressed as well and it might be crucial for studied thyroid disorders' pathogenesis.

The aims of two projects involving this thesis included characterization of the genome-wide DNAm in peripheral blood cells in patients: i) with GO before and after 12 ivGCS pulses therapy (methylprednisolone; Main Project) according to EUGOGO and ii) newly diagnosed

GD individuals with different age of onset: adults (ang. adult GD, AGD) and children (ang. pediatric GD, PGD). In projects, we analysed the DNAm patterns in patients and controls, as well as in patients stratified by clinical view and according to treatment effects.

In Project no.1., the peripheral whole blood was taken in euthyroid patients with moderate-to-severe GO (n=24): before (point no. 1., P1) ivGCS and then post 12 ivGCS pulses (point no. 2., P2) in line with EUGOGO protocol. Patients were divided into two groups in accordance with treatment response (response, R, n=14 vs. no-response, NR, n=10). In Project no. 2. all GD individuals were hyperthyroid (AGD, n=12 oraz PGD, n=6) and with no prior history of antithyroid therapy. Controls were also recruited for AGD (ang. healthy controls, HC, n=7) and PGD (pediatric healthy controls, pHc, n=5) with no autoimmune and thyroid disorders. Laboratory methods included DNA (methyl-rich fragments) libraries preparation (n=78) and also next generation sequencing – reduced representation bisulfite sequencing (RRBS). Analyses were performed with bioinformatics environment using multiple comparison correction and with functional enrichment annotation being included. Differentially methylated cytosines with a minimum read threshold of 10 and DNAm (5-methylcytosine:cytosine ratio) difference of 25% (0,25) were taken to further statistics.

We noted evident GO and HC samples separation in Project no.1 in principal component analysis (PCA), as well as genome-wide hypomethylated patterns in patients prior to treatment with ivGCS (P1). We showed change in samples' clustering and DNAm patterns after ivGCS therapy (P2). Moreover, on site-specific level, we identified a total of 2894 significant CpG (mainly hypomethylated – 99,17%) involving numerous *loci* including immune signal transduction and response (*CD55*, *ICAM*, *TNFRS1B*), these accompanying GD and GO pathogenesis (*IL-2RA*, *LOXL3*, *IL-6R*, *IGFRI*) and other, recently reviewed in literature (*DRD4*, *KLF9*). There were also many enrichment pathways shown basing on annotated CpGs, among others: lymphocytes maturation, immune response, cell growth and communication, as well as eye embryogenesis. Significant DNAm changes were shown to individual patient after ivGCS usage (P2), but for a whole GO group response to the treatment was not associated with DNAm on site specific level.

As for Project no.2, we noted dominance of hypomethylation in GD patients in few fields: both globally, based on each chromosome DNAm difference and for genome-wide patterns, as well as evident clustering of the probes (with smoking as a cofounder). A total of 10700 significant

DMRs (99,58% being hypomethylated) were detected, including AITD- and GO-connected (*IL2RA*, *IL6R*, *IGFR1*), immune signal transduction and response (*ICAM1*, *AIRE*, *STAT3*, *SMAD4*, *ALK*, *TNFRSF1B*, *CD5*, *CD7*, *CD8A*, *IL12RB1*), apoptosis (*BCL2*) and epigenetics-related ones (*MIR146B*, *DNMT3B*, *EZH2*). Conversely, DNAm difference in pediatric patients (PDG) and controls (pHC) was not evident, both in genome-wide scale and site specific significant positions (n=18; e.g. *TAGLN*, *ONECUT1*, *CALML5*, *NKX6-3*). Similarly, adult and pediatric GD patients did not robustly differ in case of site-specific DNAm (n=29 significant DMRs, among others: *FANK1*, *GRM2*, *CDK2AP2P2*), while in genome-wide analysis – smoking (but not age) served as additional factor and differentiated studied groups. Finally, we showed functional enrichment of pathways matched with found DMRs in newly diagnosed adults with GD. Moreover, smoking-AGD individuals different DNAm patterns (dominant hypermethylation) than non-smokers (a total of n=2183 significant DMRs).

In conclusion, in this doctoral thesis we showed that patients with GD and GO present with different DNAm patterns and significant DNA hypomethylation in comparison with healthy subjects; the effect was observed both in genome-wide scale and on site-specific level: immune system, cell growth and differentiation, as well as inflammation. Children with GD present a few DMRs, while global patterns do not differ robustly with healthy children and look similar to non-smoking AGD individuals. DNAm level change is associated with ivGCS treatment, but is irrelevant to therapy response. Taking into account numerous issues: current knowledge comprising DNAm nature, molecular formation, as well as its dynamics and two-sided influence of genetics, environment and endogenous factors, which all being accompanied by DNAm laboratory assessment and GD heterogeneity, further studies in the field are necessary.

V Wstęp

V.1. Definicja i epidemiologia choroby Gravesa i Basedowa

Choroba Gravesa i Basedowa (ang. Graves' disease, GD) jest schorzeniem wchodzącym w skład grupy autoimmunizacyjnych chorób tarczycy (ang. autoimmune thyroid disease, AITD) [1]. GD stanowi najczęstszą przyczynę nadczynności tarczycy (ok. 70%) w krajach o wystarczającej podaży jodu, a jej ogólna zapadalność wynosi 20–50 przypadków/100 000 osób/rok [2-5]. GD występuje kilkakrotnie częściej u kobiet, ze szczytem wieku zapadalności w 30-60 r.ż. [6-8]. W patogenezie GD biorą udział autoreaktywne limfocyty: ko-stymulujące oraz te wytwarzające autoprzeciwciała skierowane przeciw receptorowi dla hormonu tyreotropowego (ang. thyroid stimulating hormon, TSH), w konsekwencji aktywując ten receptor (ang. thyroid stimulating hormon-receptor, TSH-R) i prowadząc do nadmiernego wyrzutu wolnych hormonów tarczycy z gruczołu [9-11].

V.2. Etiopatogeneza choroby Gravesa i Basedowa

GD jest uwarunkowana wieloma, najpewniej interferującymi między sobą czynnikami [12]. Obecnie podkreśla się współwystępowanie czynników genetycznych, środowiskowych, endogennych i epigenetycznych, potencjalnie wikłających patogenezę, ostateczny obraz kliniczny i przebieg różnych postaci GD (Rycina 1.) [13-15].

V.2.1. Czynniki genetyczne choroby Gravesa i Basedowa

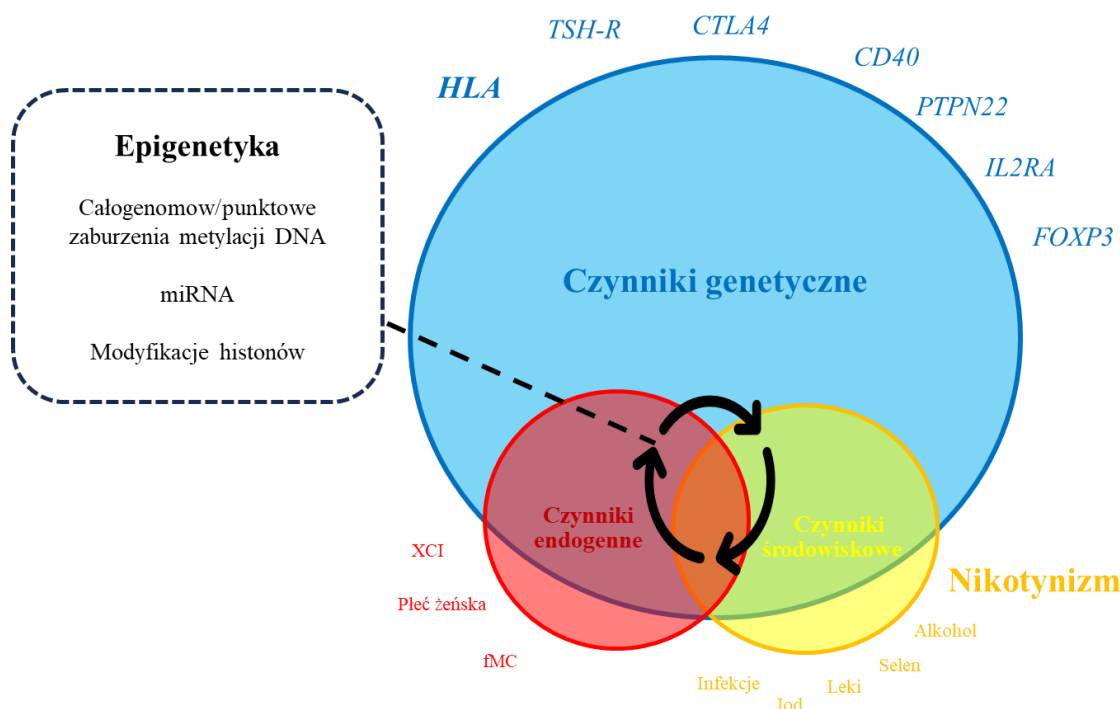
W literaturze dostępne są dane o predyspozycji genetycznej jako głównej przyczynie zachorowania na GD (możliwe nawet ok. 80% podatności) [16-17]. Szczególną uwagę zwraca się na udział polimorfizmów genetycznych głównego układu zgodności tkankowej (ang. major histocompatibility complex, MHC) – układu HLA (ang. human leukocyte antigen), a także innych, m.in. genów związanych z fizjologią gruczołu tarczowego czy cząsteczek odpowiedzi immunologicznej, ze szczególnym uwzględnieniem mechanizmów limfocytów pomocniczych [16]. Wśród nich, na podstawie badań kohortowych i dużych badań asocjacyjnych (ang. genome-wide association studies, GWAS) należy wymienić w pierwszej kolejności warianty genów: *TSH-R*, niereceptorowej fosfatazy tyrozynowej-22 (ang. protein tyrosine phosphatase-22, PTPN22), antygenu limfocytów cytotoksycznych typu 4 (cytotoxic T-cell antigen 4, CTLA-4), czynnika transkrypcyjnego *foxp3* (ang. forkhead box P3, FOXP3) czy podjednostki alfa receptora dla interleukiny 2 (ang. interleukin 2 receptor A, IL2RA) [16, 18-22].

Wpływ poznanych dotychczas wariantów w GD jest najpewniej kumulatywny, a związek choroby z każdym polimorfizmem pojedynczego nukleotydu (ang. single nucleotide polymorphism, SNP) z osobna relatywnie mały [17, 20].

Ponadto, dotychczasowe prace ujawniają najpewniej jedynie ok. 10% ryzyka zachorowania na GD wobec predyspozycji genetycznej [20, 22]. Czynniki genetyczne mogą też ujawniać się w różnych, konkretnych fenotypach GD. W pracy Kusia i wsp. podkreślono związek zachorowania dla orbitopatii tarczycowej (ang. Graves' orbitopathy, GO; thyroid-associated orbitopathy, TAO) z wariantem (rs11675434) genu tyreoperoksydazy tarczycowej (ang. thyroid peroxidase, TPO) [23]. Związek był szczególnie widoczny u pacjentów wykazujących zachorowanie na GD po 45 r.ż. oraz u mężczyzn. Na podstawie dotychczasowych badań związek GO z wariantami genetycznymi wydaje się heterogenny, zależny od płci oraz możliwie zróżnicowany etnicznie [15, 24-27]. Obejmuje udział genów układu HLA, jak również znanych molekuł immunomodulujących (*CTLA-4*), białek stanu zapalnego (czynnika martwicy nowotworu, ang. tumor-necrosis factor, *TNF*) czy związanych z fizjologią tarczycy (*TSH-R*, *TPO*) [28-33].

Biorąc pod uwagę model choroby wieloczynnikowej, wpływ czynników genetycznych u chorych z GD wydawałby się więc być najsilniej wyrażonym w grupie dzieci. Rozważając jednak doniesienia z literatury, w tym wyniki własne wieloośrodkowego badania na grupie ponad 1200 chorych (dorośli i dzieci z AITD), pacjenci z GD prezentują wspólne genetyczne czynniki ryzyka zachorowania niezależnie od wieku [34].

Obecnie nieznane są również ewidentne, silne determinanty genetyczne powodzenia leczenia przeciwtarczycowego. W pracach kilku autorów poświęconych m.in. wariantom genów białek uczestniczących w przekazywaniu sygnału immunologicznego przy prezentacji antygeny, jak *CTLA-4*, przedstawiono zróżnicowane wnioski dotyczące ich związku z przebiegiem GD [35-37]. Wreszcie, dla innych wariantów, jak.: *PTPN22* (rs2476601) czy *CD40* (rs745307) a także antygenów tarczycowych – *TSHR* (rs2239610) i tyreoglobuliny (ang. thyreoglobulin, TG; E33SNP) oraz kilku wariantów *HLA*, wykazano związek ze zwiększonym ryzykiem nawrotu GD [13, 38-39].



Rycina 1. Wieloczynnikowe podłoże choroby Gravesa i Basedowa, z uwzględnionym potencjalnym wpływem zaburzeń epigenetycznych (grafika modyfikowana na podstawie [6]).

Rozwinięcia skrótów: HLA – antygen zgodności tkankowej, CD40 – białko CD40, CTLA-4 – antygen limfocytów cytotoksycznych typu 4, fMC – mikrochimeryzm płodowy, FOXP3 – czynnik transkrypcyjny foxp3, IL2RA – podjednostka alfa receptora dla interleukiny 2, miRNA – mikro-RNA, PTPN22 – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa-22, TSH-R – receptor dla hormonu tyreotropowego, XCI – skośna inaktywacja chromosomu X

V.2.2. Czynniki środowiskowe choroby Gravesa i Basedowa

Do czynników środowiskowych ryzyka zachorowania na GD możemy zaliczyć przede wszystkim palenie papierosów, dla którego udowodniono najsilniejszy związek z chorobą dla tej grupy (OR=3,3, 95%CI [2,09-5,22]; Rycina 1.) [12, 40]. Poza tym, do grupy tej zwyczajowo zaliczano odpowiednio: alkohol, stosowane leki (m.in. interferon alfa), suplementacje (selen, witamina D), przebyte infekcje (wirus zapalenia wątroby typu C, *Yersinia enterocolitica*) oraz stres, jednak dowody na udział w patogenezie i/lub implikacje terapeutyczne w GD niektórych z tych czynników (selenu, witaminy D), są niespójne [12, 40, 41-43].

V.2.3. Czynniki endogenne choroby Gravesa i Basedowa

Wśród endogennych (osobniczych) czynników ryzyka GD możemy wymienić płęć żeńską – GD występuje 5-10 razy częściej u kobiet niż mężczyzn [6,12]. Poza udziałem hormonów płciowych, występowanie tego zjawiska wiąże się z 2 mechanizmami: skośną inaktywacją chromosomu X (ang. skewed X-chromosome inactivation, XCI) oraz mikrochimeryzmem

plodowym (ang. fetal microchimerism, fMC) [45-49]. Pierwszy z nich jest procesem skutkującym nieobecnością ekspresji genów jednego z chromosomów X w organizmie, ograniczając tym samym ilość kopii genów, podczas gdy drugi polega na występowaniu komórek płodu we krwi kobiety ciężarnej [50-51]. XCI oraz fMC uczestniczą w patogenezie GD możliwie poprzez, odpowiednio, stopień nasilenia XCI oraz pewne *loci* ryzyka chromosomu X, a także indukcję odpowiedzi immunologicznej komórek płodu względem antygenów matczynych (zbliżonej do reakcji immunologicznej przy przeszczepie narządu) [20, 46-47, 52-53]. W pracy In-Chaeol Baek i wsp. oceniono XCI jako ciężką i ekstremalnie ciężką, odpowiednio w 24,8% i 24,1% pozycji nukleotydowych u kobiet zdrowych oraz z GD (w tym genów odpowiedzi immunologicznej) [54]. Z kolei w innej pracy przedstawiono częstsze występowanie XCI w żeńskiej grupie AITD (w wieku 3-20 r.ż.) [53].

V.3. Obraz kliniczny choroby Gravesa i Basedowa

W GD występują zarówno typowe objawy nadczynności tarczycy jak i objawy pozataczycowe [55]. Do tych pierwszych możemy zaliczyć: i) objawy ogólne – wzmożoną potliwość, nietolerancję ciepła, preferencję chłodu, spadek masy ciała (przy prawidłowym apetycie) i ogólne osłabienie oraz ii) różnorodne, specyficzne-układowo objawy m.in.: kołatanie serca, podwyższone ciśnienie tętnicze i tętno, duszność, drżenie mięśniowe i osłabienie siły mięśniowej, biegunkę i żółtaczkę, niepokój, drażliwość, zaburzenia snu i koncentracji, a także wzmożone wypadanie włosów czy zaburzenia miesiączkowania [55]. Są to objawy istotnie wpływające na jakość życia pacjentów, a odpowiednio nasilone mogą prowadzić nawet do zagrażającej życiu dekompensacji homeostazy organizmu – przełomu tarczycowego (ang. thyroid storm) [56]. W badaniu przedmiotowym zaobserwować możemy ponadto obecność wola mięsaczowego, zmian ocznych związanych ze wzmożonym napięciem układu współczulnego lub miopatii w przebiegu GD, zmierzyć tachykardię oraz osłuchać szmer naczyniowy nad gruczołem tarczowym [55].

Jeśli chodzi o pozataczycowe manifestacje GD u pacjentów, wyróżniamy tu przede wszystkim orbitopatię tarczycową (25-40%), jak również obrzęk przedgoleniowy (1,5%) czy akropachie (0,3%) [55, 57]. GO jest najczęstszym objawem pozataczycowym GD. Ogólną częstość jej występowania na podstawie badań Europejskich szacuje się odpowiednio na 4,2-4,83/100,000 osób/rok, a dla podziału na płcie, odpowiednio: 3.3-8.01/100,000 osób/rok wśród kobiet i 0,9-1,62/100,000 osób/rok u mężczyzn [58-59]. Jest szczególnie związana z paleniem papierosów (OR=4,4, 95%CI 2,88-6,73) i istotnie obniża jakość życia chorych (ang. quality of life, QoL)

[12, 60]. Stanowi zespół objawów ocznych wtórnych do procesów autoimmunizacyjnych w obrębie tkanek miękkich oczodołu z uwagi na występowanie w ich obrębie fibroblastów z ekspresją błonową TSH-R, następowej stymulacji i rozplemu tych komórek, wytrzeszczu i ew. ucisku nerwu wzrokowego [61]. GO odznacza się różnorodnym przebiegiem klinicznym i może nawet prowadzić do utraty wzroku [62]. GO ujawnia się w różnym czasie przebiegu GD, najczęściej fазie nadczynności tarczycy, ale może także ją wyprzedzać lub wystąpić w fazie hipotyreozy, a także być wywoływana zastosowaną terapią jodem promieniotwórczym [63-65]. W badaniu Wiersingi i wsp. wyszczególniono 4 niezależne zmienne predykcyjne rozwinięcia GO podczas leczenia ATD (predictive score for the development or progression of GO, PREDIGO): nasilenie aktywności choroby, stężenie przeciwciał przeciw TSH-R, czas trwania objawów nadczynności tarczycy oraz nikotynizm [66]. W oparciu o skalę aktywności zapalnej (ang. clinical activity score, CAS), uwzględniając: 1) samoistny ból pozagałkowy, 2) ból przy ruchach oczu, 3) obrzęk powiek, 4) obrzęk spojówek, 5) obrzęk mięśnia łzowego, 6) zaczerwienienie powiek i 7) nastrzyknięcie spojówki, rozróżniamy aktywną ($\geq 3/7$ punktów w CAS) i nieaktywną GO ($< 3/7$ w CAS) [66]. Z kolei ciężkość (zaawansowanie) GO opisujemy korzystając z trzystopniowej skali obejmującej orbitopatię: 1) łagodną, 2) umiarkowaną do ciężkiej oraz 3) zagrażającą widzeniu, zgodnie z Europejską Grupą ds. Orbitopatii Tarczycowej (ang. European Group on Graves' Orbitopathy, EUGOGO) [66]. Skale te pozwalają na ocenę kliniczną GO oraz stanowią istotną zmienną przy wyborze i zakresie podejmowanego leczenia [67].

W odchyleniach laboratoryjnych u chorych z GD w hipertyreozie stwierdzamy cechy jawnej nadczynności tarczycy: obniżone, najczęściej zsupsjonowane stężenie TSH i podwyższone stężenia wolnych hormonów tarczycy – tyroksyny (ang. free thyroxine, fT4) oraz trijodotyroniny (ang. free triiodothyronine, fT3) [55]. Ponadto, poza wyszczególnionymi wcześniej w patogenezie przeciwciałami przeciw TSH-R (również: thyrotropin receptor antibody, TRAb), ze szczególnym uwzględnieniem podtypu funkcjonalnie pobudzającego receptor dla TSH (TSI-Ab, thyroid-stimulating immunoglobulins antibody), będącego właściwym biomarkerem GD oraz podtypu hamującego (ang. TSH-binding inhibitory immunoglobulins, TBII) – możemy znaleźć również podwyższone stężenia przeciwciał przeciw tyreoperoksydazie tarczycowej (ang. anti-thyroperoxidase antibody, TPOAb) oraz przeciw tyreoglobulinie (ang. anti-thyroglobulin antibody, TGAb) [68-69].

V.4. Leczenie choroby Gravesa i Basedowa

Celem leczenia nadczynności tarczycy jest zmniejszenie stężenia hormonów tarczycy we krwi poprzez ograniczenie ich syntezy oraz konwersji obwodowej, a także zniszczenie komórek gruczołu [70]. Nawiązując do wytycznych Europejskiego Towarzystwa Tyreologicznego (ang. European Thyroid Association, ETA), do rekomendowanych metod leczenia GD, poza stosowaniem tyreostatyków (ang. antithyroid drugs, ATD) – propylotiouracylu (ang. propylthiouracil, PTU) i metimazolu (ang. methimazole, MMI), należy postępowanie radykalne [71]. Możemy tu wyróżnić ablację jodem radioaktywnym I^{131} (ang. radioiodine, RAI) oraz leczenie chirurgiczne. Klinicznie, w GD występuje różnorodna odpowiedź na leczenie farmakologiczne, gdzie remisję choroby uzyskuje odpowiednio 40-60% dorosłych oraz 20-30% dzieci [71-74]. Zespół ETA rekomenduje przedłużone (ponad zalecane standardowo 12-18 miesięcy) leczenie, tj. przez co najmniej 3 lata, w celu optymalizacji osiągnięcia eutyreozy i remisji immunologicznej w tej ostatniej grupie chorych [71]. Dane z klinicznych wskaźników oceny rokowania i nawrotu GD po leczeniu, jak CSS (Clinical Severity Score) czy GREAT (Graves' Recurrent Events After Therapy) są niespójne [13]. We wskaźnikach tych uwzględniono odpowiednio: objętość tarczycy, stężenie fT4, obecność GO (CSS) oraz wiek, wielkość wola, stężenie fT4 oraz TRAb przed podjęciem leczenia (GREAT) [75-76]. Nie w pełni zrozumiany i wyjaśniony jest także obserwowany stopień remisji po zastosowanym leczeniu ATD w samej GD oraz odpowiedź kliniczna na ivGCS w GO. Wreszcie, nie ma obecnie również wyszczególnionych spójnych genetycznych determinant określających ryzyko niepowodzenia leczenia przeciwtarczycowego oraz GO. Niektóre warianty genetyczne stanowiły uzupełnienie skal klinicznych w celu oceny nawrotu GD u chorych ze świeżym rozpoznaniem [77].

Dysponujemy odmiennymi opcjami leczenia GO, w zależności od nasilenia i aktywności choroby [67]. W leczeniu łagodnej GO badacze EUGOGO rekomendują suplementację selenem (6 miesięcy) [67, 78]. Do innych metod leczenia w tej najlżejszej postaci GO zaliczamy sztuczne łzy, miejscowe krople i żele chroniące rogówkę. Niskodawkowe leczenie immunomodulujące lub zabiegowe proponowane jest w zależności od aktywności i wpływu choroby na jakość życia oraz bilansu ryzyka podejmowanej terapii [67].

W terapii aktywnej, umiarkowanej do ciężkiej GO kluczowe znaczenie mają dożylne glikokortykosteroidy (ang. intravenous glucocorticoids, ivGCS) stosowane w pulsach [67]. Zgodnie z zaleceniami EUGOGO w terapii stosuje się rekomendowany protokół

uwzględniający łącznie 12 tygodni leczenia cotygodniowymi wlewami iv metyloprednizolonu (ang. intravenous methylprednisolone, ivMP) w schemacie cotygodniowych dawek 500 mg ivMP przez 6 tygodni, oraz 250 mg ivMP przez kolejne 6 tygodni (kumulacyjna dawka 4,5 g MP/12 tygodni terapii). W ciężkich przypadkach GO (tj. obecności stałego/niestałego podwójnego widzenia, ciężkiego wytrzeszczu lub zajęcia tkanek miękkich) zastosowanie ma inny schemat: 750 mg ivMP raz w tygodniu, przez 6 tygodni, oraz następowe 500 mg ivMP/tydzień przez kolejne 6 tygodni (łączna dawka 7,5 g MP/12 tygodni). W aktywnej, umiarkowanej do ciężkiej GO odpowiedź na leczenie ivGCS uzyskuje się u ok. 50-80% chorych [67, 79-81]. Zgodnie z literaturą, ten rodzaj GO występuje u ok. 5-6% chorych i nadal stanowi złożony problem terapeutyczny [82]. W tej postaci GO dysponujemy również kilkoma metodami leczenia drugiej linii, pełniącymi rolę synergistyczną lub alternatywną dla ivGCS [67]. Zaliczamy do nich: radioterapię oczodołów (ang. orbital radiotherapy, ORTH), leki antyproliferacyjne (azatiopryna, cyklosporyna) oraz przeciwciała monoklonalne. Do ostatniej grupy należą rytuksymab (przeciwciało anty-CD20), teprotumumab (przeciwciało monoklonalne przeciwko receptorowi dla insulinopodobnego czynnika wzrostu 1, IGF-1R) oraz tocilizumab (przeciwciało monoklonalne przeciwko receptorowi dla interleukiny 6, IL-6R).

W przypadkach GO zagrażającej utratą wzroku, w przebiegu neuropatii nerwu wzrokowego (ang. dysthyroid optic neuropathy, DON) pulsy ivMP stosowane są w odmiennym schemacie, gdzie podaje się 1g ivMP/dzień przez 3 kolejne dni, a dalsze kroki terapeutyczne obejmują m.in. dekompresję oczodołu w razie keratopatii lub niepowodzenia wcześniejszego leczenia [67].

V.5. Rola epigenetyki w patogenezie oraz przebiegu choroby Gravesa i Basedowa

V.5.1. Epigenetyka

Epigenetyka jest dziedziną nauki obejmującą regulację ekspresji genów, jednak niewynikającą z sekwencji nukleotydowych kwasu deoksyrybonukleinowego (ang. deoxyribonucleic acid, DNA) w obrębie informacji genetycznej [83]. Należą do niej acetylacja, fosforylacja i metylacja histonów, procesy zależne od podtypu kwasu rybonukleinowego – mikro-RNA (ang. micro-ribonucleic acid, miRNA) oraz metylacja DNA (ang. DNA methylation, DNAm) [84]. Jest to

dziedzina stale poznawana i wydaje się, że jej mechanizmy stanowią miejsce efektorowe bezpośredniego wpływu czynników środowiskowych, wikłających przebieg i obraz wielu chorób [85].

V.5.2. Metylacja DNA

DNAm jest procesem chemicznej, kowalencyjnej modyfikacji cząsteczki zasady azotowej [86]. Reakcja ta jest katalizowana przez enzymy – DNA-metylotransferazy (ang. DNA-methyltransferases, DNMTs), przenoszące grupę metylową (-CH₃) z S-adenylometioniny (ang. s-adenylomethionine, SAM) do cytozyny (atom węgla w piątej pozycji). Produktem tej reakcji jest 5-metylocytozyna (ang. 5-methylcytosine, 5-MC). W zależności od podtypu DNMTs, powstają inne wzorce DNAm w kontekście funkcjonalnym [87]. Enzymy DNMT3A oraz DNMT3B uczestniczą w procesie DNAm w obrębie niezmodyfikowanego DNA (metylacje *de novo*), podczas gdy podtyp DNMT1 odpowiada za DNAm zachodzącą podczas replikacji materiału genetycznego DNA (kopiowanie wzorca na nić potomną) [87]. Ostatnim podtypem jest DNMT3L, białko bez domeny katalizującej reakcje obecne w pozostałych enzymach rodziny [88-89]. DNMT3L podlega ekspresji głównie na wczesnych etapach rozwoju komórek germinalnych, a jego występowanie w życiu dorosłym ograniczone do grasicy [88]. Pomimo, że sam enzym DNMT3L nie pełni roli katalitycznej, jest ściśle związany z DNMT3A oraz DNMT3B i stymuluje ich aktywność [89-90].

Wyróżniamy zarówno kilka mechanizmów tworzenia jak i regulacji DNAm, a zaangażowane w nie są w różnym stopniu wszystkie DNMTs. DNAm jest rozpoznawana i modyfikowana w zniuansowanych, złożonych mechanizmach epigenetycznych (ang. epigenetic crosstalk), w których wg obecnej wiedzy uczestniczą również inne, m.in. następujące rodziny białek: reduktazy syntazy metioniny (ang. methionine synthase reductase, MTRR), białka zawierające domenę wiążącą 5-MC (ang. methyl binding domain proteins, MBD), białko podobne do ubikwityny posiadające domeny PHD i RING (ang. ubiquitin-like with PHD and RING finger protein 1, UHRF) oraz białka z motywem palca cynkowego (ang. zinc-finger proteins, ZCF) [91-93]. Do innych aktywnych mechanizmów regulacyjnych DNAm należą te związane z oksygenazami metylocytozyny Tet1-3 (ang. ten–eleven translocation, Tet), dodającymi hydroksylovaną grupę do 5-MC tworząc 5-hydroksymetylocytozynę (5h-MC) [94].

DNAm stanowi ważny, obecnie co raz lepiej poznany mechanizm epigenetyczny regulujący ekspresję genów (nie zmieniając ich struktury ani funkcji), imprinting oraz uczestniczący w różnicowaniu komórek [84]. Postulowane są formy dziedziczenia DNAm, jednak całościowo

jej wzorce ulegają bieżącym zmianom w ciągu życia, pod wpływem środowiska zewnętrznego [95]. Regiony zawierające zmetylowane fragmenty DNA są rozsiane w genomie [96]. Blisko 45% genomu ssaków składa się z ruchomych elementów, wyciszonych w kontekście ekspresji właśnie poprzez DNAm [97-98]. Jeśli uległyby ekspresji, byłyby potencjalnie szkodliwe i mogły prowadzić do mutacji i niestabilności materiału genetycznego [98-99]. Globalnie, fragmenty zawierające 5-MC stanowią ok. 1 % genomu, jednakże należy jednocześnie wskazać tendencję ich rozmieszczenia [99]. Najczęściej, zmetylowane cytozyny występują w genomie w nukleotydach poprzedzających nukleotydy zawierające guaniny. Konfiguracja taka tworzy tzw. dinukleotydy CpG (ang. CpG sites), formujące także dalej swoiste skupiska długości ok. 1000 par zasad – wyspy CpG (ang. CpG islands, CGI), nasilając tym samym asymetrię zjawiska [99]. Odsetek CpG obecny w strukturze samej wyspy wynosi (średnio) 18% [97]. W obrębie wszystkich CGI występuje natomiast, szacunkowo, ok. 2% wszystkich CpG ludzkiego genomu [97]. Co ważne, ok. 70% skupisk CGI lokalizuje się w obrębie genomu w okolicy promotorów genów, niosąc za sobą tym samym implikacje funkcjonalne, jak również, potencjalnie kliniczne [99]. CGI i CpG okolicy promotorów genów najczęściej pozostają niezmetylowane, a w zależności od ilości CpG (tzw. zagęszczenia CpG) takich miejsc, wyróżniamy zróżnicowane regiony promotorowe o: wysokiej, średniej i niskiej zawartości miejsc metylacji (ang. high, intermediate, low CpG content; HCG, ICG, LCG) [100]. Z uwagi na kontrolę ekspresji genów regionów CpG (i CGI) oraz poprzez m.in. wiązanie czynników transkrypcyjnych, wydawałoby się, że rozmieszczenie CGI powinno być tkankowo specyficzne [84]. Taki wysoko konserwatywny wzorec tkankowo-specyficznej DNAm występuje natomiast w regionach międzygenowych, rejonach "obrzeży" CGI (ang. CGI shores) w lokacji 2000 par zasad od CGI [101].

V.5.3. Metylacja DNA w chorobie Gravesa i Basedowa

Dowody świadczące o roli DNAm w chorobach onkologicznych i autoimmunizacyjnych w ostatnich latach znacznie wzrosły [102-104]. W najnowszych doniesieniach naukowych widnieją informacje dotyczące GD i zaburzeń całogenomowej DNAm, jak również określonych regionów, włączając w to promotory genów (Tabela 1.) [105]. Postulowany jest również wpływ nikotynizmu na globalne zmiany DNAm, co wydaje się szczególnie istotne w kontekście jego dotychczasowego znaczenia dla zachorowania i przebiegu GD, a także zestawienia mechanizmów epigenetycznych i czynników środowiskowych z obrazem klinicznym u dzieci oraz dorosłych z GD, różniących się znacznie przebiegiem choroby [106-107].

Tabela 1. Podsumowanie dotychczasowych badań dotyczących metylacji DNA w chorobie Gravesa i Basedowa.

Ref.	Populacja	Grupy badania (n)	Materiał biologiczny	Analizy molekularne	Najważniejsze asocjacje	Aspekty kliniczne i funkcjonalne
[108]	Chińska	-/ GD(3) -/ HC(3) ----- -/GD(37) -/ HC(34)	krw obwodowa	-/ ocena*^ genomowa (geny kandydaci, GD, n=3) oraz qMSP (GD, n=37) DNAm -/ analiza wzbogacenia funkcjonalnego	-/132 hipermetylowane DMRs (GD) -/ 133 hipometylowane DMRs (GD) -/ wyróżnione wzorce DNAm i ekspresja mRNA (GD vs. HC): <i>ICAM1</i> , <i>DNMT1</i> , <i>MECP2</i>	-/ badanie dot. GD bez wcześniejszego leczenia przeciwtarczycowego -/ związek DMRs ze szlakami cyklu kom., białek przylegania kom., guzów litych, TGF-beta i insuliny -/ globalnie hipometylacja GD oraz żeńskiej podgrupie GD
[109]	Chińska	-/GD(6) -/HC(6) ----- -/GD(32) -/ HC(30)	krw obwodowa	-/ genomowa* ocena DNAm -/ ocena LMGs i HMGs i walidacja na podstawie grupy (n=6) GD i (n=6) kontroli -/ analiza PPI	-/ odmienna DNAm w 5 CpG dla (GD vs. HC): <i>CDKN2C</i> , <i>SERPINA1</i> , <i>B3GNT2(2)</i> , <i>IRS4</i>	-/ GD: 2 CpG <i>B3GNT2</i> związane z wiekiem chorych i st. aTGAb, TRAb -/ 9 CpG różnicujących kobiety z GD i HC -/ przykłady topowych loci w analizie PPI: <i>CRHR1</i> , <i>CAMK2A</i> , <i>SERPINA1</i> , <i>RANBP9</i> , <i>ICAM1</i> , <i>ADRB2</i> , <i>KRTAP13-1</i> , <i>PTPRA</i> , <i>S100A2</i> , <i>KPRP</i>
[110]	Grecka	-/ GD (9) -/ HT(60) -/T1DM1 +HT(25) -/ HC(55)	krw obwodowa	-/ ocena DNAm ^o regionu promotorowego <i>IL2RA</i>	-/ hipometylacja w regionie promotora <i>IL2RA</i> w GD	-/ badanie na grupie chorych<18 r.ż.
[111]	Estońska	-/GD(38) -/ HC(31)	limfocyty T: CD4+ i CD8+ (krw obwodowa)	-/ genomowa ~ ocena DNAm -/ analiza wzbogacenia funkcjonalnego	-/ 365 DMRs w komórkach CD4+ oraz 3322 DMRs CD8+ -/ podobny udział hipo- i hipermetylowanych CpG w komórkach CD4+ oraz 65% hipometylowanych DMRs w CD8+ -/ blisko 40% DMRs położonych międzygenowo	-/ hipermetylacja (6 CpGs) pierwszego intronu <i>TSHR</i> -/ geny z odmienną ekspresją i DMRs: 3 (CD4+), 112 (CD8+) -/ hipermetylowane regiony związane ze szlakami sygnałowymi receptorów limfocytów T
[112]	Duńska Australijska	-/GD(64) -/ HT(62)	krw obwodowa	-/ genomowa ~ ocena DNAm	-/64 DMPs w analizie GD vs. HT (obie kohorty)	-/ badanie dot. GD bez wcześniejszego leczenia -/ 10 DMPs dot. czynników immunologicznych i 7 DMPs dot. fizjologii tarczycy (GD vs. HT)

						-/ wyszczególnione DMRs dla: <i>MDC1</i>, <i>KLF9</i>, <i>CUTA</i> (GD vs.HT) -/DNAm <i>KLF9</i> związane ze stężeniem hormonów tarczycy (GD vs. HT)
[113]	Egipska	-/GD(40) -/ HT(40) -/ HC(40)	rew obwodowa	-/ ocena DNAm ^ okolicy regionu promotora genu <i>ICAM-1</i> (4 CpG) -/ ocena ekspresji <i>ICAM-1</i> (RT-PCR)	-/ obniżony poziom DNAm promotora genu <i>ICAM-1</i>	-/ związek hipometylacji <i>ICAM-1</i> z wytrzeszczem oraz wyższymi stężeniami TSI -/ związek hipometylacji <i>ICAM-1</i> z większą ekspresją <i>ICAM-1</i> -/ badanie dot. GD bez wcześniejszego leczenia przeciwtarczycowego
[114]	Japońska	-/GD(52) iGD/rGD (19/19) -/ HT(60) sHT/mHT (25/20) -/ HC(29)	rew obwodowa	-/ ocena DNAm* (6 CpG) regionu promotora genu <i>TNF-alfa</i> -/ genotypowanie (RFLP) uczestników (funkcjonalne warianty <i>TNF-alfa</i>: -1031 T/C,+128C/T) -/ ELISA (st. <i>TNF-alfa</i>)	-/ hipermetylacja DNAm dla -72 CpG (GD vs. HC) -/ częstsze występowanie allelu ryzyka <i>TNF-alfa</i> 1031C (genotypy CT+CC) w GD -/ związek allelu ryzyka <i>TNF-alfa</i> 1031C z większym stężeniem <i>TNF-alfa</i> w GD	-/ większa DNAm w obrębie -49 i - 38 CpGs (rGD vs. HC) -/ chorzy z genotypami z 1031C (CT+CC) <i>TNF-alfa</i>: hipermetylacja DNAm -72 CpG w GD (GD vs. HT)
[115]	Japońska	-/GD(57) iGD/rGD/nGD (24/15/18) -/ HT(59) sHT/mHT/nHT (23/20/16) -/ HC(26)	rew obwodowa	-/ ocena DNAm * w 8 CpG regionu promotora genu <i>IFN-gamma</i> -/ genotypowanie (RFLP) uczestników (funkcjonalne warianty <i>IFN-gamma</i>:+874 A/T, +2109 C/T)	-/ genotyp +874 TT częstszy w GD (GD vs. HC) -/ genotyp +2109 CC częstszy w GD (GD vs. HC) -/ genotyp +2109 TT związany z hipometylacją -4360 CpG w GD (GD vs. HC)	-/ hipermetylacja -54 CpG (iGDvs.rGD) -/chorzy o genotypie <i>IFN-gamma</i> +2109T (CT+TT) z większą DNAm -54 CpG (iGD vs. rGD) -/ chorzy o genotypie <i>IFN-gamma</i> +2109 CC z hipermetylacją -4293 CpG (iGD vs. rGD) -/ bez zmienności okolicy DNAm <i>IFN-gamma</i>
[116]	Japońska	-/GD(43) iGD/rGD (22/21) -/ HT(26) (13/13) sHT/mHT -/ HC(13)	rew obwodowa	-/ ocena DNAm * w 2 CpG regionu promotora genu <i>IL-10</i>	-/ allel C wariantu <i>IL10</i>-592 A/C związany z niską DNAm -185 CpG.	-/ DNAm -185 CpG związana z wiekiem i opornością w leczeniu GD

[117]	Chińska	-/GD(51) -/ HT(28) -/ HC(39)	limfocyty T CD3+ limfocyty B CD19+ (krew obwodowa)	-/ genomowa * ocena DNAm	-/ wyjściowo hipometylacja DNA w GD (GD vs. HC) -/ zmniejszona ekspresja <i>DNMT1</i> w limfocytach GD (GD vs. HC)	-/ wzrost globalnej DNAm po ATD i RAI -/ wzrost ekspresji <i>DNMT1</i> w limfocytach T (po RAI) limfocytach B i T (po ATD) -/ badanie dot. GD bez wcześniejszego leczenia przeciwtarczycowego
[118]	Japońska	-/GD(31) iGD/rGD (15/16) -/ HT(29) sHT/mHT (15/ 14) -/ HC(16)	krew obwodowa	-/ ocena DNAm * w 5 CpG regionu promotora <i>IL-6</i>	-/ bez różnic w DNAm między grupami chorych i HC	-/ mniejszy poziom DNAm dla -664 i -666 CpG w subanalizie iGD vs. rGD
[119]	Japońska	-/GD(13) -/ HT(12) -/ HC (6)	krew obwodowa	-/ genomowa * ocena DNAm -/ genotypowanie (RFLP): (<i>DNMT</i> , <i>MTRR</i> , <i>MTHFR</i>)	-/ uczestnicy o genotypie <i>DNMT1</i> +32204GG: globalna hipometylacja DNA	-/ chorzy GD o genotypie <i>DNMT1</i> +32204GG: związek z opornością na leczenie (iGD vs. rGD)
[120]	Japońska	-/GD(37) iGD/rGD (19/18) -/ HT(33) sHT/mHT (17/16) -/ HC(26)	krew obwodowa	-/ ocena DNAm * w 8 CpG regionu <i>CTLA-4</i> -/ ELISA (st. sCTLA-4)	-/ chorzy z wariantem CT60 CpG-SNP dla regionu +22 CpG wykazali hipometylację (GD vs. HC) -/ pozytywna korelacja DNAm regionów -2584 CpG oraz CT60 CpG-SNP z ekspresją sCTLA-4	-/ hipometylacja regionu - 15 CpG: iGD vs. rGD

Oznaczenia dla metod oceny metylacji DNA:

RRBS (zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe), + WGBS (sekwencjonowanie całego genomu), ~ mikromacierze, * MEDIP (immunoprecypitacja przeciwciałami wiążącymi 5-metylocytozynę), ^MSP (metylo-specyficzny PCR), ° BS-PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy z bisulfitem), * pirosekwencjonowanie

Uzupełnienie danych tabeli:

- W pracy Guo i wsp. [115] leczenie ATD z/bez RAI (dla grupy GD n=40) trwało 3 miesiące.
- W pracach [114-116], [118], [120] przyjęto odpowiednie kryteria dla podgrup, w zależności od obrazu klinicznego – sHT (“severe HT”, ciężka HT): początek HT <50 r.ż. oraz aktualne leczenie lewotyrosyną; mHT (“mild HT”, łagodna HT): chorzy po 50 r.ż., w eutyreozie bez leczenia; iGD

(“intractable GD”, GD oporna na leczenie): leczenie ATD ≥ 5 lat oraz dodatnie TRAb; rGD (“GD in remission”, GD w remisji): chorzy w eutyreozie oraz z ujemnymi TRAb >2 lata bez leczenia; nGD („not classified GD”, niesklasyfikowana GD) i nHT („not classified HT”, niesklasyfikowana HT) nie spełniły założeń dla remisji lub oporności w leczeniu

- W pracy [117] genotypowanie wykonano dla chorych: GD (n=176), HT(n=125), HC (n=83).

Objaśnienia skrótów: ADRB2 – receptor adrenergiczny beta-2, ATD – lek przeciwtarczycowy, B3GNT2 – beta-1,3-N-acetyloglukozaminylotransferaza typu 2, C – cytozyna, CAMK2A – podjednostka alfa zależnej od wapnia i kalmoduliny kinazy typu 2, CD3 – antygen różnicowania komórkowego CD3, CD4 – antygen różnicowania komórkowego CD4, CDKN2C – inhibitor kinazy cyklinozależnej 2C, CpG – dinukleotyd CpG, CRHR1 – białko receptorowe uwalniające kortykotropinę, DNAm – metylacja DNA, DNMT – DNA-metylotransferaza, DNMT1 – DNA-metylotransferaza 1, ELISA – test immunoenzymatyczny, G – guanina, GD – choroba Gravesa i Basedowa, HC – zdrowe kontrole, HMG – gen z wysokim odsetkiem metylacji DNA, HT – choroba Hashimoto, ICAM1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezji 1, IFN-gamma – interferon gamma, iGD – choroba Gravesa i Basedowa oporna na leczenie, IL-2RA – receptor dla interleukiny 2 typu alfa, IL-6 – interleukina 6, IRS4 – związane z receptorem insuliny białko typu 4, KPRP – białko keratynocytów bogate w prolinę, KRTAP13-1 – białko 13-1 związane z keratyną, LMG – gen z niskim odsetkiem metylacji DNA, MECP2 – białko wiążące metylo-CpG 2, mHT – łagodna choroba Hashimoto, MTHFR – reduktaza metylenotetrahydrofolianowa, MTRR – reduktaza syntazy metioniny, n – liczba uczestników, nGD – nieleczona choroba Gravesa i Basedowa, PPI – analiza funkcjonalna białek (protein-protein interaction), PTPRA – receptor fosfatazy tyrozynowej typu A, RAI – radiojod, RANBP9 – białko wiążące RAN typu 9, RFLP – polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych, rGD – choroba Gravesa i Basedowa w remisji, S100A2 – białko S100A2, sCTLA-4 – rozpuszczalne cytotoksyczne białko 4 związane z limfocytami T, SERPINA1 – białko z rodziny serpin A1, sHT – ciężka choroba Hashimoto, SNP – polimorfizm pojedynczego nukleotydu, T – tymina, T1DM – cukrzyca typu 1, TGF-beta – transformujący czynnik beta

Obecnie, zwraca się uwagę na regiony genomu zawierające geny cytokin prozapalnych, cząsteczek adhezyjnych i uczestniczących w przekazaniu drugiego sygnału podczas prezentacji antygeny – będącymi ważnymi elementami patofizjologicznymi chorób autoimmunizacyjnych, również dla GD [113,115,118, 120]. W pracy Cai i wsp. odnotowano genomową hipometylację u chorych GD względem zdrowych kontroli oraz wskazano niektóre odmiennie metylowane regiony ryzyka (ang. differentially methylated regions, DMRs), w tym: międzykomórkowej cząsteczki adhezyjnej-1 (ang. Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1), białka wiążącego metylo-CpG 2 (ang. methyl-CpG-binding protein 2, MECP2) oraz *DNMT1* [108]. Limbach i wsp. zwrócili uwagę na globalną hipometylację genomu limfocytów T CD8⁺ chorych z GD oraz hipermetylację genu *TSHR* (cg10825315) [111]. Ponadto, zespół badaczy odnotował 365 DMRs w komórkach CD4⁺ i 3322 DMRs CD8⁺, przy podobnym udziale hipo- i hipermetylowanych CpG w komórkach CD4⁺, a jednocześnie dysproporcji (65%) hipometylowanych DMRs w limfocytach CD8⁺ [111]. Blisko 40% CpG z DMRs zlokalizowanych było poza CGI, międzygenowo. Uchwycono również hipermetylację w CpG regionów związanych z genami białek zaangażowanych w przekazanie sygnału receptora limfocytów T (ang. T-cell receptor, TCR).

W pracach kilku autorów wskazano również związek DNAm i GO, w tym w kontekście analizy wzbogacenia funkcjonalnego i ujęciu klinicznym (Tabela 2.) [121]. Xin i wsp. przedstawili prace pokazujące łącznie 1583 DMRs u chorych z GO, z uwzględnieniem znamienych szlaków molekularnych [122]. Ponadto odkryli DMRs regionów genów białka CD14 (ang. cluster of differentiation 14, *CD14*), receptora E dla interleukiny 17 (IL17RE (ang. interleukin 17 receptor E, *IL17RE*) oraz receptora D4 dopaminy (ang. dopamine receptor D4, *DRD4*) – w GO, a także pokazali, że DNAm w regionie *IL17RE* była pozytywnie związana z aktywnością GO (wyrażoną w skali CAS) [123].

Tabela 2. Podsumowanie dotychczasowych badań dotyczących metylacji DNA w orbitopatii tarczycowej.

Ref.	Populacja	Grupy badania (n)	Materiał biologiczny	Analizy molekularne	Najważniejsze asocjacje	Aspekty kliniczne i funkcjonalne
[122]	Chińska	-/ GO (6) -/ HC (6)	krew obwodowa	-/ genomowa # ocena DNAm -/ analiza wzbogacenia funkcjonalnego	-/ 1583 DMRs, w tym: <i>CD14</i> , <i>IL17RE</i> oraz <i>DRD4</i>	-/ wzorce DNAm 12 loci związane z zapadalnością GO -/ DNAm <i>CDK5</i> , <i>ZCCHC6</i> oraz <i>GLI3</i> związane z wiekiem chorych z GO -/ DNAm w regionie <i>IL17RE</i> pozytywnie związana z CAS -/ DNAm w regionie <i>CDK5</i> pozytywnie związana z TRAb -/ 84 szlaki funkcjonalne z oparciem o znalezione DMRs (procesy cyklu kom., przylegania, metabolizmu białek)
[123]	Chińska	-/ GO (6) -/ HC (6)	krew obwodowa	-/ genomowa # ocena DNAm -/ analiza wzbogacenia funkcjonalnego	-/ 1583 DMRs	-/ istotne szlaki molekularne: <i>LDLR</i> , <i>CDK5</i> , <i>PIK3CB</i> -/ drogi aksonalne, kaskady sygnału i przylegania kom., proteoglikanów szlaki kinaz, chorób nowotworowych
[124]	Chińska	-/ GO(48) -/ HC(24)	krew obwodowa	-/ genomowa # ocena DNAm -/ ocena topowych LMGs i HMGs (sieci funkcjonalne i fenotyp)	-/ przykłady DMRs: <i>ANGEL1</i> , <i>BOLL</i> , <i>CDK5</i> , <i>IL17RE</i> , <i>LYAR</i> i <i>MBP</i> -/ 42 LMGs oraz 42 HMGs po preselekcji DMRs -/ GO – topHMGs (10) przykłady: <i>MBP</i> , <i>ANGEL1</i> , <i>LYAR</i> , <i>BECN1</i> , <i>CD14</i> -/ GO – topLMGs (10) przykłady: <i>BOLL</i> , <i>EFCAB1</i> , <i>ZNF843</i> , <i>SRSF11</i>	-/ DNAm <i>MBP</i> dodatnio skorelowane z CAS (GO) -/ DNAm <i>ANGEL1</i> , <i>LYAR</i> ujemnie skorelowane ze st. TRAb (GO) -/ DNAm <i>BOLL</i> dodatnio skorelowane ze st. TRAb (GO) -/ GO vs, HC (analiza wieloczynnikowa): <i>BOLL</i> (niższa DNAm) <i>CDK5</i> , <i>MBP</i> (wyższa DNAm)

[125]	Chińska	łącznie: -/ GO(43) -/ HC(40)	komórki oczodołu	-/ całogenomowa ocena DNAm: bazy danych: Gene Expression Omnibus (ontologiczne) -/ analiza wzbogacenia funkcjonalnego i ekspresji	-/ 125 TA-DMGs -/ 994 istotnych DEGs (218 z nadmierną i 776 ze zmniejszoną ekspresją)	-/ 117 szlaków biologicznych związanych z TA-DMGs w GO - potencjalne biomarkery GO: <i>NKD2, S100A11</i>
[126]	Holenderska	-/aGO(4) -/nGO(4) -/ HC(5)	fibroblasty oczodołu	-/ genomowa + ocena DNAm -/ ocena ekspresji mRNA i białek (RT-PCR, LC-MS) -/ analiza funkcjonalna	-/ hipermetylacja <i>SLC39A8</i> w (wszyscy chorzy GO vs.HC) -/ hipermetylacja <i>GNAS</i> w nGO – wynik na granicy znamienności -/ istotne różnice w DNAm <i>loci</i> dla fibroblastów pojedynczych chorych, nie grupy GO -/ mała siła związku między poziomem DNAm i ekspresją mRNA oraz białek	aGO -/ hipermetylacja DNA regionów związanych ze stanem zapalnym -/ hipometylacja <i>AIRE</i> oraz <i>HLA-A</i> -/ zwiększona ekspresja białek związanych z zapaleniem, proliferacją komórek, adipogenezy nGO -/ hipometylacja genów związanych z adipogenezą oraz autoimmunizacją -/ zwiększona ekspresja białek ECM i włókienia
[127]	Włoska	-/ GO (6) -/ HC (6)	fibroblasty oczodołu	-/ genomowa # *ocena DNAm -/stymulacja hodowli kom. z przeciwciałem anty-TSHR (M22) oraz cytokinami <	-/19 869 DMRs w DNA (3957 w obrębie genów) fibroblastów GO -/ bez znamienych różnic w DNAm po stymulacji hodowli komórkowych między grupami	-/istotne DMRs genów czynników wzrostu i ich receptorów (m.in. IGF-1R, FGF) -/ 61.6% DMSs bez związku z regionami ekspresji

Oznaczenia dla metod oceny metylacji DNA:

RRBS (zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe), + WGBS (sekwencjonowanie całego genomu), ~ mikromacierze, * MEDIP (immunoprecypitacja przeciwciałami wiążącymi 5-metylocytozynę), ^MSP (metylo-specyficzny PCR), ° BS-PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy z bisulfitem), * pirosekwencjonowanie

Uzupełnienie danych tabeli: < TNF-alfa, IFN-gamma, IL1A, IL1B, IL2, IL6

Objaśnienia skrótów: aGO – aktywna orbitopatia tarczycowa, AIRE – białko regulacji autoimmunologicznej, ANGEL1 – białko ANGEL1, anty-TSHR – przeciwciało przeciw receptorowi dla TSH, BECN1 – beklina-1, BOLL – białko BOLL, CAS – skala aktywności orbitopatii tarczycowej, CD14– antygen różnicowania komórkowego CD14, CDK5 – cyklinozależna kinaza 5, DNAm – metylacja DNA, DRD4 – receptor dopaminowy D4, ECM – macierz zewnątrzkomórkowa, EFCAB1 – białko z domeną wiążącą wapń EF - EFCAB1, FGF – czynnik wzrostu fibroblastów, GLI3 – białko z domeną palca cynkowego z rodziny GLI23, GNAS – podjednostka alfa stymulującego białka G wiążącego nukleotydy, GO – orbitopatia tarczycowa, HC – zdrowe kontrole, HLA-A – antygen zgodności tkankowej typu A, HMG – gen z wysokim odsetkiem metylacji DNA, IFN-gamma – interferon gamma, IGF-1R – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1, IL-17RE – receptor interleukiny 17 typu E, IL-1A – podjednostka alfa interleukiny 1, IL-1B – podjednostka beta interleukiny 1, IL-2 – interleukina 2, IL-6 – interleukina 6, LC-MS - chromatografia cieczowa sprzężona ze spektrometrią mas, LDLR – receptor lipoprotein o niskiej gęstości, LMG – gen z niskim odsetkiem metylacji DNA, LYAR – białko

Ly1 reaktywne względem przeciwciał, MBP – podstawowe białko mieliny, n – liczba uczestników, nGO – nieaktywna GO, NKD2 – białko NKD2, PIK3CB – katalityczna podjednostka beta kinazy fosfatidyloinozytol-4,5-bisfosfonianu typu 3, RT-PCR – reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym, S100A11 – białko wiążące wapń S100A11, SLC39A8 – białko SLC39A8, SRSF11 – białko SRSF11, TA-DMG – odmiennie metylowany gen/gen metylowanego ryzyka związany z orbitopatią tarczycową, TNF-alfa – czynnik martwicy nowotworu alfa, TRAb – przeciwciała przeciw receptorowi dla hormonu tyreotropowego, ZCCHC6 – białko z domeną palca cynkowego ZCCHC6, ZNF843 – białko z domeną palca cynkowego ZNF843

W literaturze dysponujemy także wstępnymi doniesieniami dotyczącymi DNAm i terapii różnych postaci GD i GO, w tym zmiany profilu DNAm wobec prowadzonego leczenia GD [114-115, 117]. Wśród nich zwrócono uwagę na wzrost poziomu DNAm oraz ekspresji DNMT1 limfocytów T i B po przeprowadzeniu leczenia ATD lub RAI, u chorych ze świeżo rozpoznaną GD. W pracy tej podkreślono jednocześnie występowanie hipometylacji genomu limfocytów u tych chorych przed leczeniem [117]. W pracy Arakawy i wsp. wskazano mający związek wariantu genu *DNMT1* z odmiennym poziomem DNAm oraz opornym na leczenie przebiegiem GD [119]. Hirai i wsp. zaprezentowali badanie wskazujące na istotną rolę DNAm w wybranych regionach promotorowych genu *IL6* i związku z predykcją przebiegu AITD [118]. Co interesujące poziom DNAm nie był związany zarówno z czynnością tarczycy, jak i dawką MMI oraz stężeniem przeciwciał przeciwtarczycowych. Inni autorzy zwrócili uwagę na asocjację CpG regionów promotorów genów *TNF-alfa*, *IFN-gamma* czy *IL-10* z opornością na leczenie GD [114-116].

V.5.4 Związek działania glikokortykosteroidów i zmian metylacji DNA

GCS działają w komórkach wielotorowo, a uwzględniając mechanizmy odpowiedzi immunologicznej – genomowo i pozagenomowo, nasilając ją lub wyciszając w różnych kontekstach [128-129]. Wan i wsp. wykazali wpływ GCS na modyfikację wzorców DNAm w komórkach krwinek białych [130]. Ponadto, co jest niezwykle istotne, wobec doniesień o interakcji specyficznych-otwartych domen chromatyny limfocytów (ang. lymphocyte-specific open chromatin domains, LSOs) z czynnikiem transkrypcyjnym, białkiem wiążącym sekwencję CCCTC (ang. CCCTC-binding factor, CTCF) oraz receptorem dla GCS w miejscowej zmianie struktury DNA skutkującej korzystną odpowiedzią kliniczną u chorych z ostrą białaczką limfoblastyczną (ang. acute lymphoblastic leukemia, ALL), w odróżnieniu od hipermetylowanych-„zamkniętych” domen (chorzy z GCS-oporną ALL) – DNAm może więc pełnić rolę wskaźnika odpowiedzi na leczenie GCS [131-132]. Biorąc pod uwagę powyższe, a także oddziaływanie na równowagę profilu (Th1/Th2) i aktywność limfocytów (promowanie

limfocytów regulatorowych Treg) u chorych z GD – wydaje się możliwym wpływ GCS na poziom m.in. metylacji kwasu nukleinowego komórek jednojądrzastych krwi obwodowej w GD [133]. Może to mieć odzwierciedlenie w skuteczności terapii stosowanej u tych chorych.

V.5.5. Inne zaburzenia epigenetyczne w chorobie Gravesa i Basedowa

Wśród złożonych, wieloczynnikowych mechanizmów etiopatogenezy GD, poza wspomnianymi XCI czy DNAm, zaburzenia epigenetyczne w GD wyrażają się również w roli kwasu mikro-rybonukleinowego (ang. micro-ribonucleic acid, miRNA) [134]. W pracy Zhu i wsp. poświęconej zaburzeniom metylacji RNA w komórkach mięśni okoruchowych, wskazano istotnie podwyższony poziom N6-metyloadenozyny (m6A) u chorych z GO. W pracy podkreślono podwyższoną ekspresję regulatorów metylacji m6A oraz różnicujące chorych i zdrowe kontrole szlaki wzbogacenia funkcjonalnego związane z metylacją RNA (w tym immunologicznej, zapalnej, aktywacji i różnicowania limfocytów) [135]. Różne podtypy niekodujących miRNA mogą uczestniczyć w kształtowaniu obrazu GD, a także możliwie jej przebiegu [136]. Autorzy podkreślają m.in. podwyższoną (348%) ekspresję miR-146a w komórkach jednojądrzastych GD w porównaniu ze zdrowymi kontrolami [137]. Z kolei w pracy Chena i wsp. zwrócono uwagę na obniżoną ekspresję miR-346, w GD, w komórkach T pomocniczych o profilu cząsteczek błonowych CD4+CXCR5+ i wzrost ekspresji miR-346 po leczeniu przeciwtarczycowym [134]. Odnotowano również ujemną korelację między poziomem miR-346 w komórkach limfocytów Th CD4+ i stężeniami przeciwciał TRAb, TGAb oraz TPOAb w surowicy chorych z GD. Wreszcie, zaobserwowano mniejszą ekspresję miR224-5p u chorych z umiarkowaną do ciężkiej GO, związaną również z niewrażliwością na leczenie ivGCS [138]. W badaniach poświęconych innym zaburzeniom epigenetycznym, zauważono także globalnie zmniejszony poziom acetylacji histonu H4 w komórkach krwi obwodowej chorych z GD oraz zmniejszoną ekspresję mRNA deacetylaz histonów 1 i 2 (ang. histone deacetylase 1, 2; HDAC1, HDAC2) [139].

VI Założenia i cel pracy

VI.1. Założenia projektów

Choroba Gravesa i Basedowa (GD) jest heterogenną chorobą autoimmunizacyjną dotyczącą w różnym stopniu tarczycę, tkanki oczodołu i skóry. Rozwój choroby, jej przebieg oraz odpowiedź na leczenie pozostają bardzo trudne do przewidzenia. Patogeneza GD obejmuje złożone interakcje między wieloma czynnikami genetycznymi, środowiskowymi i endogennymi. Do najlepiej poznanych czynników związanych z ciężkością nadczynności tarczycy należą: (i) młodszy wiek, (ii) duże stężenie TRAb, (iii) duże stężenia fT4 i fT3, oraz (iv) obecność wola. Z kolei rozwój GO jest silnie związany z: (i) starszym wiekiem, (ii) dużym stężeniem TRAb oraz (iii) paleniem papierosów.

W realizacji niniejszej rozprawy doktorskiej uwzględniono 2 projekty. Pierwszym, głównym projektem (Projekt 1.), było zbadanie całogenomowej DNAm u chorych z orbitopatią tarczycową, w trakcie leczenia pulsami ivGCS. Drugi projekt (Projekt 2.) stanowiło porównanie wzorców całogenomowej DNAm u dorosłych i dzieci ze świeżym rozpoznaniem GD. Badania zostały zrealizowane w jednostkach kliniczno-naukowych: Katedrze i Klinice Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego, we współpracy z Kliniką Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Badania całogenomowej DNAm zostały przeprowadzone w Zakładzie Genetyki Medycznej WUM. Była to kolejna współpraca naukowa w tematyce genetyki i epigenetyki GD między wymienionymi ośrodkami [23, 30, 34, 140].

VI.2. Cele projektów

- A. Ocena całogenomowej metylacji DNA komórek krwi obwodowej u pacjentów z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej orbitopatią tarczycową w trakcie leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami (Projekt 1.)
 - i) Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem orbitopatii tarczycowej (GO vs. HC)

- ii) Ocena związku pomiędzy zmianą wzorców całogenomowej metylacji DNA komórek krwi obwodowej, u pacjentów z umiarkowaną do ciężkiej orbitopatią tarczycową a skutecznością leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami (GO: R vs. NR)

B. Ocena całogenomowej metylacji DNA komórek krwi obwodowej u dorosłych i dzieci ze świeżym rozpoznaniem choroby Gravesa i Basedowa (Projekt 2.)

- i) Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem choroby Gravesa i Basedowa (AGD vs. HC oraz PGD vs. pHC)
- ii) Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a wiekiem rozwoju choroby Gravesa i Basedowa (AGD vs. PGD)

VII Materiał i metody

VII.1. Grupy badane

VII.1.1. Rekrutacja, kryteria włączenia do badania, Projekt 1. i Projekt 2.

Badaniem objęto następujące grupy (Rycina 2):

A. Dorośli pacjenci z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO, znajdujący się pod opieką Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

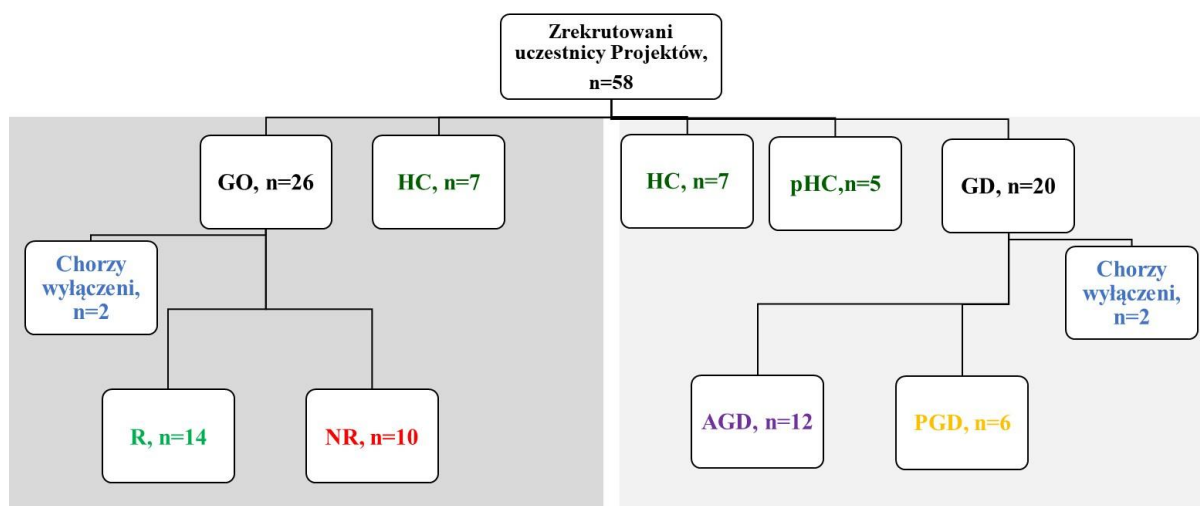
B. Dorośli pacjenci ze świeżo rozpoznaną nadczynnością tarczycy w przebiegu GD (ang. adult GD, AGD) znajdujący się pod opieką Katedry i Kliniki Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii Uniwersyteckiego Centrum Klinicznego Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

C. Dzieci ze świeżo rozpoznaną nadczynnością tarczycy w przebiegu GD (ang. pediatric GD, PGD) będące pod opieką Kliniki Pediatrii, Endokrynologii, Diabetologii z Pododdziałem Kardiologii Uniwersyteckiego Dziecięcego Szpitala Klinicznego Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku

D. Grupa kontrolna dzieci (ang. pediatric healthy controls, pHC) w wieku 6-17 lat, niebędących w ciąży, bez wywiadu aktywnego/biernego nikotynizmu, chorób autoimmunologicznych i tarczycy oraz leczenia GCS (doustnego/dożylnego, w okresie t=6 miesięcy poprzedzających przyjęcie próbki krwi).

E. Grupa kontrolna zdrowych dorosłych (ang. healthy controls, HC), niebędących w ciąży, bez wywiadu aktywnego/biernego nikotynizmu, chorób autoimmunologicznych i tarczycy oraz leczenia GCS (doustnego/dożylnego, w okresie t=6 miesięcy poprzedzających przyjęcie próbki krwi).

Rekrutacja pacjentów odbyła się po wyrażeniu przez nich świadomej zgody i podpisania formularza (KB/151/2019, zgoda Komisji Bioetycznej WUM uzyskana w dn. 07.10.2019). Z Projektu 1. wyłączono n=2 chorych (przejście jednego chorego na leczenie tocilizumabem po 6 pulsach ivGCS oraz przerywana terapia drugiej chorej, z nieoptymalną współpracą w trakcie kolejnych tygodni leczenia), w Projekcie 2. wykluczono również n=2 osoby, których próbki nie przeszły kontroli jakości po zakończeniu procedur laboratoryjnych.



Rycina 2. Schemat obejmujący grupy badane i kontrolne uczestników Projektów. Pacjenci zgodnie z podziałem wg właściwych projektów: a. Projekt 1. (tło ciemnoszare) poświęcony związkowi DNAm z obrazem i leczeniem przy pomocy ivGCS aktywnej umiarkowanej do ciężkiej GO oraz b. Projekt 2. (tło jasnoszare), dotyczący porównania obrazu DNAm w grupach dorosłych i dzieci z GD bez wcześniej prowadzonego leczenia przeciwtarczycowego.

Objaśnienia skrótów: AGD – dorośli chorzy z chorobą Gravesa i Basedowa, GD – choroba Gravesa i Basedowa, GO – orbitopatia tarczycowa, HC – grupa kontrolna dorosłych, NR – grupa bez odpowiedzi na leczenie

glikokortykosteroidami dożylnymi, PGD – dzieci z chorobą Gravesa i Basedowa, pHG – grupa kontrolna dzieci, R – grupa z odpowiedzią na leczenie glikokortykosteroidami dożylnymi

VII.1.2. Rekrutacja uczestników, kryteria włączenia do badania, Projekt 1.

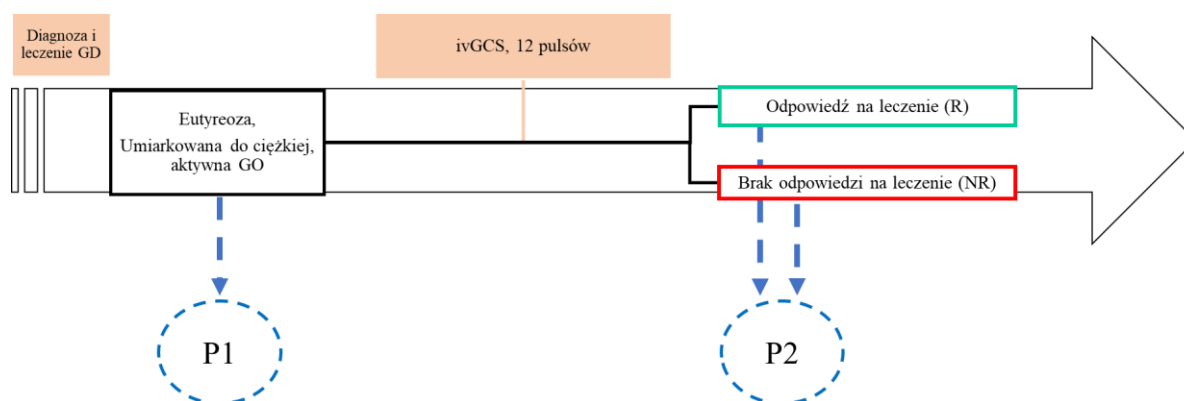
Kryteria włączenia do badania chorych uczestników dla Projektu 1. były następujące:

1. GO aktywna. Aktywność orbitopatii oceniono zgodnie z zaleceniami EUGOGO [67] na podstawie 7-punktowej skali CAS: 1) samoistny ból pozagałkowy, 2) ból przy ruchach oczu, 3) obrzęk powiek, 4) obrzęk spojówek, 5) obrzęk mięśnia łzowego, 6) zaczerwienienie powiek i 7) nadržknięcie spojówki). GO była klasyfikowana jako aktywna, jeśli CAS wynosił $\geq 3/7$
2. GO umiarkowana do ciężkiej. Ciężkość GO oceniono wg zaleceń EUGOGO [67]. U chorych stwierdzono co najmniej 2 z poniższych objawów: retrakcja powiek > 2 mm, umiarkowane lub ciężkie objawy ze strony tkanek miękkich, wytrzeszcz > 3 mm powyżej normy, niestałe lub stałe podwójne widzenie.
3. Eutyreoza kliniczna i laboratoryjna
4. Podpisanie formularza świadomej zgody
5. Wiek ≥ 18 r.ż.

Kryteria wykluczenia z badania dla Projektu 1.:

1. GO łagodna lub zagrażająca utratę wzroku
2. GO nieaktywna
3. Stosowanie GCS do 6 miesięcy przed włączeniem ivGCS (doustne lub dożylne)
4. Niespełnienie eutyreozy klinicznej i laboratoryjnej przed włączeniem leczenia ivGCS

VII.1.3. Protokół Projektu 1.



Rycina 3. Protokół Projektu 1. Objasnienia skrótów: ivGCS – glikokortykosteroidy dożylnie, GD – choroba Gravesa i Basedowa, GO – orbitopatia tarczycowa, NR – grupa bez odpowiedzi na leczenie glikokortykosteroidami dożylnymi, P1 – punkt 1. badania, P2 – punkt 2. badania, R – grupa z odpowiedzią na leczenie glikokortykosteroidami dożylnymi

Zależnie od nasilenia choroby, chorzy otrzymali standardowe warianty leczenia ivGCS wg zaleceń EUGOGO [67]. Tak więc, pacjenci z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO byli leczeni ivMP w dawce 0,5 g przez 6 pierwszych tygodni oraz 0,25 g przez kolejne 6 tygodni (sumaryczna dawka 4,5 g ivMP/12 tygodni) lub, odpowiednio, 0,75 g i 0,5 g (kulminacyjna dawka 7,5 g ivMP/12 tygodni). Z badania wyłączono 2 chorych: 1 pacjent nie stosował się do założonego schematu leczenia, drugi otrzymał leczenie drugiego rzutu tocilizumabem po ocenie skuteczności leczenia w 6. tygodniu terapii ivGCS.

Kryteria odpowiedzi na leczenie ivGCS zostały przyjęte następująco, przy założeniu spełnienia 2 cech w jednym oku oraz nieobecności pogorszenia cech w drugim oku (na podstawie modyfikowanego wskaźnika Composite index [67, 79]):

- i) Redukcja szerokości szpary powiekowej ≥ 2 mm
- ii) redukcja wytrzeszczu ≥ 2 mm
- iii) poprawa ruchomości w którymkolwiek kierunku lub poprawa w zakresie podwójnego widzenia (o 1 stopień w 4-stopniowej skali Gormana; podwójne widzenie nieobecne/przejściowe/niestałe/stałe[141])
- iv) spadek w CAS o ≥ 2 punkty

W oparciu o ich spełnienie wyodrębniono 2 grupy poddane dalszym analizom, tj. grupę R (ang. response group, R; n=14) i grupę NR (no-response group, NR; n=10). Zebrane zostały dane kliniczne chorych, obejmujące: płeć, wiek, objętość i obraz tarczycy w badaniu ultrasonograficznym, wywiady nikotynizmu oraz rodzinnego występowania AITD.

Wreszcie, obwodowa krew żylna chorych z GO została pobrana w dwóch punktach czasowych (Rycina 3., P1 i P2). Pobrano 1 próbkę krwi do badań epigenetycznych przed włączeniem leczenia ivGCS (próbka 1., P1) oraz po jego zakończeniu (próbka 2., P2). Wykonano pomiary stężenia parametrów: TSH, fT4, fT3, TRAb w grupie GO (dwukrotnie, P1 i P2, Rycina 1.), podczas gdy w grupie kontrolnej (HC) jednokrotnie oznaczono stężenie TSH.

VII.1.4. Rekrutacja uczestników, kryteria włączenia do badania, Projekt 2.

Kryteria włączenia do badania dla Projektu 2. były następujące:

1. Świeżo rozpoznana nadczynność tarczycy potwierdzona badaniami biochemicznymi (obniżone stężenie TSH, podwyższone stężenia wolnych hormonów tarczycy) [71]
2. Rozpoznanie GD zgodne z zaleceniami ETA. U wszystkich chorych stwierdzono zwiększone stężenie przeciwciał przeciwko TSH-R (TRAb) oraz niejednorodną echostrukturę i wzmożone unaczynienie w badaniu USG tarczycy [71].
3. Wiek ≥ 18 r.ż. dla AGD
4. Wiek ≥ 5 r.ż. i < 18 r.ż. dla PGD
5. Podpisanie formularza świadomej zgody

Kryteria wykluczenia z badania, dla Projektu 2:

1. Wcześniejsze leczenie przeciwtarczycowe
2. Stosowanie GCS (doustne lub dożylne) do 6 miesięcy przed włączeniem do badania

VII.1.5. Protokół Projektu 2.

Wszyscy chorzy (AGD, PGD) nie byli leczeniu przeciwtarczycowo przed włączeniem do badania. Analizie poddano również zebrane dane kliniczne, jak: wywiady rodzinne w kierunku AITD, palenia tytoniu, obrazu USG gruczołu tarczowego, wykładników biochemicznych czynności tarczycy (TSH, fT4, fT3) i markerów immunologicznych (TRAb), podczas gdy stężenie TSH oznaczono dla grup kontrolnych (HC, pHC). Pobrano 1 próbkę krwi do badań epigenetycznych od osób z grup kontrolnych oraz w dniu przyjęcia chorego do oddziału endokrynologicznego (lub poradni) z podejrzeniem/rozpoznanie GD (index day) i podpisania przez niego formularza świadomej zgody uczestnictwa.

VII.2. Metody laboratoryjne

W celu zbadania DNAm w projektach niniejszej rozprawy doktorskiej zdecydowano o wykorzystaniu metody sekwencjonowania nowej geenracji (next generation sequencing, NGS), zredukowanego reprezentacyjnego sekwencjonowania bisulfitowego (ang. reduced representation bisulfite sequencing, RRBS) [142-143]. Technika ta umożliwia analizę większej

puli DMRs w porównaniu z badaniami opartymi na mikromacierzach oraz jest dokładniejsza w porównaniu z metodami opartymi o przeciwciała wiążące wiążących 5-MC (Methylated DNA Immuno-Precipitation Sequencing, MeDIP-seq) [144-145]. W RRBS ocenie poddawane są reprezentatywne regiony – szczególnie bogate w dinukleotydy CpG, a dokładniej ok. 85% wszystkich CGI oraz promotory większości genów, co istotnie zmniejsza koszt badań w porównaniu z WGBS oraz zachowuje sens pod względem funkcjonalnej (analiza CGI zorientowanych w okolicy promotorów genów) oceny metylomu [144-145].

W metodach opartych na NGS, do odczytu sekwencji i detekcji stosunku zmetylowanych i niezmetylowanych cytozyn wykorzystuje się krótkie sekwencje, uzyskiwane wcześniej poprzez trawienie DNA specyficzną restryktazą, oraz amplifikuje przygotowany odpowiednio materiał (końce DNA z przyłączonymi, indeksowanymi adapterami). Przed sekwencjonowaniem należy przygotować bibliotekę metylo-DNA (metylacyjną). Badania epigenetyczne na potrzeby niniejszej rozprawy zostały wykonane w Zakładzie Genetyki Medycznej WUM.

VII.2.1. Materiał biologiczny

Od uczestników pobrano 5 ml żyłnej krwi obwodowej, próbki zabezpieczono z zastosowaniem kwasu etylenodiaminotetraoctowego (ang. ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA), następnie materiał zamrożono (temp. -20 °C) do czasu dalszych oznaczeń.

VII.2.2. Izolacja DNA i ocena ilościowa uzyskanego materiału

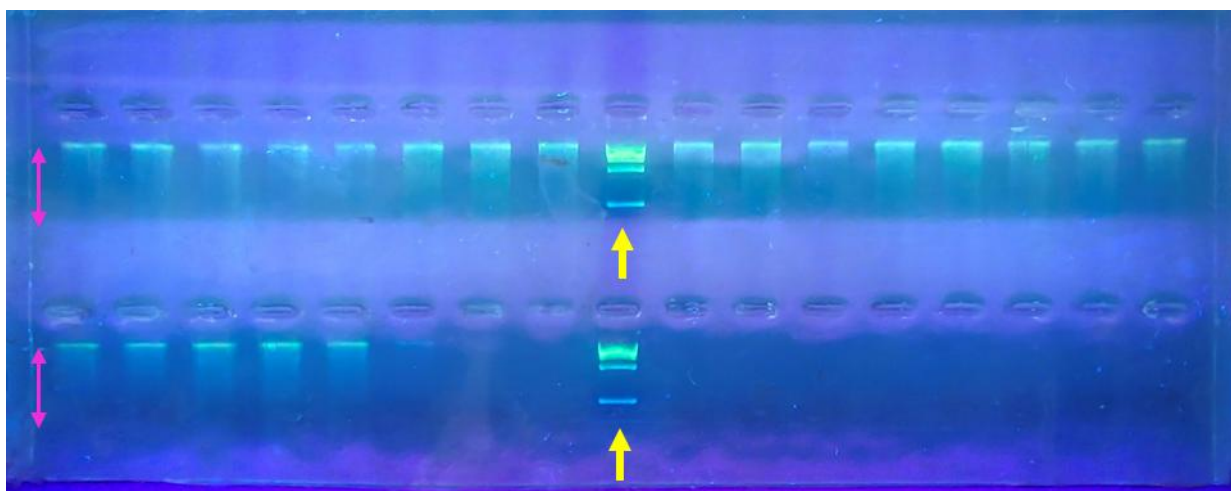
Materiał wyizolowano przy pomocy półautomatycznego urządzenia Maxwell przy pomocy zestawu Genomic Maxwell RSC Whole Blood DNA Kit (Promega Corporation, USA) opierając się na zaleceniach producenta. Po izolacji, ilość uzyskanego materiału zmierzono przy pomocy spektrofotometru NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, NanoDrop product, Wilmington, DE, USA). Próbkę z zakresem optycznej gęstości OD260/OD280 od 1,8 do 2,0 były satysfakcjonujące. Główną walidację jakości materiału stanowił odczyt fluorometru (w dwóch pomiarach, uzyskując wartość średnią stężenia DNA) – Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific, Invitrogen, Waltham MA, USA) wykorzystując zestaw High/Broad Sensitivity Kit (Invitrogen, USA). Podtyp użytego zestawu odczytników do odczytu dla Qubit 3.0, był uzależniony od stężenia wyjściowego DNA uzyskanego po izolacji, zgodnie z zaleceniami producenta.

VII.2.3. Przygotowanie bibliotek metylacyjnych

Biblioteki DNA bogate w zmetylowane fragmenty wykonano na stanowisku do tworzenia bibliotek wg protokołu NEXTFLEX i zaleceń producenta, z użyciem zestawu Bisulfite Seq Library Prep kit (PerkinElmer, Austin, USA). Po ustąpieniu produkcji tego zestawu, do przygotowania kolejnych bibliotek DNA (n=24 próbki) użyto zestawu Zymo-seq RRBS Library kit (ZYMO Research, USA). Wyjściowo, ilość DNA próbek, stanowiącego materiał do trawienia enzymem restrykcyjnym zawierał się w zakresie zgodnym z zaleceniami producenta. Stosowano kulki magnetyczne w celu uzyskania bibliotek DNA o określonych długościach par zasad („size selection”).

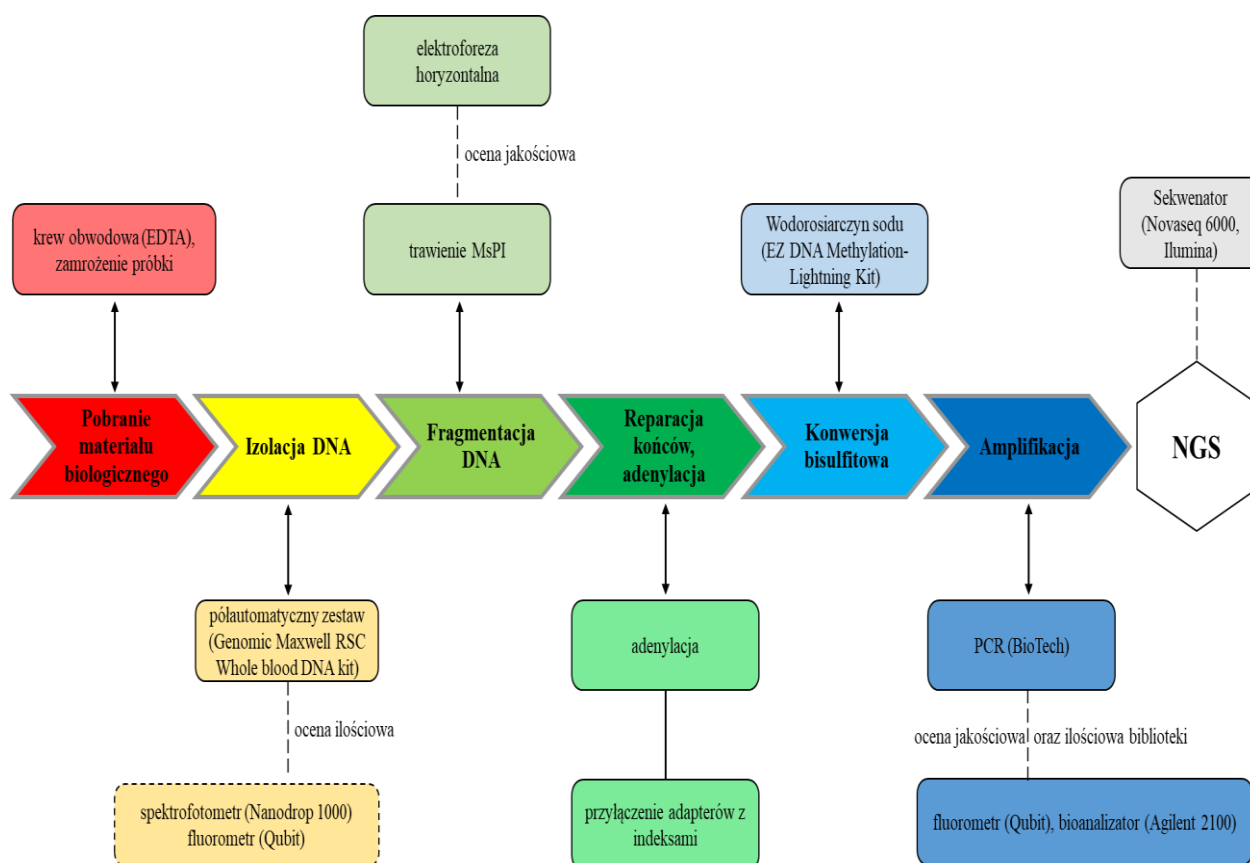
VII.2.3.1. Fragmentacja wyizolowanego DNA oraz ocena jakościowa materiału

Trawienie uzyskanego w procesie izolacji DNA wykonano przy użyciu DNA metylo-specyficznego (regiony CCGG) enzymu restrykcyjnego MsPI (New England Biolabs, Inc, USA). Po fragmentacji wykonano elektroforezę horyzontalną w celu weryfikacji powodzenia procesu (Rycina 4.)



Rycina 4. Zdjęcie elektroforezy horyzontalnej. Użyto 2% roztwór agarozy, barwnik Midori Green, Nippon Genetics Europe GmbH, w buforze 1xTBE: Tris, kwas borowy, EDTA. Stan po trawieniu materiału DNA enzymem restrykcyjnym MSPI (uzyskano rozdziały materiału genetycznego, tzw. smear, **strzałka różowa**). Rozdział prowadzono przez 30 minut, napięcie U=100V. **Strzałką żółtą** oznaczono referencję drabiny (wystandaryzowanych fragmentów DNA o różnicowanej długości par zasad).

Objaśnienia skrótów: EDTA – kwasu etylenodiaminotetraoctowy, DNA – kwas deoksyrybonukleionowy, MSPI – restryktaza MSPI



Rycina 5. Zestawienie metod laboratoryjnych zastosowanych podczas Projektów. Obejmowały kolejno: pobranie i zabezpieczenie materiału biologicznego (kwas etylenodiaminotetraoctowy, EDTA), izolację i fragmentację DNA (MsPI – restryktaza), stworzenie biblioteki metylomowej (w tym amplifikację, reakcję łańcuchowej polimerazy PCR) oraz sekwencjonowanie nowej generacji (NGS; RRBS).

VII.2.3.2. Reparacja końców, adenylacja i konwersja bisulfitowa

W celu zapewnienia możliwości odbycia amplifikacji mostkowej podczas sekwencjonowania, do próbek z DNA dodano dedykowane oligonukleotydy (do obu końców łańcuchów) – adaptory. Dzięki wbudowanym krótkim i unikalnym sekwencjom (indeksom) adapterów, etap ten warunkuje późniejsze przypisanie odczytów do próbek, a wcześniej zaś zapewnia mieszanie prób i zwiększenie wydajności procesu sekwencjonowania.

Etap konwersji bisulfitowej jest jednym z istotniejszych kroków powstawania bibliotek metylacyjnych, a kluczowym szczególnie w kontekście perspektywy rozróżnienia zmetylowanych i niezmetrylowanych cytozyn DNA. W tym etapie (po denaturacji łańcuchów DNA) stosuje się wodorosiarczyn sodu (NaHCO_3). Dzięki temu niezmetrylowane cytozyny ulegają konwersji do uracylu na drodze oksydatywnej deaminacji, a te zmetylowane nie

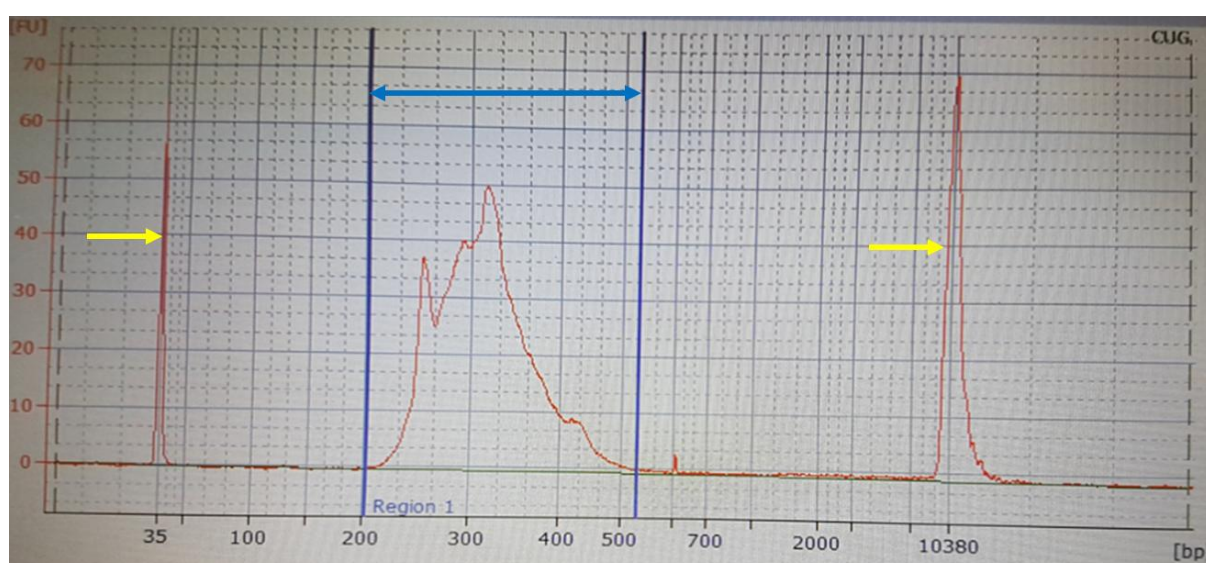
podlegają reakcji – pozostając niezmienione. Reakcja ta została wykonana przy użyciu zestawu EZ DNA Methylation-Lightning Kit (ZYMO Research, USA), zgodnie z zaleceniami producenta.

VII.2.3.3. Amplifikacja

Uzależniając liczbę cykli od stężenia wyjściowego DNA (14-18x; zminimalizowano tym samym błędy generowane przez polimerazę DNA w trakcie katalizy reakcji), wykonano amplifikację DNA przy pomocy PCR (ang. polymerase chain reaction, PCR), zgodnie z zaleceniami producenta.

VII.2.3.4. Ocena ilościowa i jakościowa biblioteki

Otrzymane fragmenty długości 350-400 bp zostały poddane ocenie jakości przy pomocy fluorymetrii i aparatu Qubit 3.0 oraz zestawu High/Broad Sensitivity Kit (w dwóch pomiarach, uzyskując wartość średnią stężenia), a także zestawu bioanalizatora Agilent 2100, DNA 1000 kit (Agilent Technologies, USA). Znormalizowana molarność każdej biblioteki wyniosła 4 nmol (tzw. insert size, przed następnym etapem sekwencjonowania; parametr zależny od masy molowej i stężenia bibliotek), zgodnie z zaleceniami producenta. Wszystkie próbki Projektu 1. spełniły warunki jakości (łącznie n=55) bibliotek metylacyjnych. Z Projektu 2. wyłączono 2 próbki (z grupy PGD) niespełniające standardu jakości, otrzymując n=30 bibliotek metylacyjnych.



Rycina 6. Przykład prawidłowej biblioteki metylacyjnej. Wielkości odczytanych fragmentów DNA odpowiadają wartości fluorescencji. Średnia długość biblioteki w parach zasad wynosiła 319 bp (maksymalna wartość

fluorescencji dla próby), zakres: 203-534 bp. Bioanalyzer Agilent 2100, DNA 1000 kit (Agilent Technologies, USA). Oznaczenia: **strzałka niebieska** – zakres długości biblioteki, **strzałki żółte** – absorbancja drabin referencyjnych: krótkich (po stronie lewej) oraz długich (po prawej) wystandaryzowanych fragmentów DNA.

Skróty: bp – liczba par zasad (ang. base pairs), FU – jednostki fluorescencyjne (ang. fluorescent units)

VII.2.4. Sekwencjonowanie nowej generacji

Procedura sekwencjonowania została wykonana w trybie RRBS, na Sekwencjonatorze NovaSeq 6000 System, Illumina, USA, na bazie sekwencjonowania przez syntezę (ang. sequencing by synthesis) oraz tworzenia klastrów (ang. cluster generation) zgodnie z zaleceniami producenta. Uzyskano 50 milionów par odczytów/próbkę.

VII.2.5. Oznaczenia parametrów funkcji tarczycy oraz przeciwciał tarczycowych

Oznaczenie parametrów funkcji tarczycy (TSH, fT4, fT3) oraz przeciwciał przeciwciężkich (TRAb) w surowicy wykonano przy pomocy elektrochemiluminescencji (Roche Diagnostics, Elecsys, Cobas analyzer).

VII.3. Analiza wyników

VII.3.1. Analiza bioinformatyczna

Oprogramowanie RTA (Real Time Analysis) zostało użyte do przekazu danych po procedurze sekwencjonowania, uzyskując pliki rozpoznania nukleotydów. Otrzymano pliki w formatach: cBCL, bam, IGV. Sekwencje adapterowe zostały usunięte przed dalszymi analizami przy pomocy programu Cudapat. Otrzymane odczyty zostały poddane jakościowej ocenie i zmapowane na ludzki genom referencyjny (wersja hg19). Dokonano oceny pod kątem jakości sekwencjonowania próbek (pliki fastQ), w tym w odniesieniu do wszystkich próbek grupy uwzględniając zawartość 5-MC, cytozyn (ang. cytosine, C), stopnia pokrycia próbek (parametr informujący o krotności poprawnego zsekwencjonowania oraz odczytu dla danej pozycji). Użyto programu konfiguracyjnego YAML config.yaml). Nie akceptowano odczytów z pokryciem niższym niż dziesięciokrotne (10x).

VII.3.2. Analiza statystyczna

Obliczenia statystyczne i analizy badania zostały wykonane w oparciu o środowisko R software z modulem Methyl-kit (Boston, MA), a także program SAS (wersja 9.4, SAS Institute Inc., USA).

Intencją analiz w obrębie Projektów 1. i 2. była ocena DNAm w kilku kontekstach. Pierwszym aspektem była analiza opisowa wzorców metylacyjnych dla 1) pojedynczych dinukleotydów (CpG) oraz 2) konkretnych, założonych regionów odniesienia (mapowanych CpG) analizy, odpowiednio: 2a) regionów promotorowych genów (sekwencje w łącznej odległości 2000 bp wokół miejsca startu transkrypcji; ang. transcription start site, TSS), 2b) genowych (ang. genes) i 2c) wysp CpG (CGI) z obrzeżami („shores”), a także 3) całogenomowych różnic w DNAm na poziomie chromosomów autosomalnych i 4) znamiennych zgodnych regionów przedstawionych w pracy Xin i wsp. (poświęconej DNAm w GO [122]). Zastosowano w tym celu analizę głównych komponentów składowych (ang. principal component analysis, PCA), służące do porównania profilu DNAm różnych grup względem siebie, a także prezentację graficzną wzorców DNAm w skali globalnej („hierarchical” heatmaps, tzw. „map cieplnych”) lub dla topowych CpG („differential” heatmaps) dla grup oraz graficznego podsumowania dystrybucji DMRs w chromosomach oraz różnic stopnia DNAm w skali wszystkich chromosomów. Pod pojęciem „globalnej” DNAm przyjmowano całogenomowe wzorce metylacyjne i stopień DNAm, w kontekście istoty metody RRBS, gdzie analizie poddawane są funkcjonalne elementy genomu – wzbogacenia, z naciskiem na lokalizację i zagęszczenie CGI oraz promotorów genów.

W Projekcie 1. zaplanowano wykonanie porównania wzorców DNAm dla następujących przypadków:

- i) między chorymi z GO i zdrowymi kontrolami (GO vs. HC)
- ii) pomiędzy chorymi z GO w zależności od odpowiedzi na leczenie ivGCS (grupy R vs. NR)
- iii) analizy ze stratyfikacją obrazu klinicznego i fenotypu

W Projekcie 2. uwzględniono następujące porównania wzorców DNAm:

- i) między chorymi z GD i kontrolami w zależności od wieku (AGD vs. HC, PGD vs. pHC)
- ii) między chorymi dorosłymi i dziećmi z GD (AGD vs. PGD)
- iii) analizy ze stratyfikacją obrazu klinicznego i fenotypu

Drugim podejściem była różnicowa ocena globalnego poziomu DNAm w postaci stosunku 5-MC do niezmetylowanych cytozyn C (ang. 5-methylcytosine:cytosine ratio, 5-MC:C) dla całych próbek, w porównaniu grupowym. Istotna różnica w średnim stopniu DNAm danej pozycji CpG (DNAm danej pozycji: stosunek 5-MC:C; różnica w stopniu DNAm: tzw. „methylation difference”, $\Delta\beta$), umożliwiającą uwzględnienie tej pozycji w dalszych analizach statystycznych (ustalenie znamienności pozycji CpG), wynosiła minimum 25% (0,25) [146-149]. W podejściu tym użyto uśrednionych wartości DNAm dla grupy, na podstawie średnich DNAm próbek w obrębie członków grupy. Dla znamiennych pozycji sygnatur metylacyjnych wyznaczono miejsce rankingowe odniesienia istotności pozycji. W analizach nie ujęto chromosomów płciowych. Analizy porównawcze stopnia DNAm na poziomie CpG oraz globalnych wykonano dla tożsamy, opisanych powyżej analiz wzorców i)-iii) obu projektów.

W Projekcie 1., przy użyciu modułu methyl-kit oceniono ponadto procentowe zmiany średniego stosunku 5-MC:C dla regionów u indywidualnych chorych po leczeniu ivGCS.. Wykonano też subanalizy z intencją wyznaczenia predykcyjnych sygnatur metylacyjnych dla powodzenia leczenia ivGCS oraz w zależności od fenotypu: stan po tyreidektomii, leczeniu RAI, w zależności od palenia papierosów – w punkcie P1 protokołu Projektu 1. lub jednoczesnego stosowania ORTH oraz w zależności od dawki ivGCS (kumulatywna dawka 7,5 g vs. 4,5 g) – w punkcie P2.

Kolejną formą oceny DNAm była analiza wzbogacenia funkcjonalnego (ang. functional enrichment analysis), gdzie podjęto próbę odniesienia znalezionych różnic w DNAm do znanych baz danych szlaków biologicznych. Do tego celu, za referencję, przyjęto bazę KEGG (ang. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) oraz Gene Ontology (ang. GeneO). Istotne CpG zostały zmapowane na najbliższy sąsiadujący region kodujący.

Nazwy genów uwzględnionych w grafikach i tekście wytypowano w oparciu o nomenklaturę bazy HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee). Lokalizację DMCs (ang. differentially methylated cytosine, odpowiadającym CpG) i odpowiadających im *loci* względem startu miejsca transkrypcji (TSS) ujęto w odniesieniu do odczytu nici DNA (5'>3'): powyżej (ang. upstream) / wewnątrz (ang. inside) / poniżej (ang. downstream). Za region odpowiadający promotorowi przyjęto odległości: -1000 bp do +1000 bp względem TSS, a obrzeża CGI (ang. CGI shores) $\pm$ 2000 bp, flankujące odpowiadające CGI. Powyższe założenia dotyczyły również kolejnych prezentacji rezultatów analiz projektów w całej sekcji wyników (VIII.)

W analizach uwzględniono dane ilościowe i jakościowe. Dla zmiennych końcowych ilościowych wykonano odpowiednie dwustronne testy: Wilcoxona (nieparametryczny) oraz t-studenta (parametryczny), a dla jakościowych dokładny test Fishera (lub Chi kwadrat). Za poziom istotności p (ang. p value, p) przyjęto wartości $<0,05$. W ocenie średniej różnicy DNAm stosowano poprawkę dla dystrybucji „MN” (ang. maximum-normal) w celu uniknięcia zjawiska nadmiernej dyspersji oraz poprawkę dla wielokrotnych porównań w celu zminimalizowania wyników fałszywie pozytywnych. Przyjęto $q < 0,01$ (ang. q value, q) dla metody FDR (false discovery rate) i „p.adjusted” (p.adjust. $<0,05$) wg Benjamina-Hochsberga. Wyniki ilościowe zostały przedstawione w formie mediany (ang. median, mdn) z zakresem międzykwartylowym (ang. interquartile range, IQR; q1-q3; 25%-75%) lub średniej z odchyleniem standardowym (ang. standard deviation, stdev) oraz wartości procentowych. Do prezentacji wyników użyto tabel, rycin, grafik cieplnych („heatmaps”), PCA, a także wykresów wulkanicznych i o typie „lollipop”.

VIII Wyniki

VIII.1. Wyniki Projektu 1.

VIII.1.1. Charakterystyka chorych Projektu 1.

W Tabeli 3. przedstawiono charakterystykę kliniczną chorych włączonych do Projektu 1. – pacjentów z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO. Stanowi podsumowanie danych klinicznych i biochemicznych grupy 24 chorych (mediana wieku 49,5 lat) przed włączeniem leczenia ivGCS oraz porównanie grup z odpowiedzią (R) i bez odpowiedzi (NR) na ivGCS (Tabela 3.). Siedem osób zdrowych (6 kobiet) z medianą wieku 29 (25-40) lat stworzyło grupę kontrolną (HC), prezentując medianę stężenia TSH 2,5 (2.00-3.00) uIU/ml. Chorzy nie różnili się istotnie w zakresie wyjściowych parametrów immunologicznych (TRAb) oraz biochemicznych (czynności tarczycy), a także większości danych klinicznych. Odnotowano znamienne różnice w obszarze cech ciężkości i aktywności GO pomiędzy grupami R i NR. Nie uchwycono istotnych różnic między grupami chorych względem odpowiedzi na leczenie, w zakresie cech biochemicznych i wywiadów dotyczących poprzedzającego leczenia GO (Tabela 3.). Grupa R prezentowała istotnie niższą aktywność orbitopatii tarczycowej, a także istotnie mniej zaawansowane wysuniecie gałki ocznej, retrakcji powiek oraz szerokości szpary powiekowej po ukończonym leczeniu. Przedstawiono analizy dla oka prawego, objętego procesem chorobowym o statystycznie większej aktywności i ciężkości.

VIII.1.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem orbitopatii tarczycowej oraz skutecznością leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami.

VIII.1.2.1 Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem GO.

W analizie globalnego profilu DNAm w grupie wszystkich chorych z GO (n=24) i zdrowych kontroli dorosłych (HC, n=7) wykazano hipometylację GO. Uzyskano następującą średnią różnicę w stopniu globalnej DNAm: -13,14% (względem grupy badanej – GO). Grupy różniły się profilem metylacji (hipometylacja GO) w skali wszystkich chromosomów (hipometylacja

GO, Rycina 9.), a także w ramach całościowej prezentacji wzorców przy pomocy heatmap (Rycina 8.).

Tabela 3. Charakterystyka pacjentów z umiarkowaną do ciężkiej GO z uwzględnieniem podziału względem odpowiedzi na leczenie ivGCS (grupy: R – n=14, NR – n=10), wg protokołu Ryciny 3.

Cecha	Umiarkowana do ciężkiej GO, n=24	R, n=14	NR, n=10	p*
Wiek, lata, mdn (IQR)	49,5 (41,5-65)	51,5 (43-66)	49,5 (35-64)	ns
Kobiety, n (%)	19 (79,17%)	12 (85,71%)	7 (70%)	ns
Nikotynizm, n (%)	17 (70,83%)	10 (71,43%)	7 (70%)	ns
Wywiady rodzinne AITD, n (%)	8 (35,71%)	5 (38,46%)	3 (30%)	ns
Cechy AITD w USG tarczycy, n (%)	24 (100%)	14 (100%)	10 (100%)	ns
Weześniejsze leczenie GD				
ATD, n (%)	24 (100%)	14 (100%)	10 (100%)	ns
RAI, n (%)	5 (20,83%)	2 (14,29%)	3 (30%)	ns
Operacyjne, n (%)	7 (29,17%)	2 (14,29%)	5 (50%)	ns
ORTH (2000 cGy/tydzień), n (%)	5 (20,83%)	3 (21,43%)	2 (20%)	ns
Kumulatywna dawka ivGCS (t=12 tygodni leczenia)				
7,5 g, n (%)	6 (25%)	5 (35,71%)	1 (10%)	ns
4,5 g, n (%)	18 (75%)	9 (64,29%)	9 (90%)	
TSH [uIU/ml], mdn (IQR), P1	1,35 (0,635-1,99)	1,75 (0,73-2,28)	1,095 (0,4-1,4)	ns
fT3 [pmol/l], mdn (IQR), P1	4,365 (3,875-4,56)	4,19 (3,93-4,55)	4,4 (3,82-4,67)	ns
fT4 [pmol/l], mdn (IQR), P1	16,1 (14-19,625)	14,45 (13,6-17,5)	19,05 (14,7-19,9)	ns
TRAb [IU/l], mdn (IQR), P1	8,165 (3,995-17,05)	6,9 (4,04-14,6)	13,25 (3,95-31,42)	ns
TRAb [IU/l], mdn (IQR), P2	-	2,12 (1,17-3,37)	6,1 (2,14-11,45)	ns
CAS, mdn (IQR) – OD, P1	4 (3-4)	3,5 (3-4)	4 (3-4)	ns
CAS, mdn (IQR) – OD, P2	-	1 (0-1)	2 (2-3)	0,0002
Cechy GO – OD, P1				
Wysunięcie gałki ocznej [mm], mdn (IQR)	22,25 (19-23,5)	19,5 (18-21,5)	23,5 (23-26)	0,0031
Niedomykalność powieki [mm], mdn (IQR)	0 (0-1)	0 (0-1)	0 (0-1)	ns
Retrakcja powieki [mm], mdn (IQR)	0,25 (0-1)	0 (0-0)	1 (1-2)	0,0007
Szerokość szpary powiekowej [mm], mdn (IQR)	10 (9-11)	9,5 (8-11)	11 (11-13)	0,027
Podwójne widzenie, n (%)	20 (83,33%)	13 (92,86%)	7 (70%)	ns
Cechy GO – OD, P2				
Wysunięcie gałki ocznej [mm], mdn (IQR)	-	19 (17-20,5)	24,5 (22,5-25,5)	0,0006
Niedomykalność powieki [mm], mdn (IQR)	-	0 (0-0)	0 (0-1)	ns
Retrakcja powieki [mm], mdn (IQR)	-	0 (0-0)	1 (0-2)	0,012
Szerokość szpary powiekowej [mm], mdn (IQR)	-	9 (7-10)	12 (11-13)	0,007
Podwójne widzenie, n (%)	-	10 (71,43%)	7 (70%)	ns

Objaśnienia skrótów: AITD – autoimmunologiczna choroba tarczycy, CAS – skala aktywności orbitopatii tarczycowej, cGy – centygrej, fT3 – wolna trijodotyronina, fT4 – wolna tyroksyna, GO – orbitopatia tarczycowa, IQR – zakres międzykwartyłowy, ivGCS – dożylnie glikokortykosteroidy, NR – grupa bez odpowiedzi na leczenie ivGCS, ns – nieistotność statystyczna, OD – oko prawe, ORTH – radioterapia oczodołów, p – wartość istotności

statystycznej ($p < 0,05$; dot. kolumn: R vs. NR), P1 – punkt 1., P2 – punkt 2., R – grupa z odpowiedzią na leczenie ivGCS, TRAb – przeciwciała przeciw receptorowi dla tyreotropiny, TSH – tyreotropina, USG – ultrasonografia

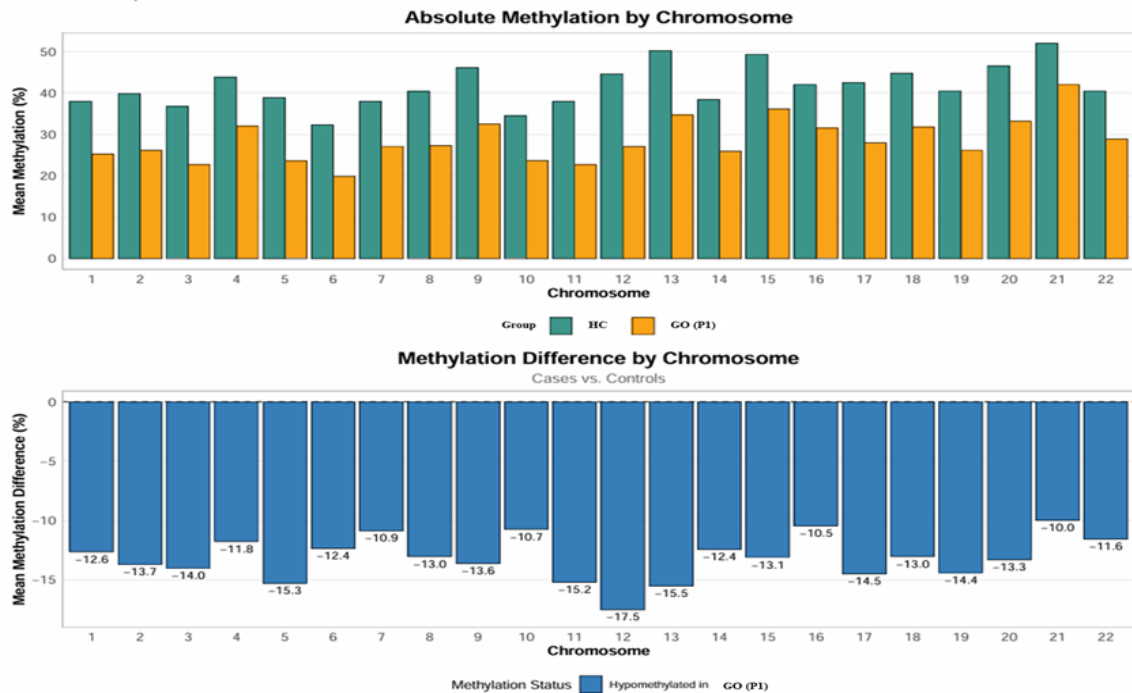
W analizie głównych komponentów składowych (PCA) wykazano wyraźne grupowanie próbek GO i HC (Rycina 9.).

Wszystkie odnotowane DMRs zostały podsumowane pod kątem dystrybucji w genomie w ramach Ryciny 10. W analizie różnicowej między grupami odnotowano 14357 odmiennie zmetylowanych cytozyn (CpGs, również ang.: differentially methylated cytosines, DMCs), z czego 2894 pozycji CpG było istotnych statystycznie. Na Rycinie 11. w formie wykresu wulkanicznego zobrazowano komplet istotnych CpG z uwzględnieniem podziału ze względu na regiony o przewadze wzorca metylacji. Wśród DMRs były 1492 istotne CpG mapowane na regiony promotorowe (51,55%), 1882 istotne regiony CGI (65,03%), a 749 regionów (25,88%) stanowiły obrzeża CGI. Zidentyfikowano 2254 *loci* w oparciu o nomenklaturę HGNC. Podsumowanie wybranych ($n=108$), najważniejszych i zróżnicowanych funkcjonalnie oraz klinicznie pseudogenów/genów w sąsiedztwie odkrytych istotnych CpG przedstawiono w Tabeli 4a-d. Znak poprzedzający wartość różnicy stopnia metylacji informuje o hipometylacji (minus), wartości dodatnie przedstawiają hipermetylację (względem grupy badanej).

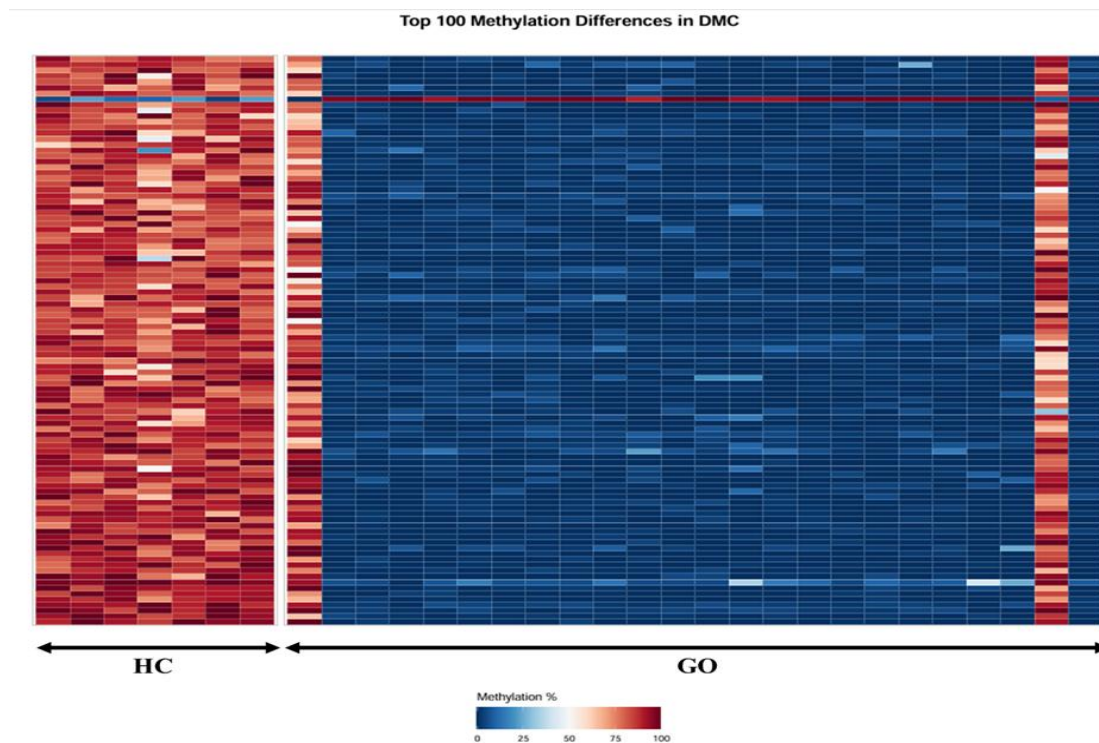
Poza zaprezentowanymi regionami, w analizie odkryto CpG w innych regionach m.in. licznych pseudogenów i genów białek odpowiedzi immunologicznej (*CKS2*, *IFNARI*, *IL17RD*), macierzy pozakomórkowej (np. *COL6A1*, *TSPAN*), transportowych, sygnalizacji i łączności międzykomórkowej (m.in. *SCAMP1*, *SCAND1*, *SCN3B*, *TMEM* oraz *CAMK*, *CRABP1*, *ELFN1*, *SERPINE1*), czynników wzrostu i cyklu komórkowego (*FGF*, *FGFR*, *GDF*, *MAPK*, *NCL*, *RASA1*, *VEGFC*) oraz mechanizmów epigenetycznych (*MIR*, *HDAC* oraz licznych genów białek z motywem palca cynkowego, w tym: *ZCCHC*, *ZDHHC*, *ZFP*, *ZGPAT*, *ZMIZ*, a także 18 z samej rodziny *ZNF*). Do hipermetylowanych ($n=24$) regionów należały m.in.: *TNNI3K*, *ELFN1*, *ZMIZ1*, *MUC20*, *POTEB*.

Chromosome Methylation Analysis

Based on 14357 CpG sites, 24 cases and 7 controls

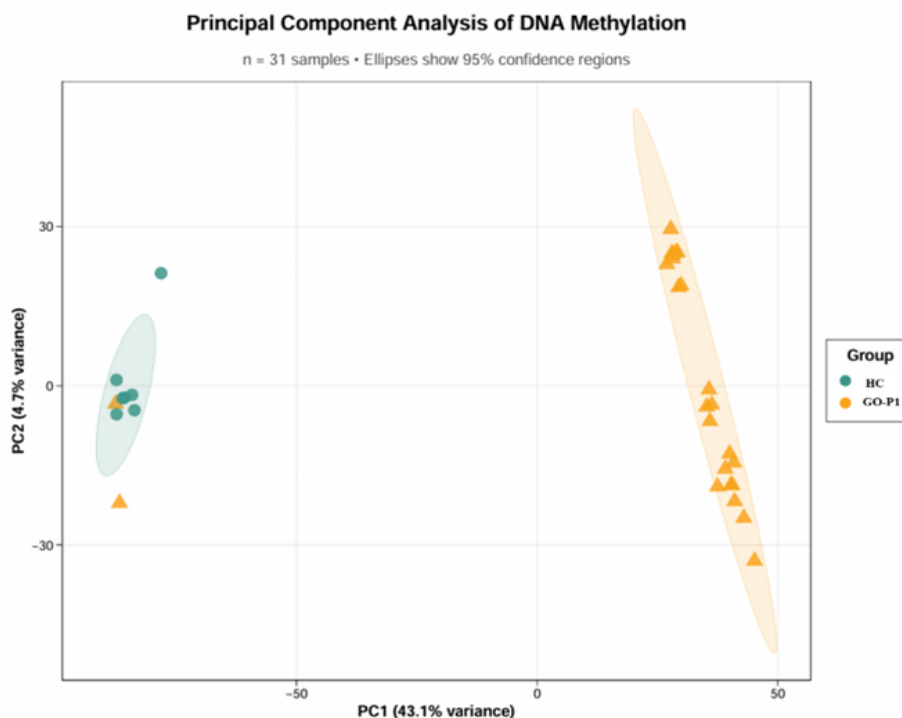


Rycina 7. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami **GO** (chorzy z orbitopatią Gravesa, **pomarańczowy**; punkt czasowy P1 wg protokołu Projektu 1., przed podjęciem leczenia dożylnym metyloprednizolonem) i **HC** (zdrowe kontrole, **zielony**), w oparciu o podział w stopniu DNAm na poziomie chromosomów. Część dolna ryciny prezentuje bezwzględną różnicę w DNAm dla poszczególnych chromosomów autosomalnych, względem grupy badanej (**GO**).

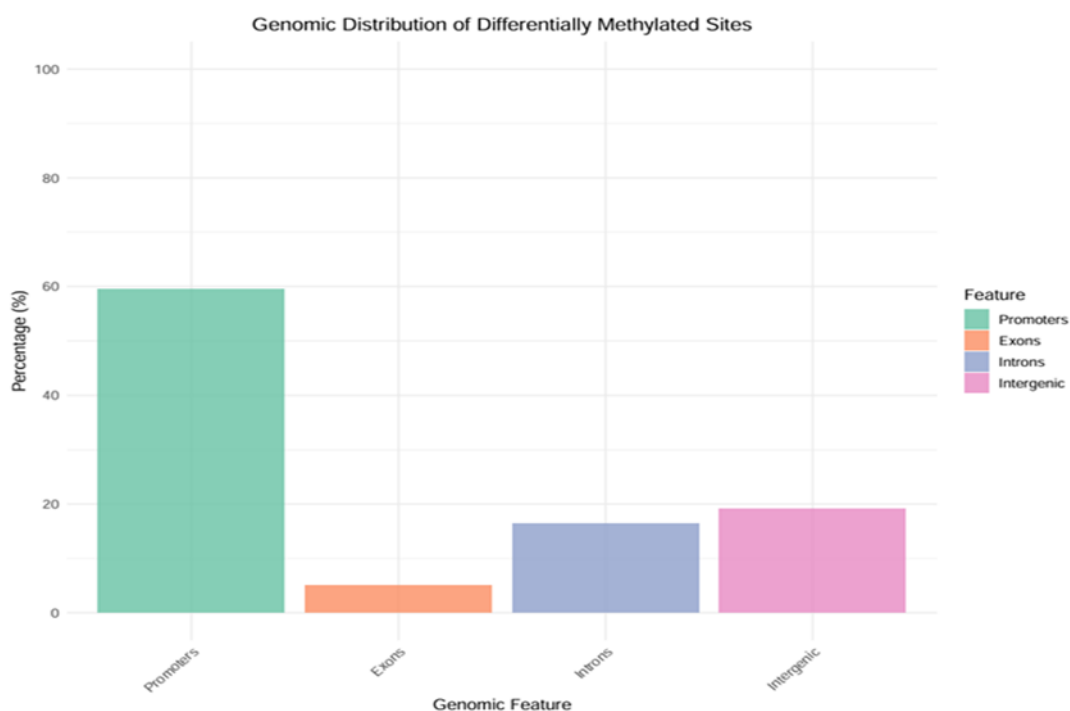


Rycina 8. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej (top 100 CpG) grupy badanej GO (przed leczeniem pulsami metyloprednizolonu) oraz HC (control), członkowie grup zostali oznaczeni strzałkami (kolumny). Kolorem

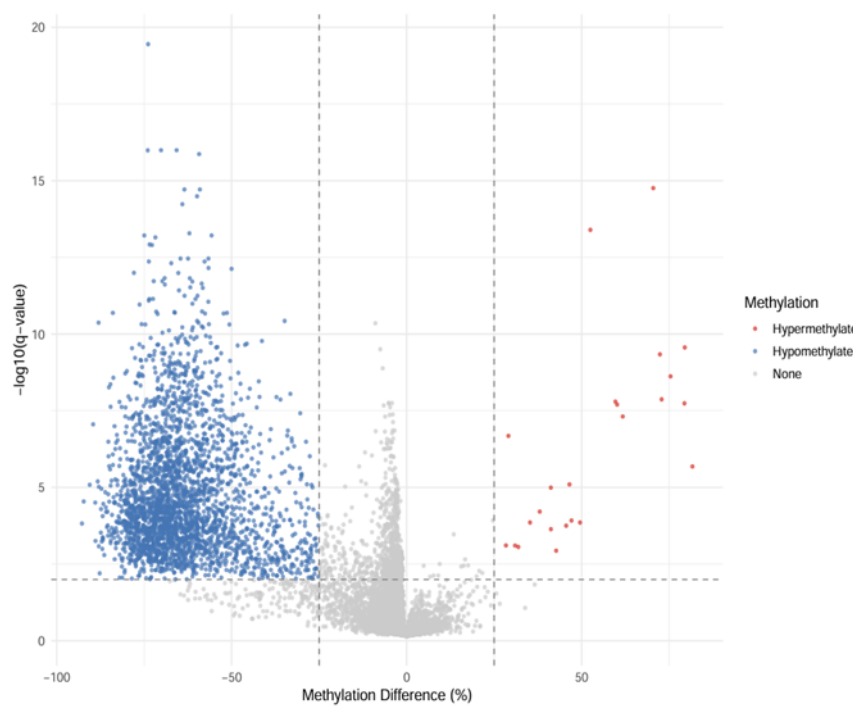
niebieskim oznaczono wzorce DNAm **hipometylowane**, a czerwonym **hipermetylowane** (rzędy). Intensywność koloru danego wzorca odpowiada stopniowi metylacji DNA zgodnie z uwzględnioną skalą.



Rycina 9. Wyniki analizy porównawczej głównych komponentów składowych (PCA) dla grup: GO vs. HC. Kolorem **pomarańczowym** (▲) oznaczono grupę badaną – chorych z orbitopatią tarczycową w punkcie P1 protokołu Projektu 1. (przed rozpoczęciem leczenia pulsami dożylnymi metyloprednizolonu; **GO-P1**), a kolorem zielonym (●) zdrowe kontrole (**HC**). Objasnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2



Rycina 10. Prezentacja dystrybucji *loci* zawierających DMRs w kontekście całego genomu, na wykresach uwzględniono kolejno obszary chromosomowe: promotory genów, eksony, introny oraz regiony międzygenowe (analiza chorych z orbitopatią tarczycową przed leczeniem metyloprednizolonem i zdrowych kontroli: GO-P1 vs. HC).



Rycina 11. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie GO (P1 protokołu Projektu 1., przed leczenie pulsami ivMP) vs. HC, na osi x przedstawiono różnicę stopnia metylacji DNA, a na osi y wartość istotności statystycznej w formie $-\log_{10}(q\text{-value})$. Kolorem czerwonym oznaczono istotne CpG **hipermetylowane**, a kolorem niebieskim **hipometylowane**. Dinukleotydy CpG o najwyższej pozycji rankingowej znajdują się najwyżej.

Tabela 4a. Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy GO vs. HC. (w kolejności alfabetycznej, lp. 1.-27.)

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
1	<i>ADAMTS20</i>	chr12	43747669-43945724	powyżej	-63,49	7,55E-11	3,65E-09
2	<i>ALK</i>	chr2	29415640-30144432	powyżej	-80,34	1,72E-04	6,65E-04
3	<i>B3GNT3</i>	chr19	17905637-17923891	wewnątrz	-47,89	2,36E-07	2,68E-06
4	<i>BCL2L11</i>	chr2	111876955-111926024	powyżej	-78,36	1,58E-05	8,92E-05
5	<i>BSND</i>	chr1	55464606-55476556	powyżej	-79,91	2,59E-11	1,61E-09
6	<i>C6orf52</i>	chr6	10671651-10695030	powyżej	-68,72	3,98E-05	1,93E-04
7	<i>CCRL2</i>	chr3	46448654-46454488	wewnątrz	-70,97	6,80E-05	2,99E-04
8	<i>CD151</i>	chr11	832843-839831	powyżej	-84,30	6,16E-07	6,02E-06
9	<i>CD200</i>	chr3	112051194-112081659	wewnątrz	-69,75	8,95E-12	6,97E-10
10	<i>CD274</i>	chr9	5450503-5470566	powyżej	-59,36	3,88E-04	1,34E-03
11	<i>CD34</i>	chr1	208057594-208084747	powyżej	-60,15	2,48E-11	1,56E-09
12	<i>CD55</i>	chr1	207494853-207534311	wewnątrz	-76,92	5,96E-05	2,68E-04
13	<i>CD82</i>	chr11	44585977-44641913	wewnątrz	-64,97	1,47E-04	5,81E-04
14	<i>CDKN2C</i>	chr1	51426417-51440305	wewnątrz	-59,14	1,50E-04	5,92E-04
15	<i>CLDN17</i>	chr21	31538241-31538971	poniżej	-53,90	6,37E-04	2,07E-03
16	<i>COL9A2</i>	chr1	40766159-40783488	wewnątrz	-67,91	5,43E-13	7,62E-11
17	<i>CRH</i>	chr8	67088620-67090960	wewnątrz	-67,02	7,67E-06	4,88E-05
18	<i>CXCL12</i>	chr10	44793038-44881941	wewnątrz	-65,26	1,55E-08	2,91E-07
19	<i>CXCL16</i>	chr17	4636821-4643217	wewnątrz	-64,43	2,85E-09	6,99E-08
20	<i>CYP1A1</i>	chr15	75011883-75017951	powyżej	-69,68	1,28E-06	1,12E-05
21	<i>CYP26A1</i>	chr10	94833232-94837647	wewnątrz	-69,92	1,62E-08	2,99E-07
22	<i>DGCR6</i>	chr22	18893541-18901751	wewnątrz	-88,89	1,40E-04	5,54E-04
23	<i>DNMT3B</i>	chr20	31350191-31397162	powyżej	-65,43	6,31E-09	1,36E-07
24	<i>DRD2</i>	chr11	113280318-113346413	wewnątrz	-78,98	8,83E-07	8,12E-06
25	<i>DRD4</i>	chr11	637293-640706	wewnątrz	-46,67	1,64E-06	1,37E-05
26	<i>ELOVL1</i>	chr1	43829068-43833696	wewnątrz	-46,31	1,86E-03	5,32E-03
27	<i>FCGRT</i>	chr19	50010073-50029590	wewnątrz	-45,61	1,75E-07	2,11E-06

Objaśnienia skrótów: ADAMTS20 – metaloproteinaza ADAM z motywem 20 trombospondyny typu 1, ALK – kinaza ALK, B3GNT3 – beta-1,3-N-acetyloglukozaminylotransferaza typu 3, BCL2L11 – białko apoptotyczne BCL2L11 (inaczej: BIM), BSND – białko związane z zespołem Barrtera, C6orf52 – białko C6orf52, CCRL2 – receptor C-C chemokiny 2, CD151 – antygen różnicowania komórkowego CD151, CD200 – antygen różnicowania komórkowego CD200, CD274 – antygen różnicowania komórkowego CD274, CD34 – antygen różnicowania komórkowego CD34, CD55 – antygen różnicowania komórkowego CD55, CD82 – antygen różnicowania komórkowego CD82, CDKN2C – inhibitor kinazy cyklozależnej 2C, CLDN17 – kładyna 17, COL9A2 – łańcuch alfa-2 kolagenu typu 9, CRH – kortykoliberyna, CXCL12 – chemokina z motywem CXC typu 12, CXCL16 – chemokina z motywem CXC typu 16, CYP1A1 – białko cytochromu P450 A1, CYP26A1 – białko cytochromu P450 26A1, DGCR6 – związane z zespołem DiGeorge’a białko typu 6, DNMT3B – DNA-metylotransferaza 3B, DRD2 – receptor dopaminowy D2, DRD4 – receptor dopaminowy D4, ELOVL1 – elongaza długłańcuchowych kwasów tłuszczowych typu 1, FCGRT – receptor transportowy, fragment Fc IgG

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

c.d. **Tabela 4b.** Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy GO vs. HC. (w kolejności alfabetycznej, lp. 28.-54.)

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
28	<i>FCRLB</i>	chr1	161691353-161697933	wewnątrz	-73,63	4,88E-05	2,26E-04
29	<i>FGF6</i>	chr12	4537321-4554780	wewnątrz	-30,61	2,52E-05	1,32E-04
30	<i>FGFR1</i>	chr8	38268656-38326352	wewnątrz	-42,41	2,50E-07	2,79E-06
31	<i>FOXP1</i>	chr3	71003844-71633140	wewnątrz	-71,13	1,36E-05	7,84E-05
32	<i>FOXO3</i>	chr6	108881038-109005977	powyżej	-66,74	1,24E-05	7,27E-05
33	<i>GATA2</i>	chr3	128198270-128212028	wewnątrz	-59,48	4,19E-07	4,33E-06
34	<i>GATA5</i>	chr20	61038553-61051026	poniżej	-38,74	2,02E-04	7,64E-04
35	<i>GNDF</i>	chr5	37812779-37839788	wewnątrz	-53,85	4,79E-10	1,62E-08
36	<i>GLI2</i>	chr2	121493199-121750229	wewnątrz	-65,59	1,16E-06	1,02E-05
37	<i>GNAS</i>	chr20	57414773-57486247	wewnątrz	-35,68	5,13E-08	7,55E-07
38	<i>GOLT1A</i>	chr1	204167288-204183220	powyżej	-75,68	4,63E-06	3,24E-05
39	<i>GTPBP8</i>	chr3	112709765-112733907	wewnątrz	-81,99	3,21E-03	8,72E-03
40	<i>H3F3AP6</i>	chr4	140619298-140619708	powyżej	-68,03	9,61E-08	1,29E-06
41	<i>HLA-AS1</i>	chr1	221006105-221053482	powyżej	-52,40	8,24E-04	2,59E-03
42	<i>HSBP1</i>	chr16	83841448-83853342	wewnątrz	-52,86	2,55E-07	2,83E-06
43	<i>ICAM5</i>	chr19	10400657-10407454	wewnątrz	-59,98	1,00E-05	6,14E-05
44	<i>IGF1R</i>	chr15	99192200-99507759	powyżej	-63,30	6,55E-05	2,90E-04
45	<i>IGFBP3</i>	chr7	45951949-45961473	wewnątrz	-70,00	1,46E-10	6,31E-09
46	<i>IL17REL</i>	chr22	50432942-50451088	poniżej	-64,94	1,35E-08	2,59E-07
47	<i>IL6R</i>	chr1	154377669-154441926	wewnątrz	-63,11	1,26E-04	5,06E-04
48	<i>INHBB</i>	chr2	121103719-121109384	wewnątrz	-66,77	6,71E-06	4,40E-05
49	<i>ITGA6</i>	chr2	173292082-173371181	wewnątrz	-57,16	5,25E-07	5,28E-06
50	<i>KCNJ5</i>	chr11	128761251-128790930	powyżej	-64,73	4,47E-09	1,02E-07
51	<i>KLF9</i>	chr9	72999503-73029540	powyżej	-70,31	3,31E-06	2,46E-05
52	<i>LEF1</i>	chr4	108968701-109090112	powyżej	-68,17	2,71E-04	9,80E-04
53	<i>LIF</i>	chr22	30636436-30642840	powyżej	-54,41	2,75E-12	2,73E-10
54	<i>LINC00472</i>	chr6	72054047-72130472	powyżej	-54,30	1,48E-06	1,26E-05

Objaśnienia skrótów: FCRLB – białko podobne do receptora Fc typu B, FGF6 – czynnik wzrostu fibroblastów 6, FGFR1 – receptor typu 1 dla czynnika wzrostu fibroblastów, FOXP1 – czynnik transkrypcyjny FOXP1, FOXO3 – czynnik transkrypcyjny FOXO3, GATA2 – czynnik transkrypcyjny GATA2, GATA5 – czynnik transkrypcyjny GATA5, GDNF – czynnik neurotroficzny komórek glejowych, GLI2 – białko z domeną palca cynkowego z rodziny GLI2, GNAS – podjednostka alfa stymulującego białka G wiążącego nukleotydy, GOLT1A – białko transportowe Aparatu Golgiego 1A, GTPBP8 – białko wiążące GTP typu 8, H3F3AP6 – pseudogen 3 histonu H3 z rodziny 3A, HLA-AS1 – antysensowne RNA dla antygen zgodności tkankowej typu A, HSBP1 – białko szoku cieplnego 1, z rodziny B, ICAM5 – międzykomórkowa cząsteczka adhezji 5, IGF1R – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1, IGFBP3 – białko nośnikowe 3, IL17REL – białko podobne do receptora E dla interleukiny 17, IL6R – receptor interleukiny 6, INHBB – podjednostka beta B inhibiny, ITGA6 – integryna alfa typu 6, KCNJ5 – kanał potasowy KCNJ5, KLF9 – czynnik transkrypcyjny KLF-9, LEF1 - czynnik wiążący wzmacniacz limfoidalny 1, LIF – białko hamujące białaczkę, LINC00472 – długi niekodujący RNA 472

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

c.d. **Tabela 4c.** Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy GO vs. HC. (w kolejności alfabetycznej, lp. 55.-81.)

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
55	<i>LLGL2</i>	chr17	73521161-73571289	wewnątrz	-64,33	2,04E-08	3,51E-07
56	<i>LMO4</i>	chr1	87794151-87814606	wewnątrz	-65,16	6,51E-06	4,30E-05
57	<i>LOXL3</i>	chr2	74759541-74782817	wewnątrz	-69,29	4,66E-05	2,18E-04
58	<i>LTK</i>	chr15	41795836-41806085	wewnątrz	-52,24	4,94E-05	2,28E-04
59	<i>LYL1</i>	chr19	13209847-13213975	powyżej	-76,19	2,17E-09	5,56E-08
60	<i>MAGI3</i>	chr1	113933371-114228545	powyżej	-66,26	2,03E-05	1,10E-04
61	<i>MAP2K3</i>	chr17	21187984-21218552	poniżej	-44,79	3,90E-04	1,35E-03
62	<i>MICA</i>	chr6	31371356-31383092	powyżej	-76,64	2,83E-03	7,77E-03
63	<i>MIF</i>	chr22	24236191-24237414	wewnątrz	-67,29	6,48E-08	9,25E-07
64	<i>MIR152</i>	chr17	46114527-46114613	powyżej	-65,59	1,46E-06	1,24E-05
65	<i>MLF2</i>	chr12	6857170-6876641	wewnątrz	-60,62	1,12E-07	1,46E-06
66	<i>MMP14</i>	chr14	23305766-23318236	wewnątrz	-64,94	3,30E-06	2,46E-05
67	<i>MTOR</i>	chr1	11166592-11322564	powyżej	-61,39	1,57E-06	1,32E-05
68	<i>MUC20</i>	chr3	195447753-195467994	wewnątrz	38,02	1,00E-05	6,14E-05
69	<i>NCSTN</i>	chr1	160313062-160328742	powyżej	-67,06	3,82E-04	1,32E-03
70	<i>NEXN</i>	chr1	78354198-78409580	wewnątrz	-79,76	3,51E-06	2,58E-05
71	<i>NFKB1</i>	chr4	103422486-103538459	wewnątrz	-63,62	1,14E-05	6,77E-05
72	<i>NFRKB</i>	chr11	129733531-129765485	wewnątrz	-67,20	1,03E-04	4,28E-04
73	<i>OR2AD1P</i>	chr6	28994457-28995384	poniżej	-67,22	1,26E-05	7,38E-05
74	<i>PAX5</i>	chr9	36833272-37034103	wewnątrz	-76,27	2,63E-09	6,51E-08
75	<i>PCSK6</i>	chr15	101840818-102065405	wewnątrz	-69,26	1,79E-04	6,85E-04
76	<i>PDGFB</i>	chr22	39619364-39640756	wewnątrz	-57,91	5,88E-08	8,55E-07
77	<i>PDGFRA</i>	chr4	55095264-55164414	wewnątrz	-65,71	3,10E-20	1,02E-16
78	<i>POMT2</i>	chr14	77741299-77787227	powyżej	-58,39	1,09E-03	3,30E-03
79	<i>PPARA</i>	chr22	46546424-46639653	wewnątrz	-38,43	6,38E-04	2,07E-03
80	<i>PTPN14</i>	chr1	214522039-214725792	wewnątrz	-71,15	1,24E-13	2,21E-11
81	<i>PTPN5</i>	chr11	18749475-18814268	wewnątrz	-68,02	4,33E-05	2,06E-04

Objaśnienia skótów: LLGL2 – białko LLGL2, LMO4 – czynnik transkrypcyjny z domeną LIM, LOXL3 – oksydaza lizylowa typu 3, LTK – kinaza tyrozynowa receptora leukocytów, LYL1 – białko LYL1, MAGI3 – związana z błoną komórkową kinaza guanylowa typu 3, MAP2K3 – kinaza-3 kinazy aktywowanej mitogenami (również MKK3), MICA – sekwencja A związana z MHC klasy I, MIF – czynnik hamujący migrację makrofagów, MIR152 – miRNA-152, MLF2 – czynnik białaczki szpikowej 2, MMP14 – metyloproteinaza 14, MTOR – kinaza MTOR, MUC20 – mucyna 20, NCSTN – nikastryna, NEXN – neksilina, NFKB1 – jądrowy czynnik transkrypcyjny NF kappa B, NFRKB – receptor dla jądrowego czynnika transkrypcyjnego NF kappa B, OR2AD1P – pseudogen dla receptora węchowego z rodziny 2 (AD) typu 1, PAX5 – białko PAX5, PCSK6 – konwertaza probiałkowa typu 6, PDGFB – podjednostka beta dla płytkopochodnego czynnika wzrostu, PDGFRA – podjednostka alfa receptora dla płytkopochodnego czynnika wzrostu, POMT2 – O-mannozylotransferaza typu 2, PPARA – receptor aktywowany proliferatorami peroksyosomów alfa, PTPN14 – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 14, PTPN5 – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 5

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

c.d. **Tabela 4d.** Zestawienie wybranych, istotnych DMRs analizy GO vs. HC. (w kolejności alfabetycznej, lp. 82.-108.)

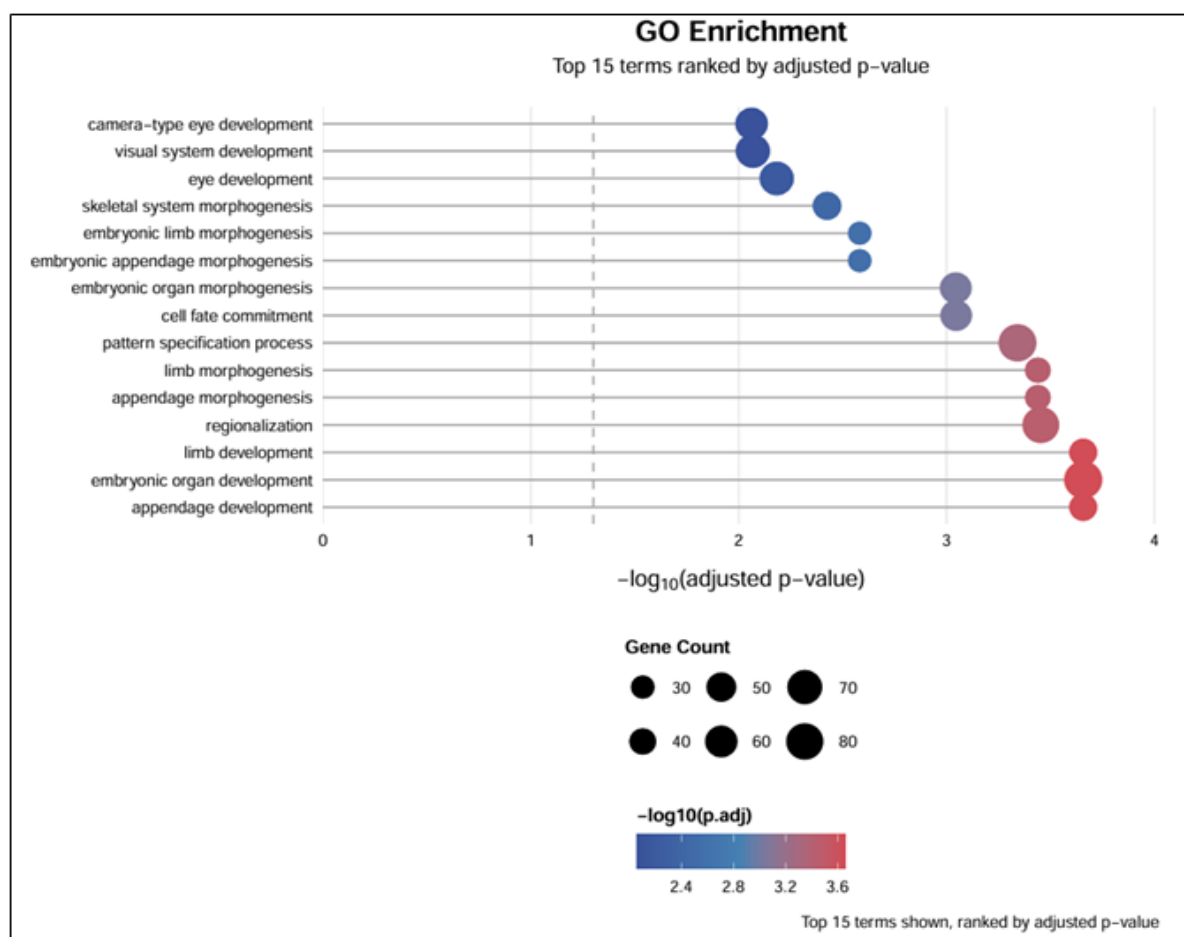
Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
82	<i>PTPRU</i>	chr1	29563028-29653325	wewnątrz	-74,73	1,07E-05	6,44E-05
83	<i>RAB8A</i>	chr19	16222439-16245044	powyżej	-70,10	1,90E-05	1,04E-04
84	<i>RIN3</i>	chr14	92980118-93155339	powyżej	-73,92	8,28E-05	3,54E-04
85	<i>RND3</i>	chr2	151324709-151395525	wewnątrz	-66,57	1,21E-06	1,07E-05
86	<i>RPS9</i>	chr19	54704610-54752862	wewnątrz	-60,22	2,65E-06	2,04E-05
87	<i>RYR3</i>	chr15	33603163-34158303	wewnątrz	-67,78	1,77E-07	2,13E-06
88	<i>S100A10</i>	chr1	151955391-151966866	wewnątrz	-68,56	5,22E-06	3,58E-05
89	<i>SCAP</i>	chr3	47455203-47518616	wewnątrz	-71,71	3,10E-05	1,57E-04
90	<i>SCN4B</i>	chr11	118004092-118023603	wewnątrz	-85,93	6,84E-06	4,47E-05
91	<i>SEPT3</i>	chr22	42372276-42394225	wewnątrz	-64,71	3,08E-04	1,10E-03
92	<i>SERPINE1</i>	chr7	100770370-100782547	powyżej	-75,25	2,51E-07	2,80E-06
93	<i>SLC32A1</i>	chr20	37353105-37358015	powyżej	-58,13	2,74E-05	1,41E-04
94	<i>SMAD4</i>	chr18	48494410-48611415	wewnątrz	-87,36	6,73E-05	2,97E-04
95	<i>SMPD1</i>	chr11	6411655-6416228	powyżej	-72,81	1,13E-06	1,00E-05
96	<i>TET2</i>	chr4	106067032-106200973	wewnątrz	-77,09	6,36E-05	2,83E-04
97	<i>TGFB1</i>	chr19	41807492-41859816	wewnątrz	-58,69	1,17E-09	3,35E-08
98	<i>THSD7B</i>	chr2	137523115-138435287	powyżej	-69,02	3,35E-05	1,67E-04
99	<i>TMEM14C</i>	chr6	10723148-10731362	powyżej	-78,74	7,29E-04	2,33E-03
100	<i>TNFRSF10B</i>	chr8	22877646-22926692	wewnątrz	-51,65	2,14E-04	8,00E-04
101	<i>TNFRSF1B</i>	chr1	12227060-12269285	wewnątrz	-65,53	3,04E-04	1,09E-03
102	<i>TNS3</i>	chr7	47314752-47622156	wewnątrz	-34,21	1,67E-03	4,85E-03
103	<i>TRIP4</i>	chr15	64679947-64747502	wewnątrz	-60,98	9,62E-05	4,04E-04
104	<i>TRPV4</i>	chr12	110220890-110271212	powyżej	-64,22	4,96E-06	3,43E-05
105	<i>TSPAN15</i>	chr10	71211229-71267425	wewnątrz	-71,43	2,89E-06	2,19E-05
106	<i>VEGFC</i>	chr4	177604689-177713881	wewnątrz	-77,23	3,89E-09	9,11E-08
107	<i>WNT2</i>	chr7	116916685-116963343	powyżej	-71,13	1,81E-07	2,17E-06
108	<i>ZNF2</i>	chr2	95831177-95850065	wewnątrz	-75,30	1,86E-06	1,52E-05

Objaśnienia skrótów: PTPRU – receptor fosfatazy tyrozynowej typu U, RAB8A – GTP-aza RAB8A, RIN3 – interaktor Ras/Rab 3, RND3 – GTP-aza 3 z rodziny Rho, RPS9 – rybosomalne białko S9, RYR3 – receptor rianodynowy typu 3, S100A10 – białko wiążące wapń S100A10, SCAP – białko aktywujące hydrolizę SREBP, SCN4B – podjednostka beta 4 kanału sodowego bramkowanego napięciem, SEPT3 – septyna 3, SERPINE1 – białko z rodziny serpin E1, SLC32A1 – białko SLC32A1, SMAD4 – czynnik transkrypcyjny SMAD4, SMPD1 – kwaśna sfingomielinaza, TET2 – oksydaza z rodziny Tet typu 2, TGFB1 – transformujący czynnik wzrostu beta-1, THSD7B – trombospondyna typu 1 zawierająca domenę typu 7B, TMEM14C – białko przez błonowe 14C, TNFRSF10B – receptor czynnika martwicy nowotworu typu 10B, TNFRSF1B – receptor czynnika martwicy nowotworu typu 1B, TNS3 – tensyna-3, TRIP4 – białko TRIP4, TRPV4 – kanał jonowy rodziny TRP typu 4, TSPAN15 – tetraspanina 15, VEGFC – czynnik wzrostu śródbłonka naczyń typu C, WNT2 – białko WNT2, ZNF2 – białko z domeną palca cynkowego ZNF2

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

VIII.1.2.2. Analiza wzbogacenia funkcjonalnego

Dla znalezionych istotnych CpG różnicujących grupy chorych z orbitopatią tarczycową oraz osób zdrowych przeprowadzono analizę wzbogacenia funkcjonalnego. Topowe szlaki wzmocnienia przedstawiono w postaci wykresów (Ryciny 12.-13.), natomiast inne, wybrane i istotne spośród wszystkich określonych szlaków zaprezentowano w formie tabel (Tabela 5.-6.). Za referencję przyjmując bazę KEGG oraz Gene Ontology (GeneO), wytypowano m.in. szlaki rozwoju embrionalnego, przekazywania komórkowego, nowotworów litych i hematologicznych, cytokin prozapalnych, a także rozwoju wzroku. Dwa spośród szlaków metabolicznych scharakteryzowanych w oparciu o bazę KEGG oraz 16 szlaków w oparciu o bazę GeneO spełniło znamienność statystyczną na poziomie $q < 0,01$ (poprawka dla wielokrotnych porównań). Określono stopnie wzmocnienia znaczących statystycznie szlaków metabolicznych względem genów mapowanych na wytypowane wcześniej istotne DMCs. Określono wielkości zbiorów mapowanych genów przynależących do scharakteryzowanych szlaków.

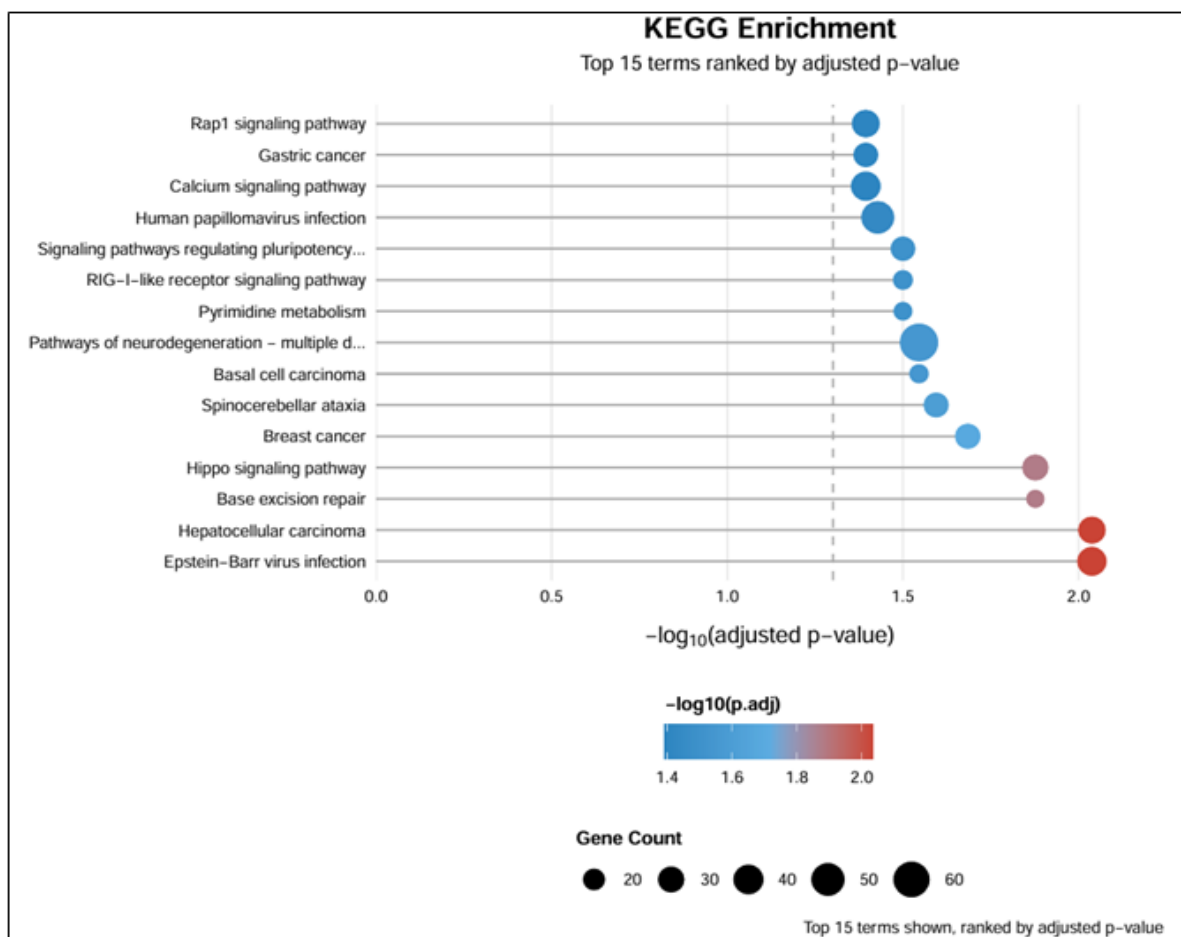


Rycina. 12. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków metabolicznych genów mapowanych względem istotnych CpG (bazę GeneO, na rycinie została oznaczona jako „GO”). Analiza uwzględnia chorych z orbitopatią tarczycową oraz zdrowych kontroli. Linia przerywana stanowi granicę istotności. Na rycinie zestawiono nazwy wzbogaconych szlaków oraz stopnie wzmocnienia szlaków, względem $-\log_{10}$ z skorygowanej wartości istotności statystycznej p, wraz ze skalowanym wysyceniem kolorystycznym (oś x). Liczbę genów w zbiorze dla wzmocnionego szlaku przedstawiono graficznie – liczbowo oraz przy pomocy skalowanej średnicy punktów (Gene Count).

Tabela 5. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG, na podstawie analizy GO vs. HC (baza GeneO).

Lp.	Wzbogacony szlak	p	q	Wielkość zbioru
1	Rozwój embrionalny	4,31E-08	2,03E-04	85
2	Rozwój przydatków	1,12E-07	2,03E-04	44
3	Cykl komórkowy	1,22E-06	8,27E-04	57
4	Rozwój embrionalny oka	1,44E-05	6,03E-03	68
5	Rozwój narządu wzroku	2,02E-05	7,86E-03	68
6	Rozwój funkcjonalny oka (ang. camera-type)	2,19E-05	7,97E-03	61
7	Rozwój nefronu	3,09E-05	1,05E-02	12
8	Rozwój układu nerwowego-czuciowego	3,31E-05	1,06E-02	68
9	Prolifерacja prekursorów komórek nerwowych	3,58E-05	1,08E-02	35
10	Rozwój przodomózgowia	8,81E-05	2,23E-02	67
11	Lokomotoryczny	9,01E-05	2,23E-02	39
12	Odpowiedź na transdukcję TGF-beta	1,53E-04	3,62E-02	53
13	Morfogeneza przedramienia	1,61E-04	3,65E-02	13
14	Pozytywna regulacja aktywności kinaz	1,73E-04	3,77E-02	52
15	Sygnalizacja Wnt	3,30E-04	5,10E-02	72
16	Różnicowanie limfocytów T	5,56E-04	6,31E-02	51
17	Odpowiedź komórkowa na GKS	6,27E-04	6,97E-02	16

Objaśnienia skrótów: GCS – glikokortykosteroidy, TGF-beta – transformujący czynnik wzrostu beta, Wnt – szlak sygnalizacyjny Wnt



Rycina. 13. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków metabolicznych genów mapowanych względem istotnych DMRs (baza KEGG). Linia przerywana stanowi granicę istotności. Analiza względem chorych z orbitopatią tarczycową oraz zdrowych kontroli. Analiza odnosi się do chorych z orbitopatią tarczycową oraz zdrowych kontroli. Na rycinie zestawiono nazwy wzbogaconych szlaków oraz stopnie wzmocnienia szlaków, względem $-\log$ arytmu o podstawie 10 ze skorygowanej wartości istotności statystycznej p, wraz ze skalowanym wysyceniem kolorystycznym (oś x). Liczbę genów w zbiorze dla wzmocnionego szlaku przedstawiono graficznie – liczbowo oraz przy pomocy skalowanej średnicy punktów (Gene Count).

Tabela 6. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG, na podstawie analizy GO vs. HC (baza KEGG).

Lp.	Wzbogacony szlak	p	q	Wielkość zbioru
1	Infekcja EBV	3,90E-05	7,22E-03	38
2	Rak wątrobowokomórkowy	5,36E-05	7,22E-03	33
3	Mechanizm naprawy wycięcia zasad azotowych	1,54E-04	1,05E-02	13
5	Rak piersi	3,02E-04	1,63E-02	28
6	Ataksja mózgowo-rdzeniowa	4,46E-04	2,00E-02	27
7	Szlaki neurodegeneracji	5,85E-04	2,24E-02	68
9	Metabolizm neurodegeneracji	8,62E-04	2,49E-02	14
10	Sygnalizacja RIG-I-podobnych receptorów	1,00E-03	2,49E-02	16
11	Sygnalizacja pluripotencjalnych komórek szpiku	1,02E-03	2,49E-02	26
12	Infekcja HPV	1,31E-03	2,94E-02	49
13	Rap1	1,67E-03	3,18E-02	34
14	Sygnalizacja komórkowa związana z jonami wapnia	1,82E-03	3,18E-02	39
15	Rak żóładka	1,87E-03	3,18E-02	26
16	Cykl komórkowy	1,92E-03	3,18E-02	27
17	Rak prostaty	2,00E-03	3,18E-02	19
18	Połączenia międzykomórkowe przylegające	2,65E-03	3,93E-02	18
20	Ostra białaczka szpikowa	4,28E-03	4,80E-02	14
21	Sygnalizacja PI3K-Akt	4,45E-03	4,80E-02	50
22	Sygnalizacja hormonalna	5,28E-03	4,80E-02	33
23	Migracja przeznabłonkowa limfocytów	6,33E-03	5,15E-02	20
24	Rak tarczycy	6,69E-03	5,15E-02	9
25	Sygnalizacja Wnt	7,47E-03	5,39E-02	27
26	Sygnalizacja mTOR	7,68E-03	5,39E-02	25
27	WZW C	8,32E-03	5,45E-02	25
28	Sygnalizacja TNF	8,42E-03	5,45E-02	20
29	Sygnalizacja cAMP	8,49E-03	5,45E-02	33
30	Infekcja Yersinia	1,09E-02	6,06E-02	22
32	Sygnalizacja Ras	1,76E-02	7,88E-02	33
33	Sygnalizacja MAPK	1,78E-02	7,88E-02	40
34	Sygnalizacja receptora limfocytów T	4,02E-02	1,34E-01	18
35	Różnicowanie limfocytów Th17	5,30E-02	1,61E-01	16

Objaśnienia skrótów: cAMP – cykliczny adenylozomonogofosforan, EBV – wirus Wirusa Epsteina-Barr, HPV – wirus brodawczaka, MAPK – kinazy aktywowane mitogenami, PI3K-Akt – szlak kinazy 3-fosfatydilinozytolu i kinazy białkowej AKT, Rap1 – związane z RAS białko typu1, RIG-1 – receptor cytozolowy RIG-1, Th17 – limfocyt Th17, TNF – czynnik martwicy nowotworu, Wnt szlak sygnalizacyjny Wnt, WZW C – wirus zapalenia wątroby typu C

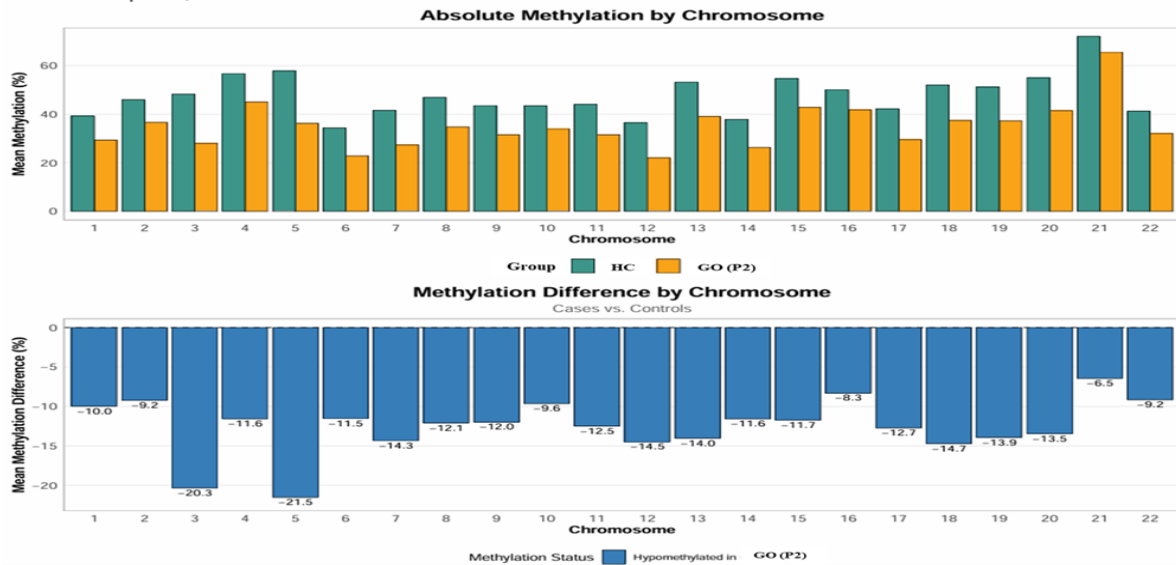
VIII.1.2.3. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a skutecznością leczenia orbitopatii tarczycowej dożylnymi glikokortykosteroidami oraz analiza eksploratywna

W analizie globalnego profilu DNAm w grupie wszystkich chorych z GO (n=24), po przebytych leczeniu ivGCS (P2), oraz zdrowych kontroli dorosłych (HC, n=7) wykazano hipometylację w grupie GO (średnio -12,51% dla wszystkich chromosomów autosomalnych). Grupy różniły się profilem metylacji w skali wszystkich chromosomów (hipometylacja GO, Rycina 14.), a także w ramach całościowej prezentacji wzorców przy pomocy heatmap (Rycina 15.), jednak obraz ten różnił się w porównaniu do analizy sprzed podjęcia leczenia ivGCS. W analizie głównych komponentów składowych (PCA) wykazano grupowanie próbek GO i HC, jednakże charakter klastrowania obu grup i liczba chorych przypominających grupę kontrolną różniły się względem obrazu sprzed leczenia (Rycina 16.).

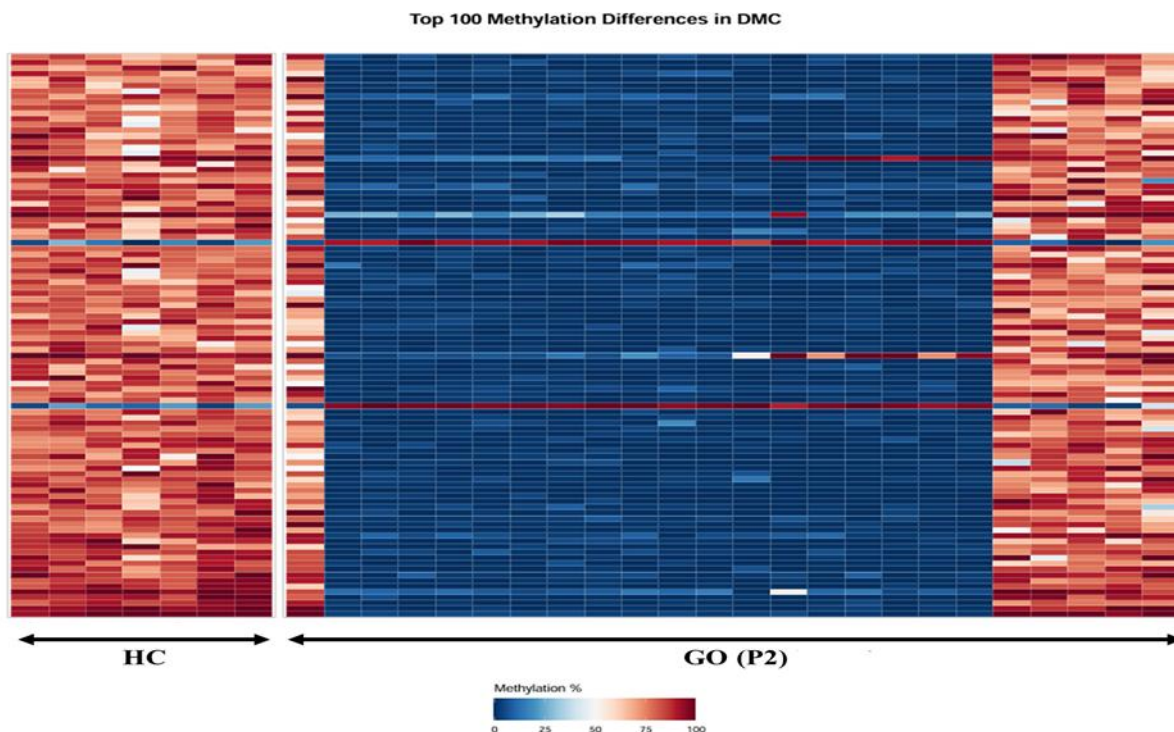
Wszystkie odnotowane DMRs zostały podsumowane pod kątem dystrybucji w genomie w ramach Ryciny 17. W analizie różnicowej między grupami odnotowano 3636 odmiennie zmetylowanych cytozyn (DMCs), z czego 770 pozycji CpG było istotnych statystycznie, a 590 zmapowanych na regiony w oparciu o nomenklaturę HGNC. Na Rycinie 18. w formie wykresu wulkanicznego zobrazowano komplet istotnych CpG z uwzględnieniem podziału ze względu na regiony o przewadze wzorca metylacji. Do najważniejszych i zróżnicowanych funkcjonalnie oraz klinicznie pseudogenów/ genów w sąsiedztwie odkrytych istotnych CpG należały m.in.: ICAM5, ITGA4, GLI2, ADAMTS, SMAD, SLC, PAX7, LTK, LTB, MIR, TNFRSF25, TGFB2, TGFBR2. Na podstawie zidentyfikowanych CpG, istotnemu wzbogaceniu uległy m.in. szlaki: różnicowania neuronów GABA-ergicznych (związanych z neuroprzekaźnikiem – kwasem gamma-aminomasłowym; wielkość zbioru: 7), powstawania i różnicowania przedomózgowia (odpowiednio, wielkość zbiorów: 9 i 8) oraz ustania plastyczności komórkowej (wielkość zbioru: 23).

Chromosome Methylation Analysis

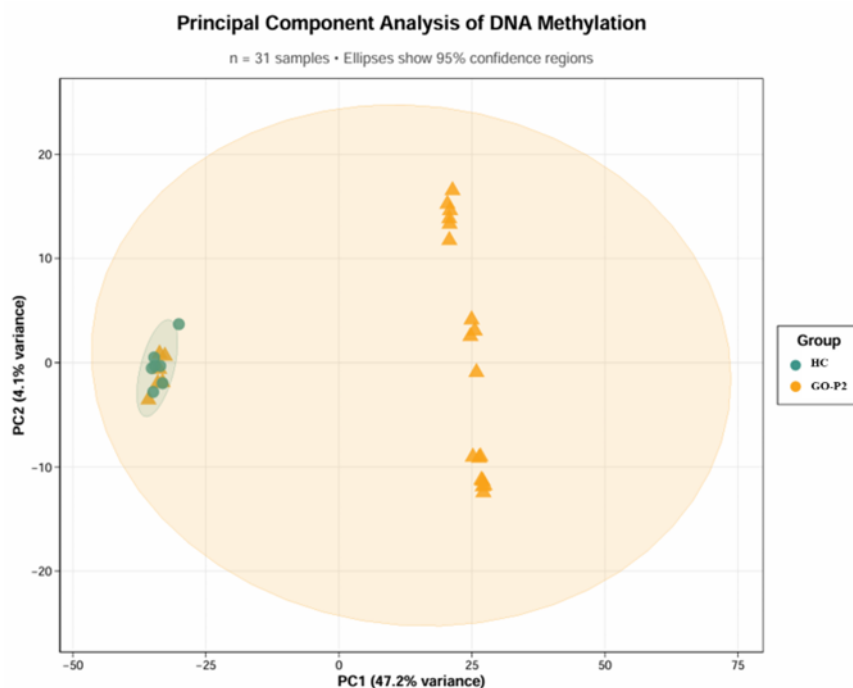
Based on 3636 CpG sites, 24 cases and 7 controls



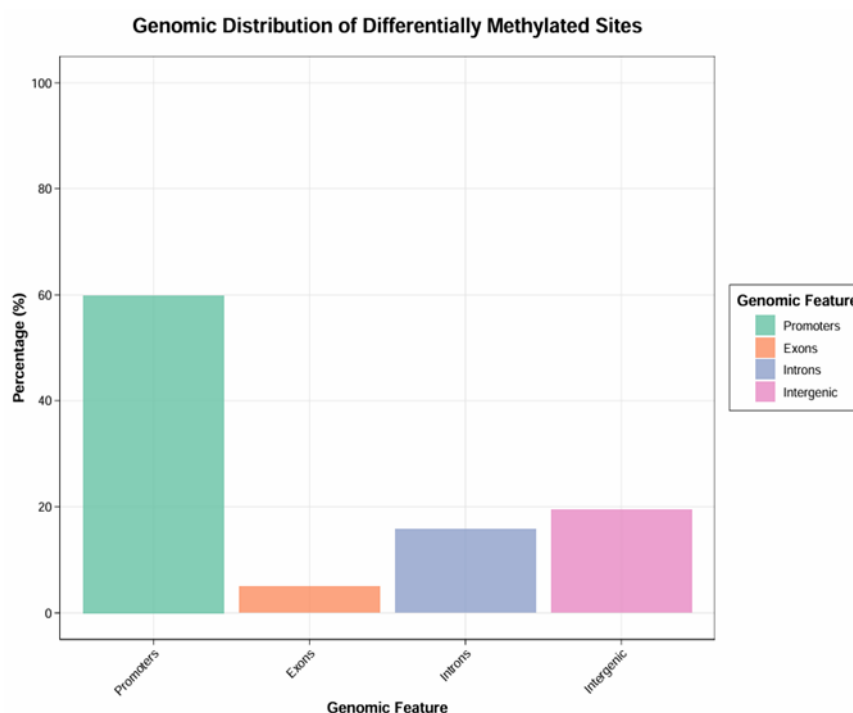
Rycina 14. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami **GO-P2** (chorzy z orbitopatią Gravesa, **pomarańczowy**; punkt czasowy P2 wg protokołu Projektu 1., po leczeniu pulsami dożylnymi metyloprednizolonem) i **HC** (zdrowe kontrole, **zielony**), w oparciu o podział w stopniu DNAm na poziomie chromosomów. Część dolna ryciny prezentuje bezwzględną różnicę w DNAm dla poszczególnych chromosomów autosomalnych, względem grupy badanej (**GO**).



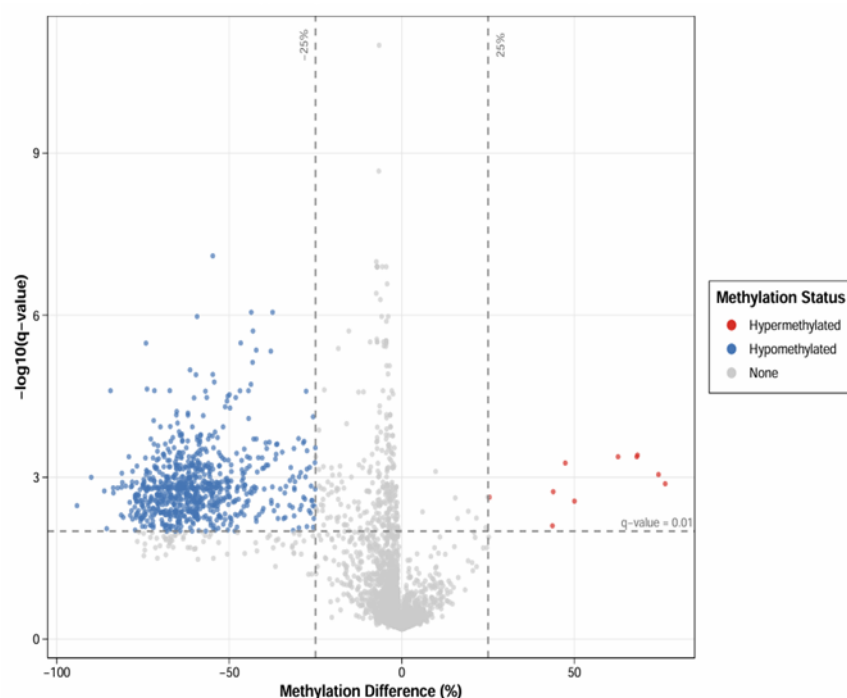
Rycina 15. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej (top 100 CpG) grupy badanej GO (po leczeniu pulsami metyloprednizolonu, punkt czasowy P2) oraz HC (control), członkowie grup zostali oznaczeni strzałkami (kolumny). Kolorem niebieskim oznaczono wzorce DNAm **hipometylowane**, a czerwonym **hipermetylowane** (rzędy). Intensywność koloru danego wzorca odpowiada stopniowi metylacji DNA zgodnie z uwzględnioną skalą.



Rycina 16. Wyniki analizy porównawczej głównych komponentów składowych (PCA) dla grup: GO vs. HC. Kolorem **pomarańczowym** (▲) oznaczono grupę badaną – chorych z orbitopatią tarczycową w punkcie P2 protokołu Projektu 1. (po zakończeniu leczenia pulsami dożylnymi metyloprednizolonu; **GO-P2**), a kolorem zielonym (●) zdrowe kontrole (**HC**). Objaśnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2



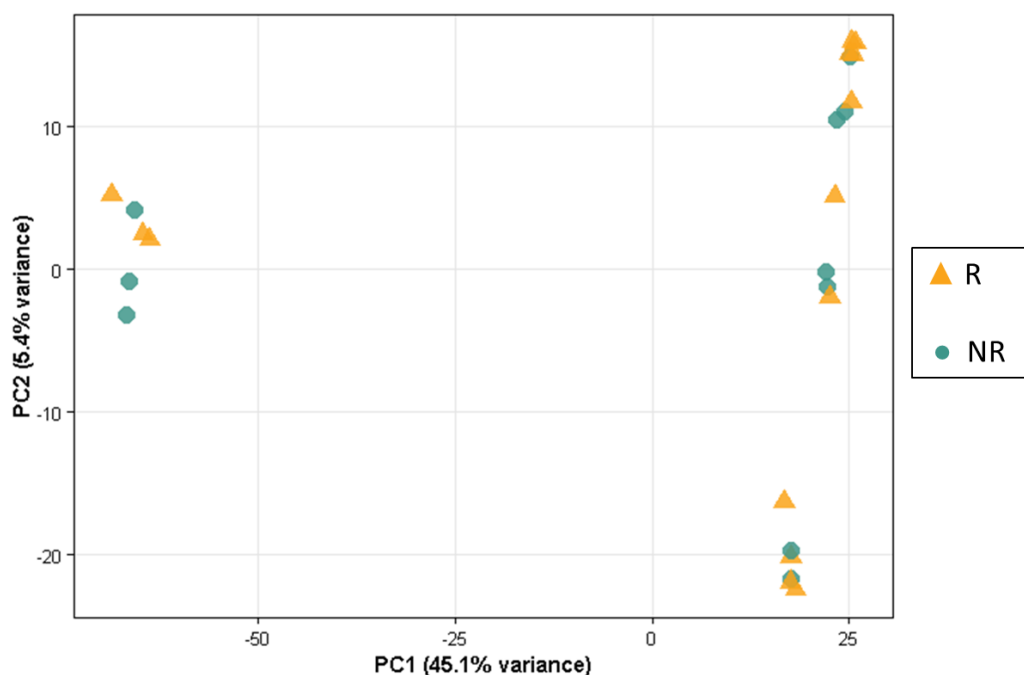
Rycina 17. Prezentacja dystrybucji *loci* zawierających DMRs w kontekście całego genomu, na wykresach uwzględniono kolejno obszary chromosomowe: promotory genów, eksony, introny oraz regiony międzygenowe (analiza chorych z orbitopatią tarczycową po leczeniu pulsami metyloprednizolonu i zdrowych kontroli: GO-P2 vs. HC)



Rycina 18. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie GO (P2 protokołu Projektu 1., po leczeniu pulsami ivMP) vs. HC, na osi x przedstawiono różnicę stopnia metylacji DNA, a na osi y wartość istotności statystycznej w formie $-\log_{10}(\text{q-value})$. Kolorem czerwonym oznaczono istotne CpG **hipermetylowane**, a kolorem niebieskim **hipometylowane**. Dinukleotydy CpG o najwyższej pozycji rankingowej znajdują się najwyżej.

Nie wykazano podobieństw dla grupowania (analiza PCA) chorych z GO w zależności od odpowiedzi na leczenie ivGCS: R (n=14) vs. NR (n=10). Nie uzyskano też wspólnych istotnych DMCs różnicujących te dwie podgrupy (R vs. NR) w każdym z punktów czasowych (przed i po leczeniu; P1, P2, Protokół Projektu 1.). Nie wyznaczano sygnatur metylacyjnych powodzenia leczenia. Wykonano analizy dla każdego chorego z osobna (n=24), porównując stosunek 5-MC:C w kontekście pojedynczych, specyficznych CpG dla punktów czasowych P1 i P2 (przed i po leczeniu ivGCS). Podsumowanie ilościowe wyników przedstawiono w Tabeli 7. Z uwagi na objętość całej rozprawy, nie zaprezentowano wszystkich *loci*, na które anotowane były istotnie zmienione CpG po leczeniu ivGCS. Warto zaznaczyć, że znaleziono CpG mapowane na częściowo zbieżne regiony wśród członków obu analizowanych podgrup, jednak dokładne pozycje pojedynczych, odmiennie zmetylowanych cytozyn dinukleotydów CpG różniły się (jednocześnie pozostając np. w tożsamym regionie promotorowym). Całościowo, do szczególnie istotnych biologicznie i w kontekście innych uzyskanych i cytowanych

wyników należały: *AIRE, ALK, AQP, ATXN, ADAMTS, B3GNT, BAGE2, BCL2, BOLL, Corf, CD19, CD20, CD40, CD5, CD7, CD8A, CD14, CLDN, COL, CXCL12, CYP, DHX34, DNMT1, DNMT3B, DNMT3L, DRD4, EGFR, FANK1, FGFR, FOXC1, FOXO3, GATA, IFNGR2, IL12RB1, IL2RA, ILR6A, ITGA6, ITGB4, LOXL, LTA, MAPK, MMP, MPO, MTRR, MUC, NKX6-3, ONECUT1, PTPN, RYR1, TAGAP, TAGLN, TMEM, TNFRS, TPO, TSPAN, SERPIN, SLC, SOCS3, WNT4*, a także liczne DMRs z grup *LINC, MIR, ZMIZ, ZNF*. Regiony o zbieżnej funkcji biologicznej były zarówno hipometylowane jak i hipermetylowane, a zmiana stopnia DNAm następowała zarówno w miejscach promotorowych jak i powyżej/poniżej tych miejsc. Odnotowano przypadki odmiennego charakteru zmian DNAm dotyczącej tego samego regionu, zależnie od lokalizacji danego CpG powyżej TSS lub w TSS/poniżej TSS.



Rycina 19. Wyniki analizy PCA dla chorych z GO, po zakończeniu leczenia przy pomocy 12 pulsów ivGCS (P2; Punkt 2. protokołu Projektu 1.), dla grup z odpowiedzią na leczenie (▲; R) i bez odpowiedzi na leczenie (●; NR).
 Objaśnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2

Tabela 7. Podsumowanie stopnia zmian DNAm u wszystkich chorych z GO leczonych ivGCS.

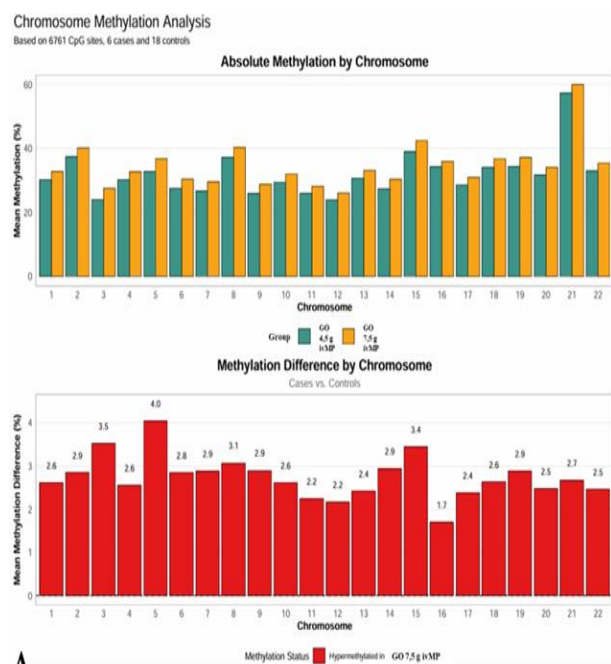
Grupa R/NR Pacjent-nr	DMCs, n	DMCs istotne / istotne (HGNC), n	DMRs istotne hipo- /hipermetylowane, n
R-Pacjent nr 1	4407409	1248 / 789	608 / 640
R-Pacjent nr 2	3529132	39681 / 23988	17548 / 22133
R-Pacjent nr 3	4982582	2173 / 1240	1376 / 797
R-Pacjent nr 4	4368548	495 / 302	263 / 232
R-Pacjent nr 5	4806769	3420 / 2073	1764 / 1656
R-Pacjent nr 6	3557662	48 / 27	24 / 24
R-Pacjent nr 7	3685246	4522 / 2979	2690 / 1832
R-Pacjent nr 8	3636408	1540 / 938	747 / 793
R-Pacjent nr 9	4610973	5398 / 3360	2799 / 2599
R-Pacjent nr 10	4388669	20339 / 12458	12401 / 7938
R-Pacjent nr 11	5104694	50598 / 30824	25744 / 24854
R-Pacjent nr 12	1055844	57095 / 42311	8583 / 48512
R-Pacjent nr 13	821837	52790 / 37863	3367 / 49423
R-Pacjent nr 14	2716998	54 / 27	34 / 20
NR-Pacjent nr 1	593664	1 / 1	0 / 1
NR-Pacjent nr 2	4801856	3331 / 2030	1811 / 1520
NR-Pacjent nr 3	5103321	426 / 255	211 / 215
NR-Pacjent nr 4	4634479	11874 / 7515	7291 / 4583
NR-Pacjent nr 5	4578644	891 / 532	401 / 490
NR-Pacjent nr 6	3333681	18628 / 11029	8829 / 9799
NR-Pacjent nr 7	4600498	9997 / 6000	5557 / 4440
NR-Pacjent nr 8	4859331	60613 / 37065	35511 / 25102
NR-Pacjent nr 9	823570	40966 / 29009	2147 / 38819
NR-Pacjent nr 10	352423	46729 / 30745	2095 / 44634

Objaśnienia skrótów: DMC – cytozyna o odmiennym stopniu zmetylowania, DMR – region DNA o odmiennym stopniu zmetylowania, HGNC – nomenklatura genów człowieka, NR – grupa bez odpowiedzi na leczenie dożylnymi glikokortykosteroidami, R – grupa z odpowiedzią na leczenie dożylnymi glikokortykosteroidami.

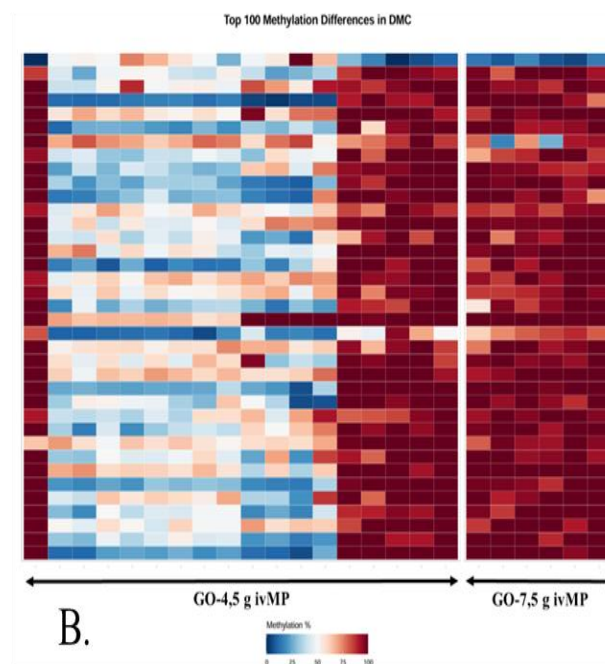
Zestawiono chorych odpowiadających (n=14, grupa R) i bez odpowiedzi (n=10, grupa NR) na leczenie, a przedmiotem analizy DNAm były każdorazowo 2 próbki (odpowiadające punktom P1 i P2) u pojedynczego

chorego. Regiony w kolorze niebieskim dotyczą hipometylowanego DMR, a czerwonym oznaczono te hipermetrylowane (po leczeniu, względem obrazu sprzed leczenia). Osobne kolumny zawierają informacje o ilości CpG i anotowanych regionów o zmienionym stopniu DNAm po przebytych leczeniu dożylnym metyloprednizolonem.

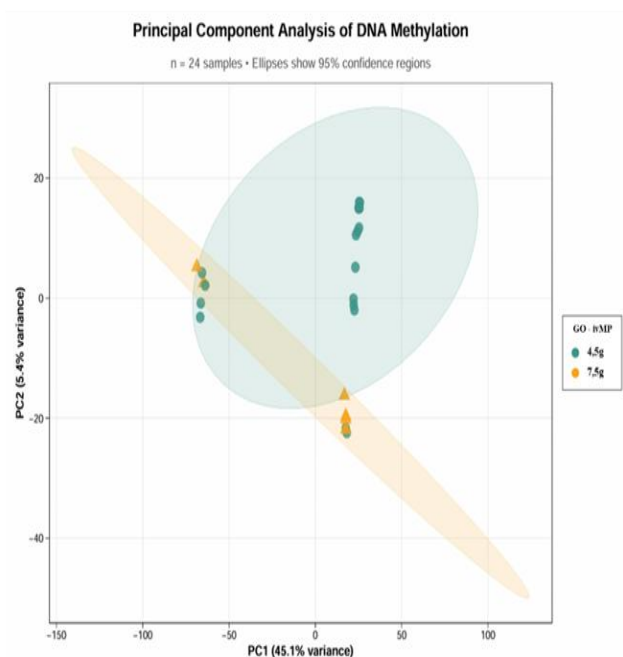
Analiza eksploratorywna nie wykazała spójnego grupowania próbek dla stratyfikacji względem poprzedzających wystąpienie orbitopatii tarczycowej: tyreidektomii, RAI oraz palenia papierosów (przyjęto kryterium „ever smoker”, dla chorych palących obecnie, w przeszłości lub narażonych biernie na nikotynizm). Podobnie, nie wykazano istotnych różnic dla stratyfikacji zawierającej uzupełniające leczenie ORTH. Istotne różnice znaleziono dla analizy uwzględniającej odmienną łączną gramaturę zastosowanego metyloprednizolonu dożylnego (každorazowo uwarunkowane bieżącą sytuacją kliniczną). W analizie przedstawiającej chorych po leczeniu odpowiednio 7,5 g ivMP oraz 4,5g ivMP, obserwowano dominującą hipermetrylację DNA na poziomie globalnym, wzorców topowych pozycji i pojedynczych dinukleotydów CpG („site specific”) oraz separację próbek obu grup w analizie PCA (Rycina A-D.). W analizie różnicowej między grupami odnotowano 6761 DMCs, z czego 37 pozycji CpG (18 w oparciu o nomenklaturę HGNC) było istotnych statystycznie. Na Rycinie A-D przedstawiono podsumowanie analogicznych do wcześniej zaprezentowanych analiz, przedstawiając globalną hipermetrylację u chorych stosujących łączną dawkę 7,5g ivMP (A), topowe wzorce pozycji różnicujące obie grupy (B), formę grupowania (C) chorych zależnie od dawki oraz (D) wykres wulkaniczny dla istotnych CpG (przewaga hipermetrylowanych DMCs). Do istotnych DMR, na które mapowane były CpG, należały m.in.: *SLC25A18*, *MAP2K3*, *IGHG1*, *CAPN10*, *ATP2B4*.



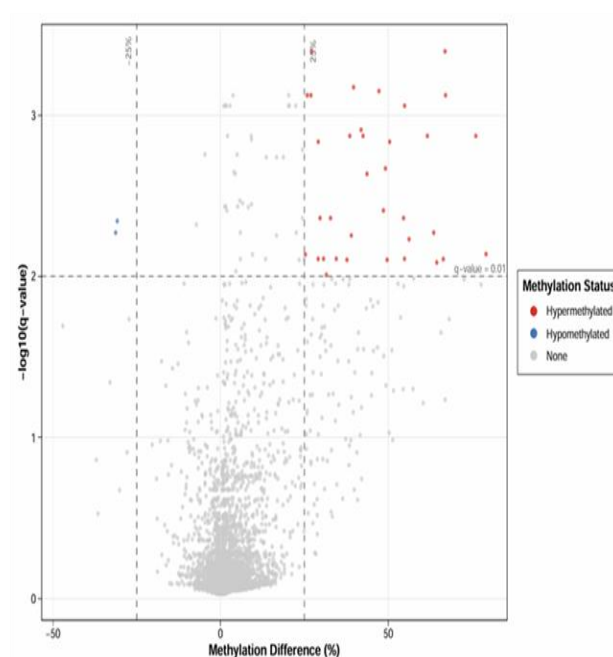
A.



B.



C.



D.

Rycina 20A-D. Analiza eksploratorywna względem dawki metyloprednizolonu dożylnego u chorych z GO. A. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami chorych z GO, leczonych różnymi dawkami kulminacyjnymi metyloprednizolonu (punkt czasowy P2 wg protokołu Projektu 1., po zakończeniu leczenia dożylnym metyloprednizolonem): 7,5g ivMP (**pomarańczowy**) i 4,5g ivMP (**zielony**), w oparciu o podział w stopniu DNAm na poziomie chromosomów autosomalnych. Część dolna ryciny prezentuje bezwzględną różnicę w DNAm dla poszczególnych chromosomów autosomalnych, względem grupy badanej (**7,5g ivMP**). B. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej grup z GO po leczeniu pulsami metyloprednizolonu, w zależności od dawki łącznej ivMP; członkowie grup zostali oznaczeni strzałkami (kolumny). Kolorem niebieskim oznaczono wzorce DNAm **hipometylowane**, a czerwonym **hipermetylowane** (rzędy). Intensywność koloru danego wzorca odpowiada

stopniowi metylacji DNA zgodnie z uwzględnioną skalą. C. Wyniki analizy porównawczej głównych komponentów składowych (PCA) dla grup (kulminacyjna dawka 7,5 g vs. 4,5 g ivMP u chorych z GO). Kolorem **pomarańczowym** (▲) oznaczono grupę badaną – chorych z orbitopatią tarczycową w punkcie P2 protokołu Projektu 1. (po zakończeniu leczenia pulsami dożylnymi metyloprednizolonu) w dawce łącznej 7,5g ivMP; **GO-P2/7,5 g ivMP**, a kolorem zielonym (●) chorych z GO leczonych łączną dawką 4,5g ivMP (**GO-P2/4,5 g ivMP**). D. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG analizy; na osi x przedstawiono różnicę stopnia metylacji DNA, a na osi y wartość istotności statystycznej w formie $-\log_{10}(q\text{-value})$. Kolorem czerwonym oznaczono istotne CpG hipermetylowane, a kolorem niebieskim hipometylowane. Dinukleotydy CpG o najwyższej pozycji rankingowej znajdują się najwyżej.

Objaśnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2

VIII.2. Wyniki Projektu 2.

VIII.2.1. Charakterystyka chorych Projektu 2.

Tabela 8. Charakterystyka pacjentów dorosłych (AGD) i dzieci (PGD) ze świeżym rozpoznaniem GD.

Cecha	AGD, n=12	PGD, n=6	p
Wiek, lata, mdn (IQR)	43,5 (35,5-53)	15 (12-17)	0,0004
Kobiety, n (%)	9 (75%)	3 (50%)	ns
Nikotynizm, n (%)	7 (58,33%)	0 (0%)	0,053
Rodzinne wywiady AITD, n (%)	6 (50%)	5 (83,33%)	ns
Cechy AITD w USG tarczycy, n (%)	12 (100%)	6 (100%)	ns
TSH [uIU/ml], mdn (IQR)	zsupresjonowane (100%)	zsupresjonowane (100%)	ns
fT3 [pmol/l], mdn (IQR)	34,25 (27,5-36,45)	30,12 (21,04-44,47)	ns
fT4 [pmol/l], mdn (IQR)	73,4 (52,52-86,45)	82,38 (55,86-100)	ns
TRAb [IU/l], mdn (IQR)	13,4 (7,52-18,9)	27,95 (8,7-36,87)	ns

Uwagi: za zsupresjonowane stężenie TSH przyjęto <0.005 uIU/ml; ns – nieistotność statystyczna

Objaśnienia skrótów: AGD – dorośli chorzy z chorobą Gravesa i Basedowa, AITD – autoimmunologiczna choroba tarczycy, fT4 – wolna tyroksyna, fT3 – wolna trijodotyronina, IQR – zakres międzykwartyłowy, n – liczba uczestników, p – istotność statystyczna ($p<0,05$), PGD – dzieci z chorobą Gravesa i Basedowa, TRAb – przeciwciała przeciw receptorowi tyreotropiny, TSH - tyreotropina, USG – ultrasonografia

W Tabeli 8. podano wyniki analizy porównawczej w zakresie biochemicznych i klinicznych danych 2 grup chorych badania – pacjentów dorosłych i dzieci z GD (AGD, PGD).

Siedem osób zdrowych (6 kobiet) z medianą wieku 29 (25-40) lat stworzyło grupę kontrolną (HC), prezentując medianę stężenia TSH 2.5 (2.00-3.00) uIU/ml. Mediany wieku i stężenia TSH w kontrolach dziecięcych (pHC, n=5; 4 dziewczynki) wynosiły odpowiednio 15,5 (12-16 lat) i 2.5 (2.07-2.79) uIU/ml.

Nie odnotowano istotnych różnic w kliniczno-biochemicznej analizie ogólnej AGD vs. PGD (poza wiekiem chorych, Tabela 9.).

VIII.2.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem choroby Gravesa i Basedowa

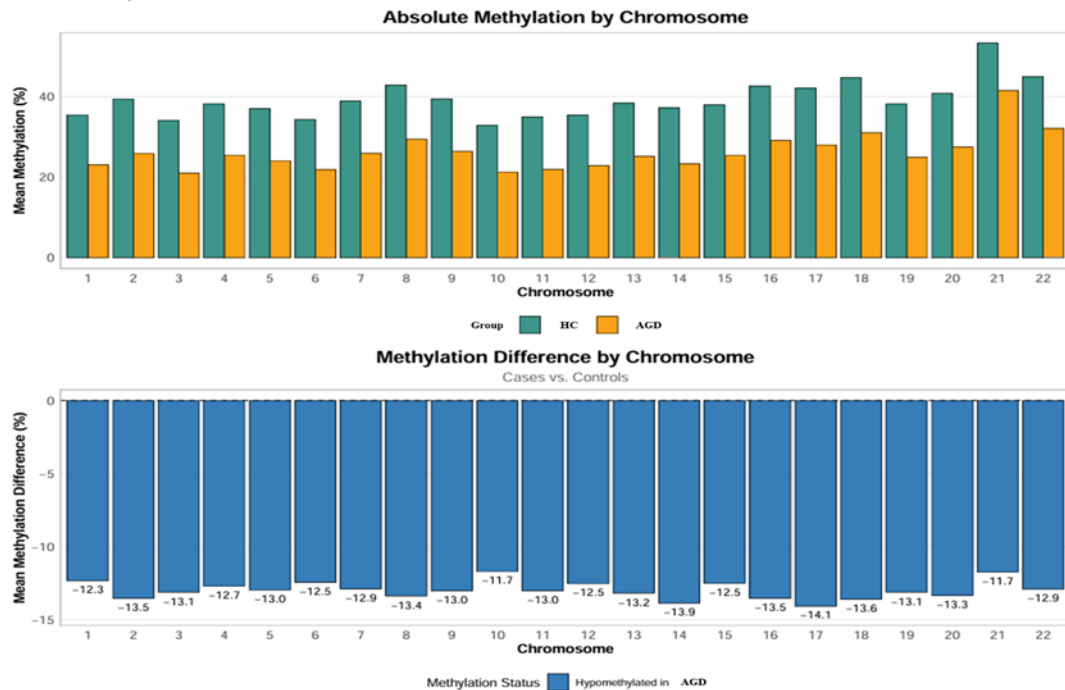
VIII.2.2.1. Analiza całogenomowej i szczegółowej metylacji DNA w grupie dorosłych chorych z chorobą Gravesa i Basedowa oraz zdrowych kontroli

W analizie uwzględniającej porównanie globalnego profilu DNAm dorosłych chorych z GD (AGD, n=12) oraz kontroli (HC, n=7) średnia różnica w stopniu DNAm wynosiła: -12,98% (hipometylacja w grupie AGD). W ujęciu całogenomowym, zaobserwowano hipometylację w grupie chorych AGD (Rycina 21-22.). W analizie głównych komponentów składowych (PCA) wykazano wyraźne grupowanie próbek i separację w obrębie analizowanych grup AGD i HC (Rycina 23.).

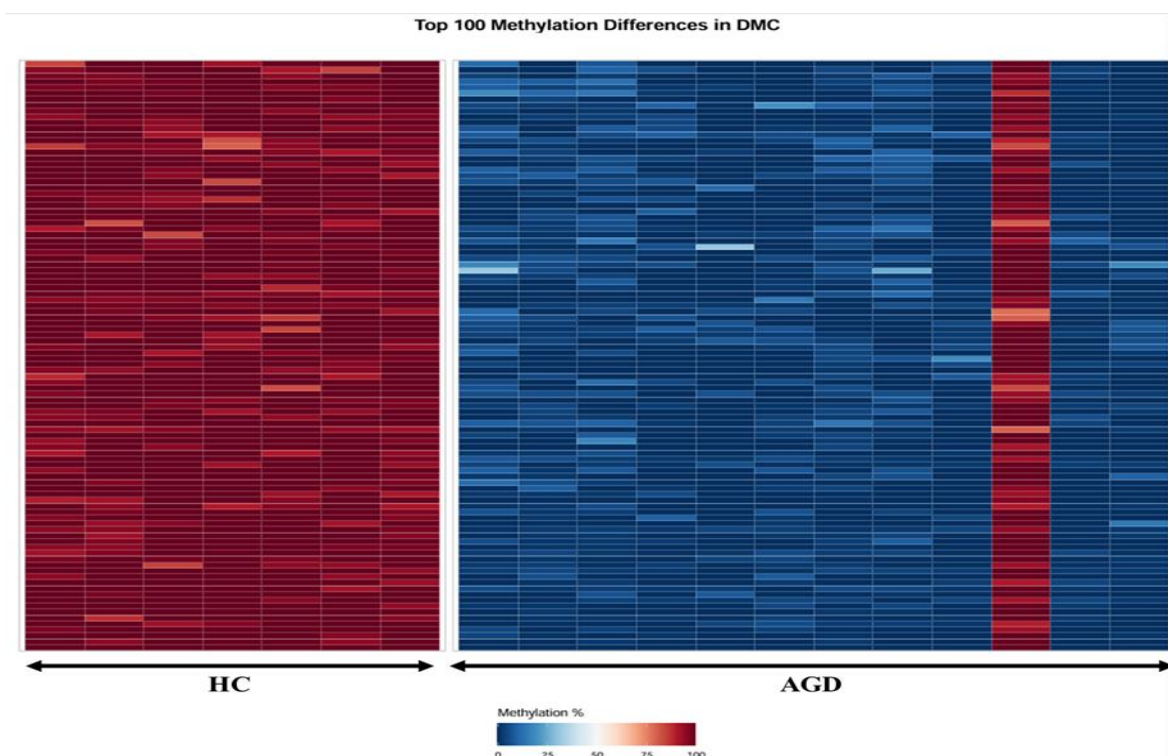
W kontekście wszystkich zbadanych DMRs, CpG rzutowane na regiony promotorowe stanowiły większość (Rycina 24.). Odnotowano 53030 odmiennie zmetylowanych CpG, w tym 10700 istotnych pozycji (20,18%). Wśród DMRs było 5228 istotnych CpG mapowanych na promotory genów (48.86%), 5554 istotnych CpG w obrębie CGI (51,9%), a 2727 (25,49%) stanowiły obrzeża CGI. Zidentyfikowano 7952 *loci* w oparciu o nomenklaturę HGNC. Na Rycinie 25. zobrazowano komplet istotnych CpG z uwzględnieniem podziału na regiony hipermetrylowane i hipometrylowane.

Chromosome Methylation Analysis

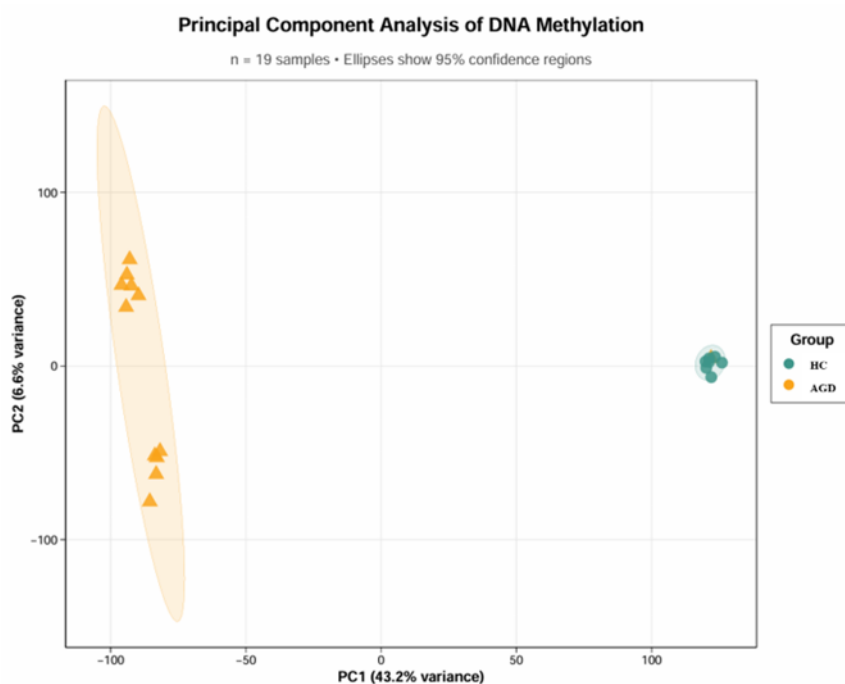
Based on 53030 CpG sites, 12 cases and 7 controls



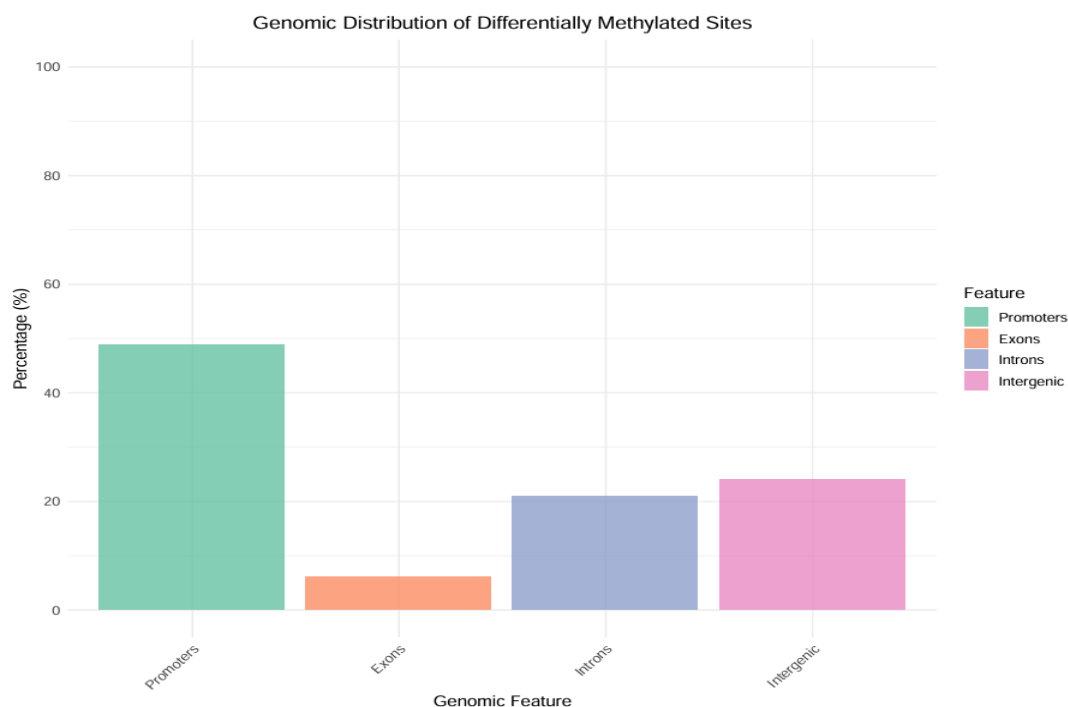
Rycina 21. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami **AGD** (pomarańczowy) i **HC** (zielony) w oparciu o podział względem DNAm na poziomie chromosomów. Część dolna ryciny prezentuje bezwzględną różnicę w DNAm dla poszczególnych chromosomów autosomalnych, względem grupy badanej (**AGD**).



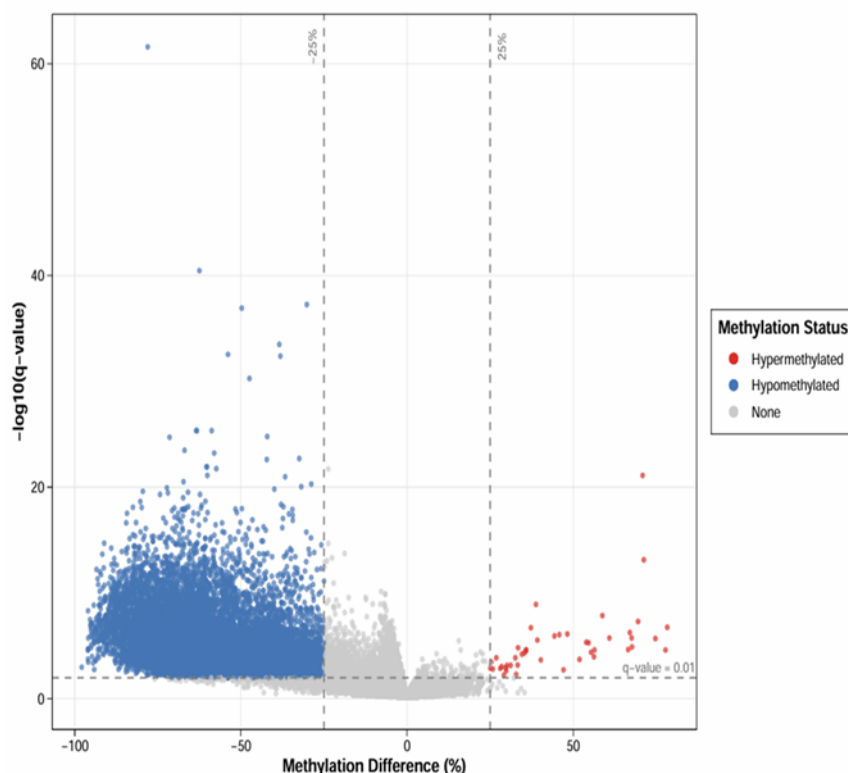
Rycina 22. Wykres heatmap, dla analizy różnicowej (top 100 CpG) grupy badanej – dorosłych chorych z GD, AGD (Case) oraz HC (control). Członkowie grup zostali oznaczeni strzałkami (kolumny). Kolorem niebieskim oznaczono wzorce DNAm **hipometylowane**, a czerwonym **hipermetylowane** (rzędy). Intensywność koloru danego wzorca odpowiada stopniowi metylacji DNA zgodnie z uwzględnioną skalą.



Rycina 23. Wyniki analizy porównawczej głównych komponentów składowych (PCA) dla grup: AGD vs. HC. Kolorem **pomarańczowym** (▲) oznaczono grupę badaną – dorosłych chorych z GD (**AGD**), a kolorem zielonym (●) zdrowe kontrole (**HC**). Objasnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2



Rycina 24. Prezentacja dystrybucji *loci* zawierających DMRs w kontekście całego genomu, na wykresach uwzględniono kolejno obszary chromosomowe: promotory genów, eksony, introny oraz regiony międzygenowe. (analiza chorych dorosłych z GD i zdrowych kontroli: AGD vs. HC).



Rycina 25. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie AGD vs. HC, na osi x przedstawiono różnicę stopnia metylacji DNA, a na osi y wartość istotności statystycznej w formie $-\log_{10}(q\text{-value})$. Kolorem czerwonym oznaczono istotne CpG **hipermetylowane**, a kolorem niebieskim **hipometylowane**. Dinukleotydy CpG o najwyższej pozycji rankingowej znajdują się najwyżej.

W Tabeli 9a-c. zaprezentowano wybrane, zróżnicowane i najważniejsze klinicznie oraz biologicznie, istotne regiony o odmiennej DNAm w obrębie sąsiadujących CpG. Grupę badaną stanowiła AGD i to względem niej określano hipo-/hipermetylację danego DMR (Tabela 9.). Poza zaprezentowanymi regionami, w analizie odkryto istotne CpG w innych lokacjach m.in.: pseudogenów i genów białek odpowiedzi immunologicznej (*CCLX*, *DLX1*, *IRF*, *IRAK3*), macierzy pozakomórkowej oraz proteaz (*MMP*, *ADAMTS*, *COL*), transportowych (*CACNA*, *ITGB*, *KCN*), sygnalizacji i łączności międzykomórkowej (*ATP*, *CYP*, *TMEM*), czynników wzrostu i cyklu komórkowego (*ARHGAP*, *CCN*, *CDKN*, *CEP*, *FAF*, *FGF*, *GATA*, *INSR*, *PAX*) oraz mechanizmów epigenetycznych (*CorfX*, *LINC*, *MIR*, *PHF*). Wśród hipermetylowanych (n=45) *loci* odnotowano m.in. *DHX32*, *FANK1*, *TNNI3K*.

Tabela 9a. Zestawienie wybranych (n=81) DMRs w obrębie analizy AGD vs. HC (kolejność alfabetyczna, lp. 1.-27.).

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
1	<i>AIRE</i>	chr21	45705721-45718531	wewnątrz	-28,05	2,35E-04	7,61E-04
2	<i>ALK</i>	chr2	29415640-30144432	powyżej	-80,36	6,19E-07	4,37E-06
3	<i>ATXN3</i>	chr14	92524896-92572965	wewnątrz	-35,81	1,72E-10	3,56E-09
4	<i>B3GNT3</i>	chr19	17905637-17923891	wewnątrz	-47,55	1,11E-07	9,82E-07
5	<i>BCL2</i>	chr18	60790579-60987361	wewnątrz	-32,14	2,89E-06	1,66E-05
6	<i>CALML6</i>	chr1	1846266-1848735	powyżej	-75,74	1,50E-03	4,02E-03
7	<i>CCR7</i>	chr17	38710021-38721724	poniżej	-53,99	6,11E-14	3,89E-12
8	<i>CD151</i>	chr11	832843-839831	powyżej	-84,51	2,33E-08	2,51E-07
9	<i>CD200</i>	chr3	112051194-112081659	wewnątrz	-69,38	3,25E-04	1,01E-03
10	<i>CD34</i>	chr1	208057594-208084747	powyżej	-58,94	1,80E-05	8,13E-05
11	<i>CD38</i>	chr4	15779898-15854853	wewnątrz	-29,54	4,35E-05	1,75E-04
12	<i>CD44</i>	chr11	35160417-35253949	wewnątrz	-44,68	1,61E-06	9,94E-06
13	<i>CD5</i>	chr11	60869867-60895324	wewnątrz	-85,42	3,28E-12	1,17E-10
14	<i>CD7</i>	chr17	80272744-80275478	wewnątrz	-43,73	5,56E-06	2,92E-05
15	<i>CD8A</i>	chr2	87011729-87035519	wewnątrz	-71,02	4,63E-11	1,12E-09
16	<i>CDK1</i>	chr10	62538089-62554610	wewnątrz	-59,40	2,90E-07	2,27E-06
17	<i>CDKN2C</i>	chr1	51426417-51440305	wewnątrz	-59,11	2,23E-05	9,79E-05
18	<i>CLDN3</i>	chr7	73183328-73184600	powyżej	-38,06	1,57E-04	5,35E-04
19	<i>COL2A1</i>	chr12	48366748-48398269	wewnątrz	-67,47	2,45E-05	1,06E-04
20	<i>CYP1A1</i>	chr15	75011883-75017951	powyżej	-65,22	3,59E-05	1,48E-04
21	<i>DIABLO</i>	chr12	122692210-122712081	wewnątrz	-47,97	3,74E-05	1,54E-04
22	<i>DICER1</i>	chr14	95552565-95624347	wewnątrz	-30,51	8,14E-04	2,32E-03
23	<i>DNMT3B</i>	chr20	31350191-31397162	wewnątrz	-61,96	1,55E-08	1,76E-07
24	<i>DRD2</i>	chr11	113280318-113346413	wewnątrz	-79,00	6,91E-09	8,68E-08
25	<i>ELOVL4</i>	chr6	80624529-80657297	wewnątrz	-59,76	1,13E-03	3,13E-03
26	<i>EZH2</i>	chr7	148504475-148581413	powyżej	-39,24	1,19E-05	5,61E-05
27	<i>FANK1</i>	chr10	127585108-127698161	powyżej	32,58	3,13E-05	1,32E-04

Objaśnienia skrótów: AIRE – białko regulacji autoimmunologicznej, ALK – kinaza ALK, ATXN3 – ataksyna 3, B3GNT3 – beta-1,3-N-acetyloglukozaminylotransferaza typu 3, BCL2 – czynnik apoptotyczny BCL2, CALML6 – kalmodulina 6, CCR7 – receptor C-C chemokiny typu 7, CD151 – antygen różnicowania komórkowego CD151, CD200 – antygen różnicowania komórkowego CD200, CD34 – antygen różnicowania komórkowego CD34, CD38 – antygen różnicowania komórkowego CD38, CD44 – antygen różnicowania komórkowego CD44, CD5 – antygen różnicowania komórkowego CD5, CD7 – antygen różnicowania komórkowego CD7, CD8A – antygen różnicowania komórkowego CD8A, CDK1 – cyklozależna kinaza 1, CDKN2C – inhibitor kinazy cyklozależnej 2C, CLDN3 – kładyna 3, COL2A1 – łańcuch alfa-1 kolagenu typu 2, CYP1A1 – białko cytochromu P450 A1, DIABLO – białko mitochondrialne DIABLO, DICER1 – enzym DICER (również rybonukleaza typu III), DNMT3B – DNA-metylotransferaza 3B, DRD2 – receptor dopaminowy D2, ELOVL4 – elongaza długłańcuchowych kwasów tłuszczowych typu 4, EZH2 – metylotransferaza EZH2, FANK1 – białko 1 z domenami fibronektyny typu III i ankiryne

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

c.d. **Tabela 9b.** Zestawienie wybranych (n=81) DMRs w obrębie analizy AGD vs. HC (kolejność alfabetyczna, lp. 28.-54.).

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
28	<i>FCRLB</i>	chr1	161691353-161697933	wewnątrz	-74,00	1,96E-07	1,62E-06
29	<i>FGFR1</i>	chr8	38268656-38326352	wewnątrz	-64,29	1,75E-03	4,62E-03
30	<i>FOXP1</i>	chr3	71003844-71633140	wewnątrz	-33,63	1,62E-03	4,30E-03
31	<i>GATA2</i>	chr3	128198270-128212028	wewnątrz	-62,14	6,00E-08	5,73E-07
32	<i>GLI3</i>	chr7	42000548-42277469	wewnątrz	-71,14	3,11E-05	1,31E-04
33	<i>GRM1</i>	chr6	146348782-146758734	wewnątrz	-50,55	8,04E-05	2,98E-04
34	<i>H3F3AP6</i>	chr4	140619298-140619708	powyżej	-67,16	6,09E-07	4,31E-06
35	<i>HCP5</i>	chr6	31368479-31445283	powyżej	-71,44	1,32E-09	2,09E-08
36	<i>HLA-C</i>	chr6	31236526-31239907	wewnątrz	-68,42	4,45E-04	1,34E-03
37	<i>HLA-DPA1</i>	chr6	33032346-33048552	powyżej	-25,06	7,47E-07	5,15E-06
38	<i>ICAM1</i>	chr19	10381511-10397291	wewnątrz	-58,32	1,80E-06	1,10E-05
39	<i>ICAM5</i>	chr19	10400657-10407454	wewnątrz	-58,92	5,60E-08	5,39E-07
40	<i>IGF1R</i>	chr15	99192200-99507759	wewnątrz	-32,31	2,32E-04	7,52E-04
41	<i>IL12RB1</i>	chr19	18169805-18209754	powyżej	-86,03	1,07E-04	3,82E-04
42	<i>IL17REL</i>	chr22	50432942-50451088	poniżej	-64,87	1,37E-06	8,65E-06
43	<i>IL2RA</i>	chr10	6052652-6104288	wewnątrz	-64,31	1,50E-12	5,96E-11
44	<i>IL6R</i>	chr1	154377669-154441926	wewnątrz	-62,64	9,58E-07	6,34E-06
45	<i>IRS2</i>	chr13	110406184-110438915	wewnątrz	-79,76	1,48E-04	5,08E-04
46	<i>ITGA4</i>	chr2	182321929-182400914	wewnątrz	-33,41	1,95E-05	8,71E-05
47	<i>JAK2</i>	chr9	4985033-5128183	wewnątrz	-26,87	3,43E-06	1,93E-05
48	<i>KLF9</i>	chr9	72999503-73029540	powyżej	-71,05	1,91E-07	1,58E-06
49	<i>LCK</i>	chr1	32716840-32751766	wewnątrz	-63,12	1,12E-05	5,33E-05
50	<i>LIF</i>	chr22	30636436-30642840	wewnątrz	-33,08	1,14E-03	3,14E-03
51	<i>LIM2</i>	chr19	51883163-51891214	wewnątrz	-67,46	1,90E-21	1,26E-18
52	<i>LLGL2</i>	chr17	73521161-73571289	wewnątrz	-62,35	3,17E-07	2,45E-06
53	<i>LOXL3</i>	chr2	74759541-74782817	wewnątrz	-69,19	1,23E-06	7,84E-06
54	<i>LTA</i>	chr6	31539831-31542101	wewnątrz	-49,96	2,95E-05	1,25E-04

Objaśnienia skrótów: FCRLB – białko podobne do receptora Fc typu B, FGFR1 – receptor typu 1 dla czynnika wzrostu fibroblastów, FOXP1 – czynnik transkrypcyjny FOXP1, GATA2 – czynnik transkrypcyjny GATA2, GLI3 – białko z domeną palca cynkowego z rodziny GLI3, GRM1 – receptor metabotropowy glutaminianu 1, H3F3AP6 – pseudogen 6 histonu H3 z rodziny 3A, HCP5 – białko typu 5 kompleksu zgodności tkankowej, HLA-C – antygen zgodności tkankowej typu C, HLA-DPA1 – antygen zgodności tkankowej typu DPA1, ICAM1 – międzykomórkowa cząsteczka adhezji 1, ICAM5 – międzykomórkowa cząsteczka adhezji 5, IGF1R – receptor dla insulinopodobnego czynnika wzrostu typu 1, IL-12RB1 – podjednostka beta receptora interleukiny 12, IL-17REL – białko podobne do receptora E dla interleukiny 17, IL-2RA – podjednostka alfa receptora interleukiny 2, IL-6R – receptor dla interleukiny 6, IRS2 – związane z receptorem insuliny białko typu 2, ITGA4 – integryna alfa typu 4, JAK2 – kinaza janusowa JAK2, KLF9 – czynnik transkrypcyjny KLF-9, LCK – kinaza tyrozynowa z rodziny Src, LIF – białko hamujące białaczkę, LIM2 – białko typu 2 wewnętrznej błony soczewki, LLGL2 – białko LLGL2, LOXL3 – oksydaza lizylowa typu 3, LTA – limfotoksyna A

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

c.d. **Tabela 9c.** Zestawienie wybranych (n=81) DMRs w obrębie analizy AGD vs. HC (kolejność alfabetyczna, lp. 55.-81.).

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
55	<i>MAGI3</i>	chr1	113933371-114228545	powyżej	-65,91	8,79E-10	1,47E-08
56	<i>MICA</i>	chr6	31371356-31383092	powyżej	-75,64	1,27E-06	8,09E-06
57	<i>MIF</i>	chr22	24236191-24237414	poniżej	-36,60	7,65E-05	2,84E-04
58	<i>MIR146B</i>	chr10	104196269-104196341	poniżej	-57,77	3,17E-03	7,87E-03
59	<i>MMP14</i>	chr14	23305766-23318236	wewnątrz	-29,56	2,44E-09	3,53E-08
60	<i>MTOR</i>	chr1	11166592-11322564	powyżej	-52,23	2,00E-04	6,61E-04
61	<i>NFKB1</i>	chr4	103422486-103538459	wewnątrz	-60,68	7,46E-04	2,14E-03
62	<i>PRICKLE1</i>	chr12	42852140-42984157	wewnątrz	-75,04	1,21E-08	1,42E-07
63	<i>PTPN11</i>	chr12	112856155-112947717	powyżej	-82,20	1,61E-14	1,28E-12
64	<i>RAB8A</i>	chr19	16222439-16245044	powyżej	-69,34	8,08E-07	5,50E-06
65	<i>RARA</i>	chr17	38465444-38513094	wewnątrz	-34,43	3,37E-03	8,31E-03
66	<i>RYR3</i>	chr15	33603163-34158303	wewnątrz	-67,20	1,23E-06	7,84E-06
67	<i>S100A10</i>	chr1	151955391-151966866	wewnątrz	-62,73	3,39E-04	1,05E-03
68	<i>SCGB1D4</i>	chr11	62063754-62066536	powyżej	-58,16	8,36E-06	4,16E-05
69	<i>SCN8A</i>	chr12	51984050-52206648	wewnątrz	-35,05	1,63E-03	4,35E-03
70	<i>SERPINE1</i>	chr7	100770370-100782547	powyżej	-74,00	1,98E-07	1,63E-06
71	<i>SLC39A12</i>	chr10	18240768-18332221	powyżej	-68,96	5,22E-09	6,77E-08
72	<i>SMAD4</i>	chr18	48494410-48611415	wewnątrz	-87,38	2,87E-07	2,26E-06
73	<i>STAT3</i>	chr17	40465342-40540586	wewnątrz	-86,39	3,17E-04	9,92E-04
74	<i>TGFB1</i>	chr19	41807492-41859816	wewnątrz	-58,13	1,01E-06	6,63E-06
75	<i>THEM6</i>	chr8	143808621-143818345	powyżej	-68,06	7,12E-06	3,62E-05
76	<i>TIMP4</i>	chr3	12194551-12200851	wewnątrz	-43,76	1,87E-07	1,55E-06
77	<i>TNFRSF1B</i>	chr1	12227060-12269285	wewnątrz	-63,82	8,63E-04	2,45E-03
78	<i>TP53</i>	chr17	7565097-7590856	wewnątrz	-64,28	7,19E-05	2,70E-04
79	<i>TRAF1</i>	chr9	123664671-123691451	powyżej	-59,92	1,96E-12	7,51E-11
80	<i>WNT2</i>	chr7	116916685-116963343	powyżej	-70,00	3,64E-08	3,70E-07
81	<i>ZNF2</i>	chr2	95831177-95850065	wewnątrz	-75,00	2,41E-04	7,80E-04

Objaśnienia skrótów: *MAGI3* – związana z błoną komórkową kinaza guanylowa typu 3, *MICA* – sekwencja A związana z MHC klasy I, *MIF* – czynnik hamujący migrację makrofagów, *MIR146B* – miRNA 146B, *MMP14* – metaloproteinaza 14, *MTOR* – kinaza mTOR, *NFKB1* – czynnik transkrypcyjny NFKB1, *PRICKLE1* – białko planarnej polarności typu 1, *PTPN11* – niereceptorowa fosfataza tyrozynowa typu 11, *RAB8A* – GTP-aza *RAB8A*, *RARA* – receptor alfa dla kwasu retinowego, *RYR3* – receptor rianodynowy typu 3, *S100A10* – białko wiążące wapń *S100A11*, *SCGB1D4* – sekretoglobulina rodziny B1 typu D4, *SCN8A* – podjednostka alfa 8 kanału sodowego bramkowanego napięciem, *SERPINE1* – białko z rodziny serpin E1, *SLC39A12* – białko *SLC39A12*, *SMAD4* – czynnik transkrypcyjny *SMAD4*, *STAT3* – czynnik transkrypcyjny *STAT3*, *TGFB1* – transformujący czynnik wzrostu beta-1, *THEM6* – tioesteraza typu 6, *TIMP4* – tkankowy inhibitor metaloproteinaz typu 4, *TNFRSF1B* – receptor czynnika martwicy nowotworu typu 1B, *TP53* – czynnik transkrypcyjny *TP53*, *TRAF1* – związany z receptorem dla TNF czynnik typu 1, *WNT2* – białko *WNT2*, *ZNF2* – białko z domeną palca cynkowego *ZNF2*

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

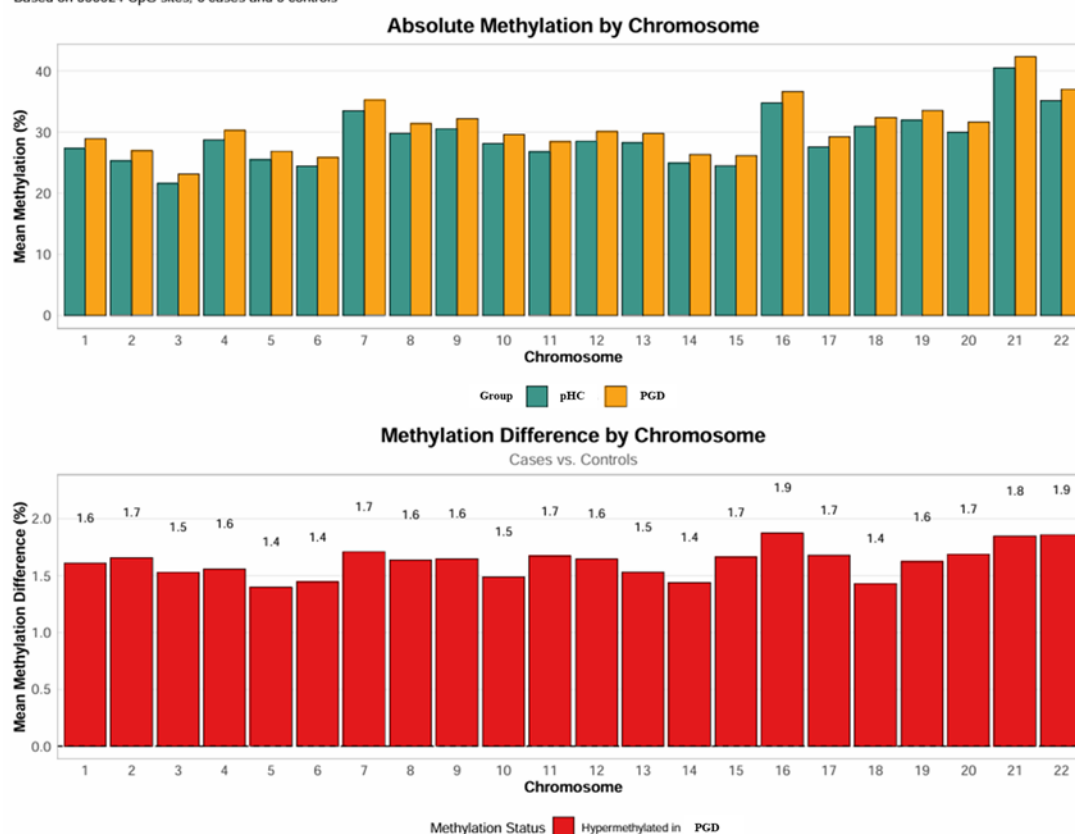
VIII.2.2.2. Analiza całogenomowej i szczegółowej metylacji DNA w grupie dzieci z chorobą Gravesa i Basedowa oraz zdrowych kontroli

W analizie globalnego profilu DNAm między grupami dzieci zdrowych (pHC, n=5) i PGD (n=6) wykazano średnią różnicę w stopniu DNAm rzędu: 1,93% (hipermetylacja PGD). W kontekście różnic stopnia DNAm dla poszczególnych chromosomów uwidoczniło się hipermetylację w grupie chorych. Analiza wzorców metylacyjnych omawianych grup w skali genomu nie pokazała zależności (grafika heatmap, Rycina 27.), uwidaczniając chaotyczny rozkład DNAm. W analizie PCA nie obserwowano grupowania się próbek dzieci chorych i zdrowych, klastry zachodziły na siebie (Rycina 28.).

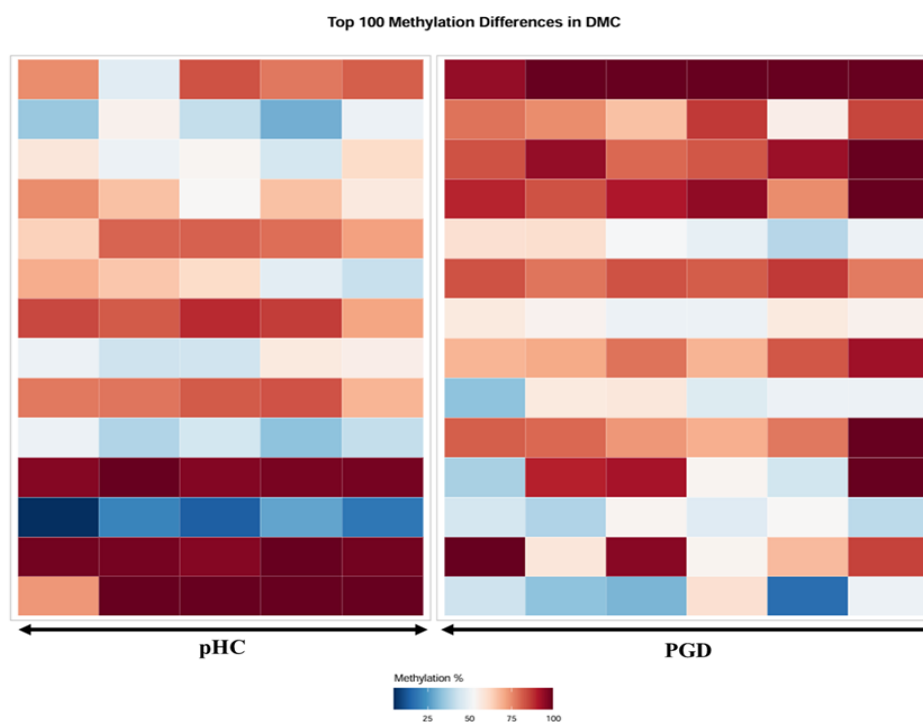
Wśród wszystkich znalezionych DMRs przeważały regiony intergenowe oraz introny (Rycina 29.). Na Rycinie 30. zobrazowano komplet istotnych CpG z uwzględnieniem podziału na regiony hipermetylowane i hipometylowane. Podsumowanie wybranych (n=11), zróżnicowanych funkcjonalnie genów w sąsiedztwie istotnych CpG przedstawiono w Tabeli 10. W analizie uwzględniającej porównanie w zakresie DMCs odnotowano 350024 odmiennie zmetylowanych regionów, z czego 18 pozycji CpG było istotnych, a 11 zidentyfikowano wg HGNC.

Chromosome Methylation Analysis

Based on 350024 CpG sites, 6 cases and 5 controls

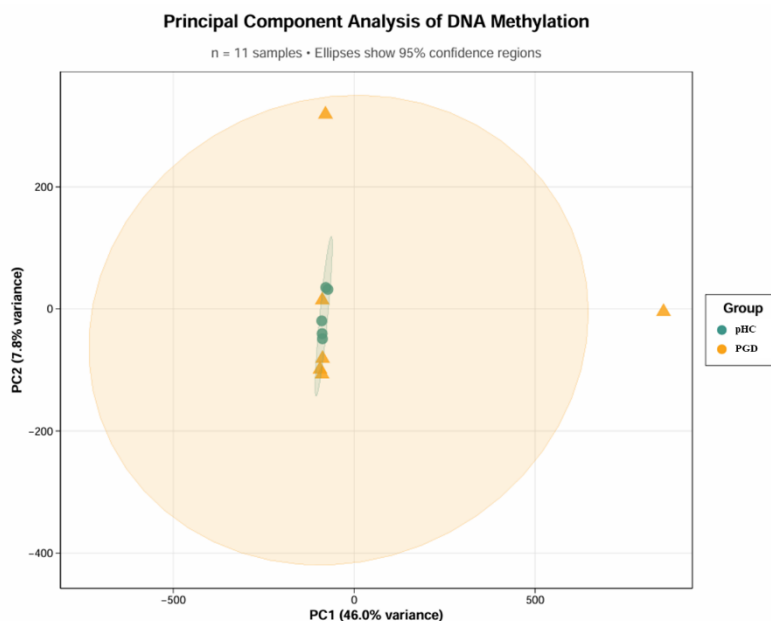


Rycina 26. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami **pHC** (zielony) i **PGD** (pomarańczowy) w oparciu o podział względem DNAm na poziomie chromosomów. Część dolna ryciny prezentuje bezwzględną różnicę w DNAm dla poszczególnych chromosomów autosomalnych dla grupy badanej (**PGD**).

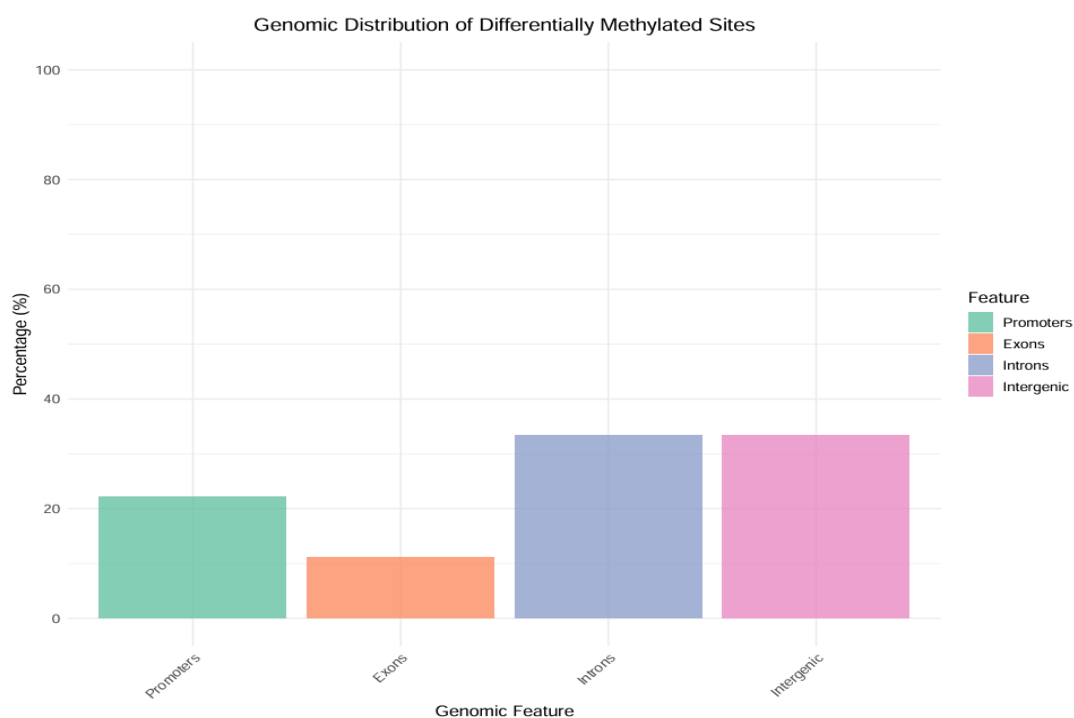


Rycina 27. Wykres heatmap dla analizy różnicowej (top 100 CpG) grup dziecięcych, z GD – PGD oraz kontroli – pHC (strzałki), uczestnicy analizy zostali przedstawieni w kolumnach. Kolorem niebieskim oznaczono wzorce

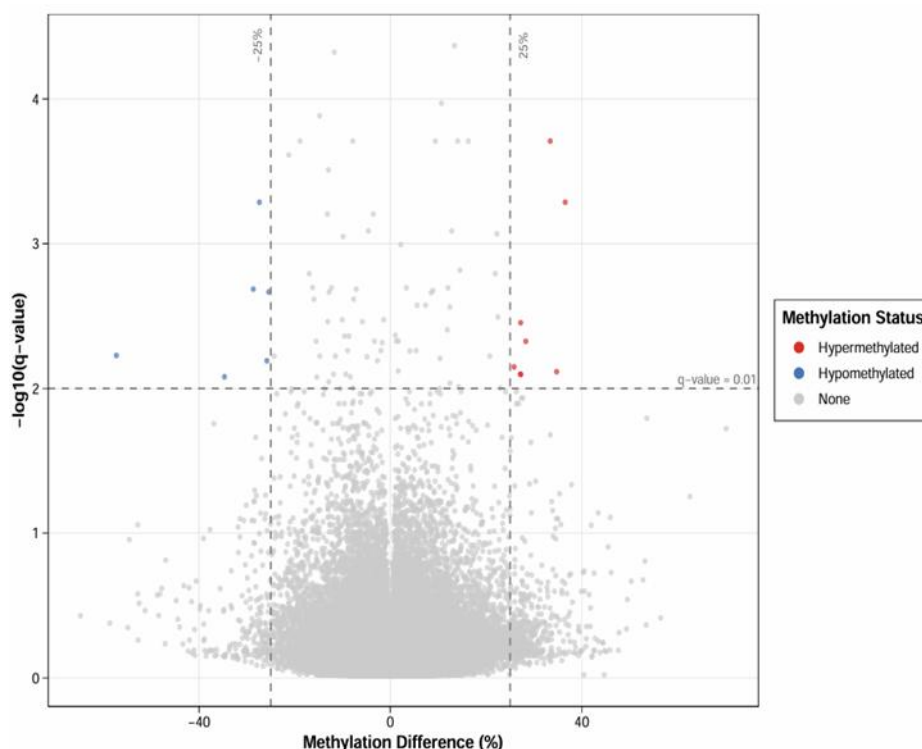
DNAm **hipometylowane**, a czerwonym **hipermetylowane** (w rzędach). Intensywność koloru danego wzorca odpowiada stopniowi metylacji DNA zgodnie z uwzględnioną skalą.



Rycina 28. Wyniki analizy porównawczej głównych komponentów składowych (PCA) dla grup: PGD vs. pHC. Kolorem **pomarańczowym** (▲) oznaczono grupę badaną – dzieci z GD (**PGD**), a kolorem zielonym (●) zdrowe kontrole dziecięce (**pHC**). Objasnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2



Rycina 29. Prezentacja dystrybucji *loci* zawierających DMRs w kontekście całego genomu, na wykresach uwzględniono kolejno obszary chromosomowe: promotory genów, eksony, introny oraz regiony międzygenowe (analiza chorych dzieci z GD i zdrowych kontroli dziecięcych: PGD vs. pHC).



Rycina 30. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie pHc vs. PGD, na osi x przedstawiono różnicę stopnia metylacji DNA, a na osi y wartość istotności statystycznej w formie $-\log_{10}(q\text{-value})$. Kolorem czerwonym oznaczono istotne CpG **hipermetylowane**, a kolorem niebieskim **hipometylowane**. Dinukleotydy CpG o najwyższej pozycji rankingowej znajdują się najwyżej.

Tabela 10. Zestawienie wybranych (n=11) spośród istotnych DMRs (18). Analizowane grupy: PGD vs. pHc (kolejność alfabetyczna).

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
1	<i>CALML5</i>	chr10	5540658-5541533	poniżej	-32,90	1,72E-06	7,92E-03
2	<i>GDNF</i>	chr5	37812779-37839788	wewnątrz	27,98	2,29E-06	8,98E-03
3	<i>LRCOL1</i>	chr12	133179736-133187037	poniżej	-29,93	8,31E-07	5,07E-03
4	<i>MAFK</i>	chr7	1570350-1582679	wewnątrz	-25,69	2,45E-06	9,26E-03
5	<i>MDS2</i>	chr1	23907985-23967058	wewnątrz	27,77	2,40E-07	2,21E-03
6	<i>METRNL</i>	chr17	81037567-81052864	wewnątrz	-28,29	5,99E-08	1,02E-03
7	<i>NKX6-3</i>	chr8	41502697-41508855	powyżej	-43,65	8,99E-10	7,68E-05
8	<i>ONECUT1</i>	chr15	53049637-53083273	wewnątrz	25,67	3,47E-07	2,95E-03
9	<i>OSM</i>	chr22	30658818-30662829	powyżej	-40,54	2,31E-07	2,20E-03
10	<i>RAB18</i>	chr10	27793197-27831143	powyżej	-42,80	2,13E-06	8,75E-03
11	<i>TAGLN</i>	chr11	117070037-117075498	powyżej	-53,81	6,99E-08	1,10E-03

Objaśnienia skrótów: CALML5 – kalmodulina 5, GDNF – czynnik neurotroficzny komórek glejowych, LRCOL1 – kolipaza bogata w leucynę typu 1, MAFK – czynnik transkrypcyjny MAFK, MDS2 – lncRNA związane z zespołem mielodysplastycznym i translokacją, METRNL – miokina METRNL, NKX6-3 – czynnik transkrypcyjny NKX6-3, ONECUT1 – białko ONECUT1, OSM – onkostatyna M, RAB18 – GTP-aza RAB18, TAGLN – transgelina

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

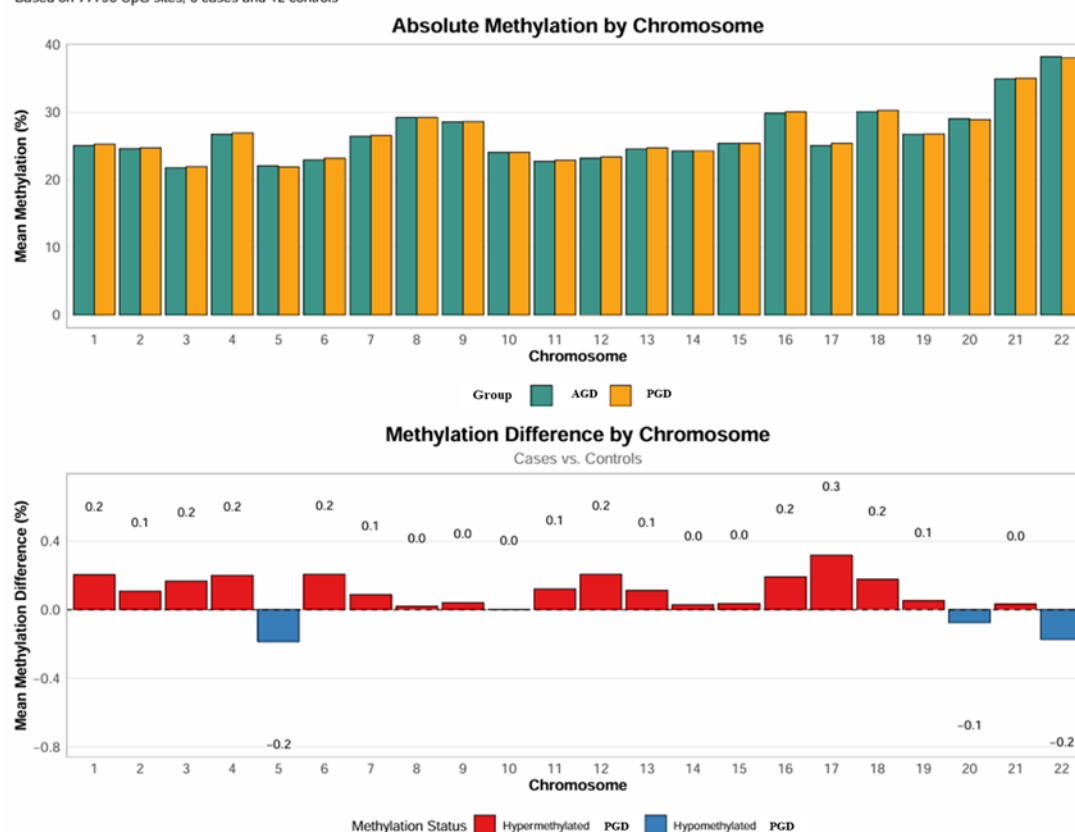
VIII.2.2.3. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a wiekiem rozwoju Choroby Gravesa i Basedowa

Średnia różnica stopnia DNAm między grupami: PGD i AGD wyniosła 0,086% (hipermetylacja grupy PGD). W ujęciu całościowym genomu obserwowano hipermetylację niewielkiego stopnia w grupie dzieci z GD dla poszczególnych chromosomów (poza chromosomami 5., 20. oraz 22., Rycina 31.), a także mieszane wzorce DNAm z widocznym wpływem palenia tytoniu różnicującym i) chorych AGD palących oraz ii) AGD niepalących wraz z PGD (Rycina 32A-B.; próbki odstające oznaczono: *, natomiast chorą z wywiadem 3 paczkołat, niepalącą od 2 lat, oznaczono: *). W analizie PCA zaobserwowano dwubiegunowy zbiór próbek AGD, nachodzący na klaster PGD. Ponadto, odnotowano formowanie się odrębnego klastra (n=5 chorych, Rycina 33.), zawierającego cztery osoby palące papierosy oraz jedną niepalącą z grupy AGD.

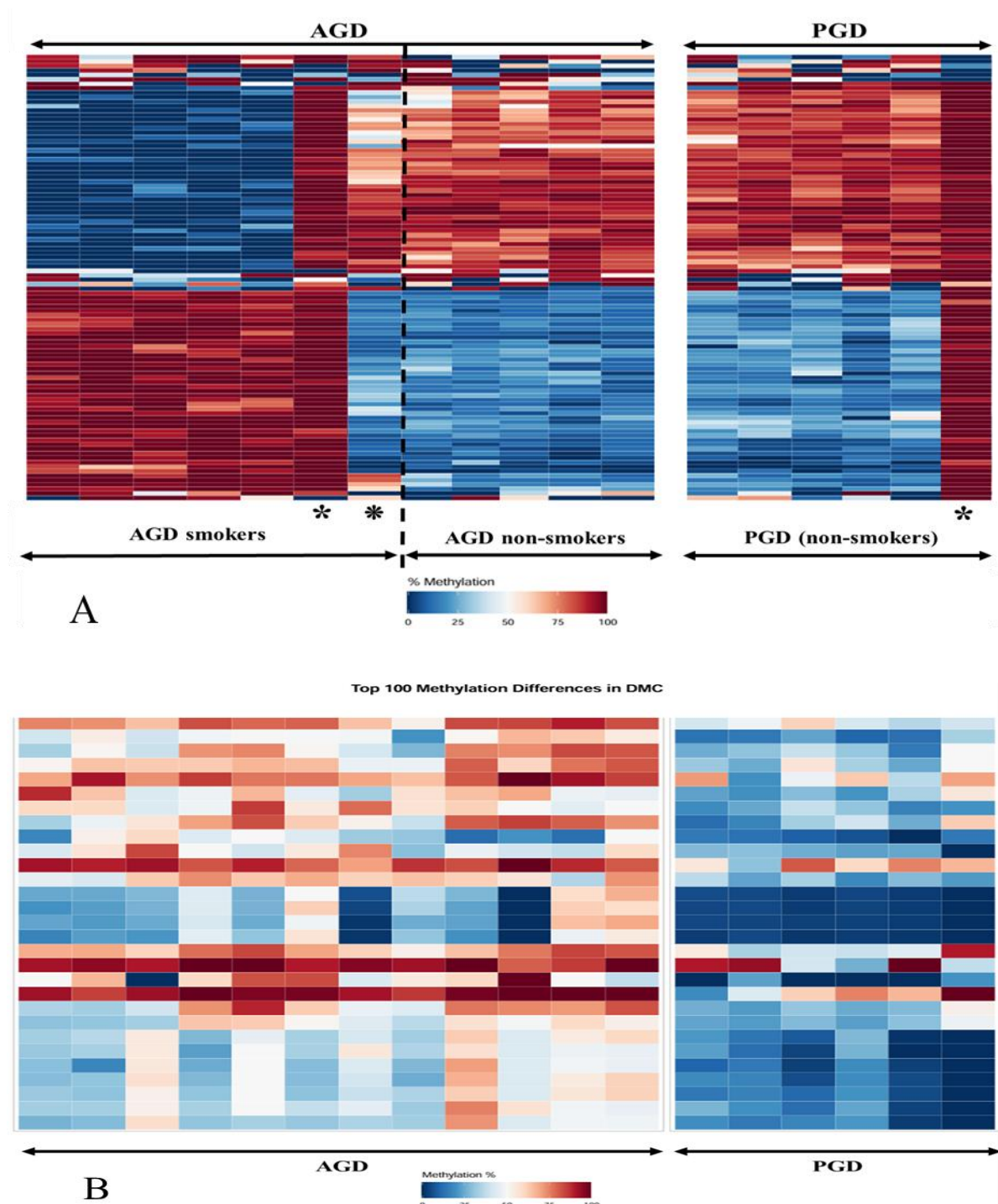
Większość regionów spośród wszystkich DMRs stanowiły te intergenowe (Rycina 34.). Na Rycinie 35., w formie wykresu wulkanicznego zobrazowano komplet istotnych CpG z uwzględnieniem podziału na regiony hipermetylowane i hipometylowane. W analizie uwzględniającej porównanie szczegółowe CpG w skali całego genomu odnotowano 77790 odmiennie zmetylowanych CpG, n=29 pozycji CpG wykazało znamienność statystyczną. Zidentyfikowano 14 *loci* wg HGNC. Podsumowanie wybranych (n=14), zróżnicowanych funkcjonalnie genów w sąsiedztwie odkrytych istotnych CpG przedstawiono w Tabeli 11.

Chromosome Methylation Analysis

Based on 77790 CpG sites, 6 cases and 12 controls

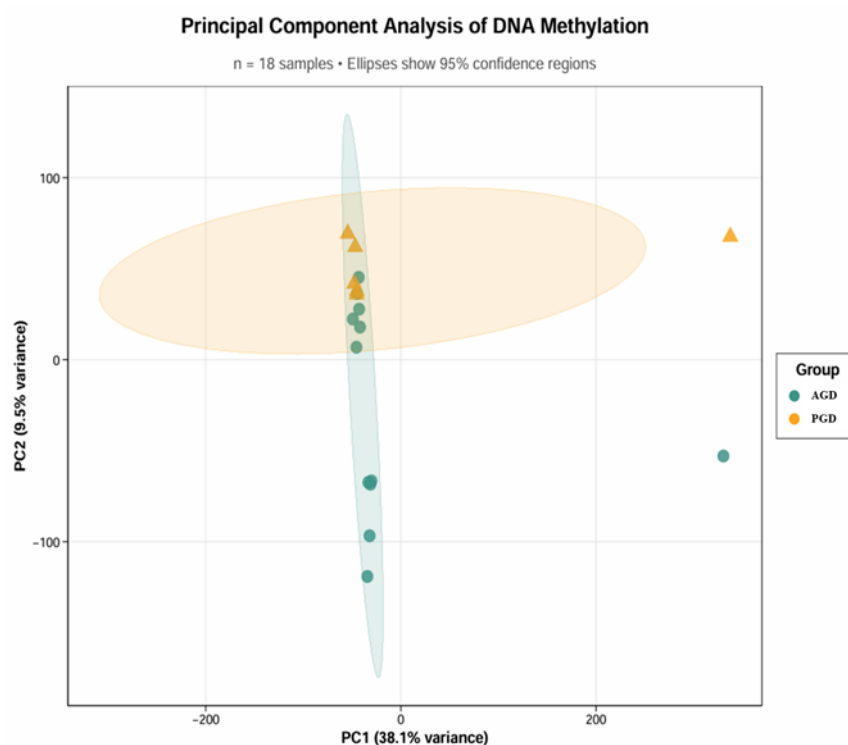


Rycina 31. Zestawienie globalnego profilu DNAm między grupami **PGD** (pomarańczowy) i **AGD** (zielony) w oparciu o podział względem DNAm na poziomie chromosomów. Część dolna ryciny prezentuje bezwzględną różnicę w DNAm dla poszczególnych chromosomów autosomalnych, względem grupy badanej (**PGD**).

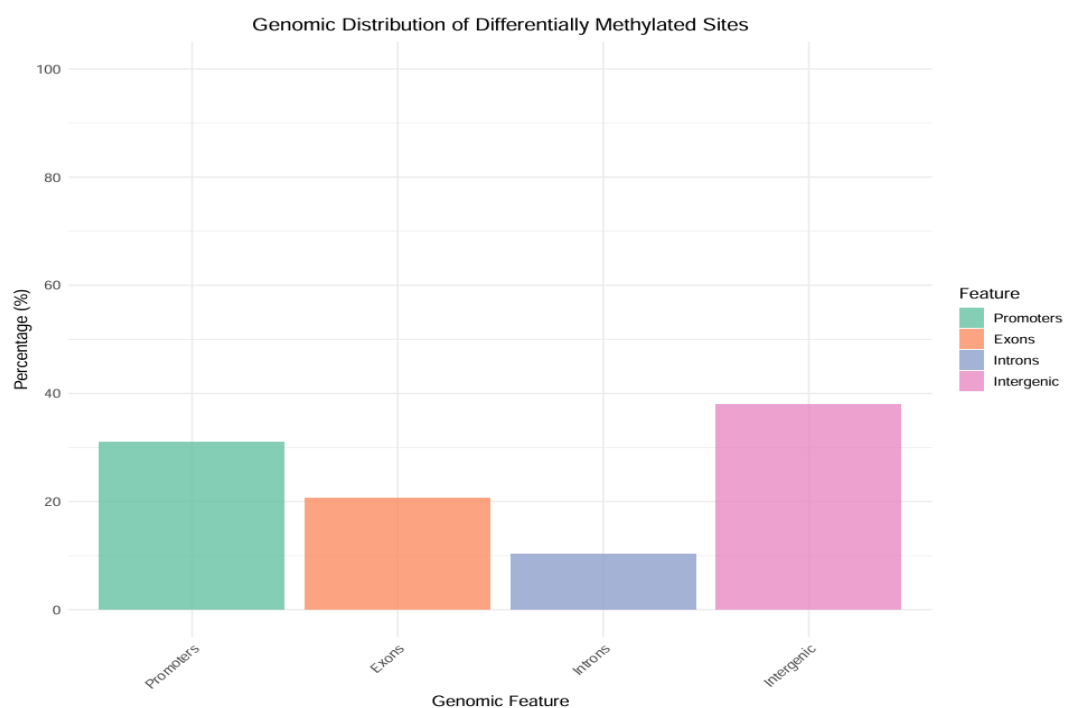


Rycina 32 A-B. Wykresy heatmap, dla analizy różnicowej chorych z GD; grupa badana – PGD, kontrolna – AGD, członkowie grup (w odpowiadających kolumnach) zostali oznaczeni strzałkami. Kolorem niebieskim oznaczono wzorce DNAm **hipometylowane**, a czerwonym **hipermetylowane** (rzędy). Intensywność koloru danego wzorca odpowiada stopniowi metylacji DNA zgodnie z uwzględnioną skalą. A. Wzorce globalne („hierarchikal” heatmap) z uwzględnieniem nikotynizmu (smokers) różnicującego grupę AGD (wszystkie dzieci tworzące grupę PGD nie paliły papierosów); B. Zestawienie 100 topowych wzorców DNAm w obrębie CpG („differential” heatmap) dla analizy AGD vs. PGD. W analizie topowych CpG, której wyniki przedstawiono na wykresie, nie uwzględniono stratyfikacji względem nikotynizmu dla grupy dorosłych (AGD).

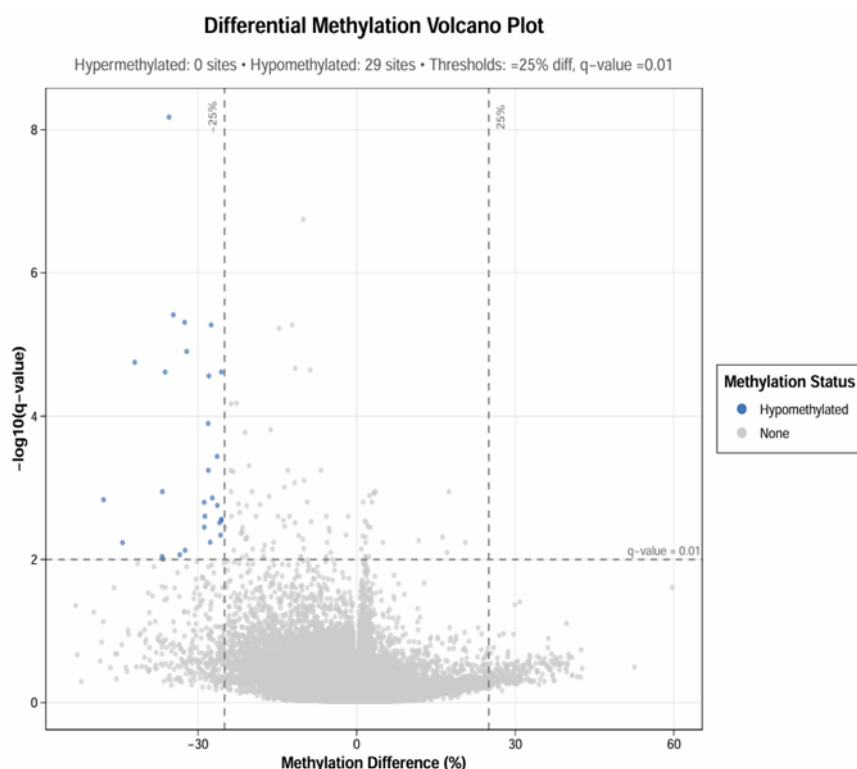
* próbki odstające (dot. PCA Rycina 33.); * chora z wywiadem 3 paczkołat, niepaląca od 2 lat



Rycina 33. Wyniki analizy porównawczej głównych komponentów składowych (PCA) dla grup: PGD vs. AGD. Kolorem **pomarańczowym** (▲) oznaczono grupę badaną – dzieci z GD (**PGD**), a kolorem zielonym (●) dorosłych chorych z GD (**AGD**). Objaśnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2. Objaśnienia skrótów: PC1 – główny komponent składowy 1, PC2 – główny komponent składowy 2.



Rycina 34. Prezentacja dystrybucji *loci* zawierających DMRs w kontekście całego genomu, na wykresach uwzględniono kolejno obszary chromosomowe: promotory genów, eksony, introny oraz regiony międzygenowe (analiza chorych z GD w zależności od wieku: PGD vs. AGD).



Rycina 35. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie chorych w zależności od wieku (PGD vs. AGD), na osi x przedstawiono różnicę stopnia metylacji DNA, a na osi y wartość istotności statystycznej w formie $-\log_{10}(q\text{-value})$. Kolorem czerwonym oznaczono istotne CpG **hipermetylowane**, a kolorem niebieskim **hipometylowane**. Dinukleotydy CpG o najwyższej pozycji rankingowej znajdują się najwyżej. W analizie topowych CpG, której wyniki przedstawiono na wykresie, nie uwzględniono stratyfikacji względem nikotynizmu dla grupy dorosłych (AGD).

Tabela 11. Zestawienie wybranych (n=14), spośród wszystkich odnotowanych istotnych DMRs (n=29), w obrębie analizy dorosłych i dzieci z GD (kolejność alfabetyczna).

Lp.	Gen	Chromosom	Pozycja	Lokalizacja względem TSS	Różnica stopnia DNAm (%)	p	q
1	<i>C9orf92</i>	chr9	16203933-16276311	wewnątrz	-32,46	1,02E-05	7,46E-03
2	<i>CDK2AP2P2</i>	chr9	66500642-66501008	wewnątrz	-36,74	5,16E-07	1,13E-03
3	<i>CDK2AP2P2</i>	chr9	66500642-66501008	wewnątrz	-44,29	7,45E-06	5,82E-03
4	<i>CDK2AP2P2</i>	chr9	66500642-66501008	wewnątrz	-35,48	9,22E-14	6,70E-09
5	<i>CDK2AP2P2</i>	chr9	66500642-66501008	wewnątrz	-36,23	4,34E-09	2,43E-05
6	<i>DPH3P1</i>	chr20	61476490-61477543	powyżej	-25,74	4,81E-06	4,58E-03
7	<i>FANK1</i>	chr10	127585108-127698161	wewnątrz	-25,57	2,27E-06	2,84E-03
8	<i>FANK1</i>	chr10	127585108-127698161	wewnątrz	-33,47	1,23E-05	8,61E-03
9	<i>GRM2</i>	chr3	51741086-51752629	wewnątrz	-28,06	1,83E-07	5,70E-04
10	<i>GRM2</i>	chr3	51741086-51752629	wewnątrz	-28,08	2,96E-08	1,26E-04
11	<i>NUDT14</i>	chr14	105639275-105647660	powyżej	-27,70	6,96E-06	5,75E-03
12	<i>RPSAP4</i>	chr14	95192625-95193512	powyżej	-36,60	1,59E-05	9,90E-03
13	<i>SLC9C1</i>	chr3	111859734-112013105	wewnątrz	-32,54	2,70E-10	4,91E-06
14	<i>UTF1</i>	chr10	135043778-135045062	powyżej	-41,97	2,19E-09	1,77E-05

Objaśnienia skrótów: C9orf92 – białko C9orf92, CDK2AP2P2 – pseudogen 2 dla białka związanego z kinazami typu 2 zależnymi od cyklin 2, DPH3P1 – pseudogen typu 1 biosyntezy diftamidu 3, FANK1 – białko 1 z domenami fibronektyny typu III i ankiryiny, GRM2 – receptor metabotropowy glutaminianu 2, NUDT14 – hydrolaza Nudix

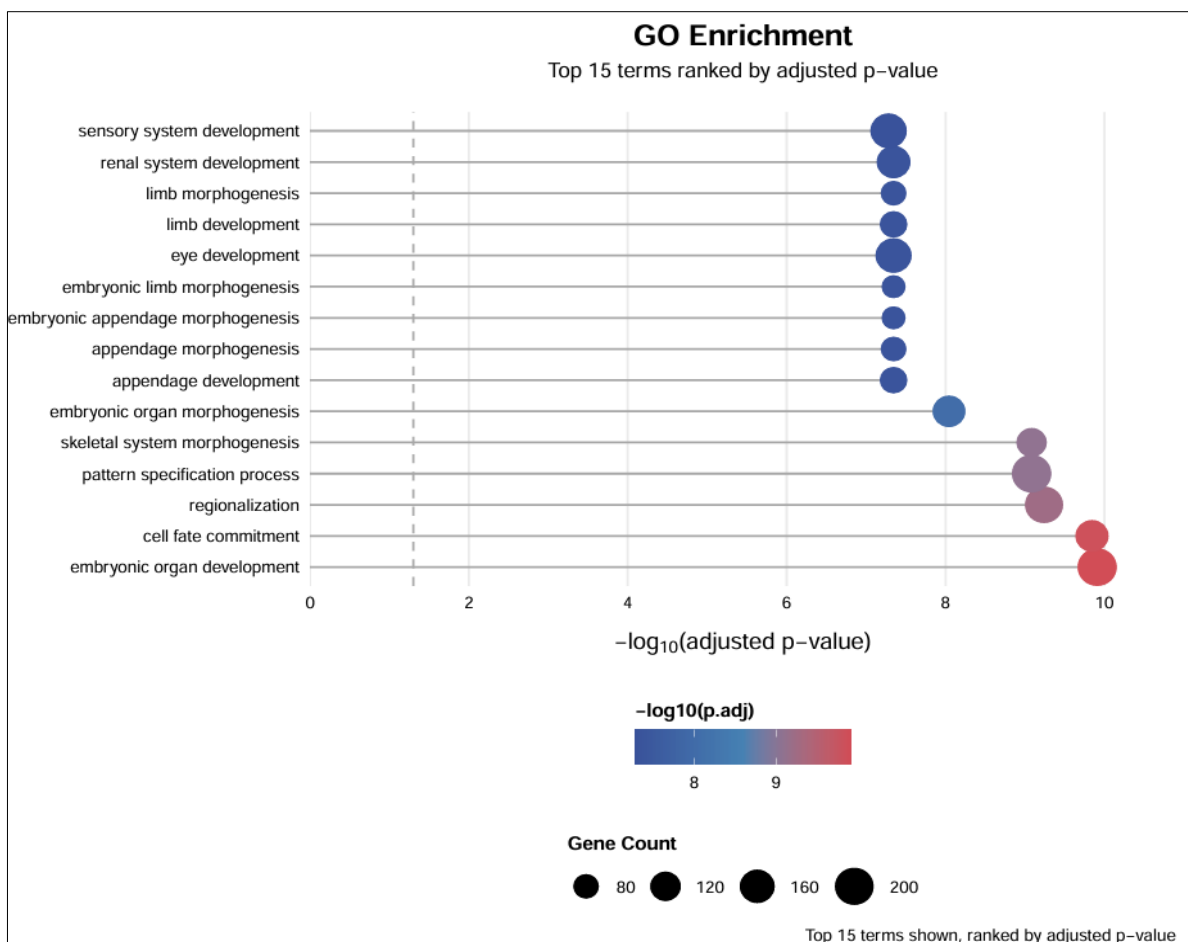
typu 14, RPSAP4 – pseudogen typu 4 dla rybosomalnego białka SA, SLC9C1 – białko SLC9C1, UTF1 – czynnik transkrypcyjny UTF1

DNAm – metylacja DNA, Lp. – liczba porządkowa, p – p value, poziom istotności statystycznej, q – q value, poziom istotności statystycznej po poprawce dla wielokrotnych porównań, TSS – miejsce startu transkrypcji

VIII.2.3. Analiza wzbogacenia funkcjonalnego oraz eksploratywna Projektu 2.

Dla znalezionych istotnych CpG różnicujących grupy chorych z GD oraz osób zdrowych przeprowadzono analizę wzbogacenia funkcjonalnego. Za referencję przyjęto bazy KEGG oraz GeneO. Topowe szlaki wzmocnienia przedstawiono w postaci wykresów (Ryciny 36.-37.), natomiast inne, wybrane i istotne spośród wszystkich określonych szlaków (n=56, KEGG; n=366, GeneO) zaprezentowano w formie tabel (Tabela 12-13.). Podobnie jak w Projekcie 1., wytypowano m.in. szlaki rozwoju embrionalnego, przekazywania komórkowego, nowotworów litych i hematologicznych, cytokin prozapalnych, a także rozwoju wzroku. Określono stopnie wzmocnienia znaczących statystycznie szlaków metabolicznych względem genów mapowanych na wytypowane wcześniej istotne DMRs. Określono wielkości zbiorów mapowanych genów przynależących do scharakteryzowanych szlaków.

Analizę wzbogacenia funkcjonalnego wykonano dla grupy dorosłych pacjentów z GD (AGD vs. HC), dla grupy chorych dzieci (PGD vs. pHC oraz PGD vs. AGD) nie uzyskano istotnych, wytypowanych szlaków.

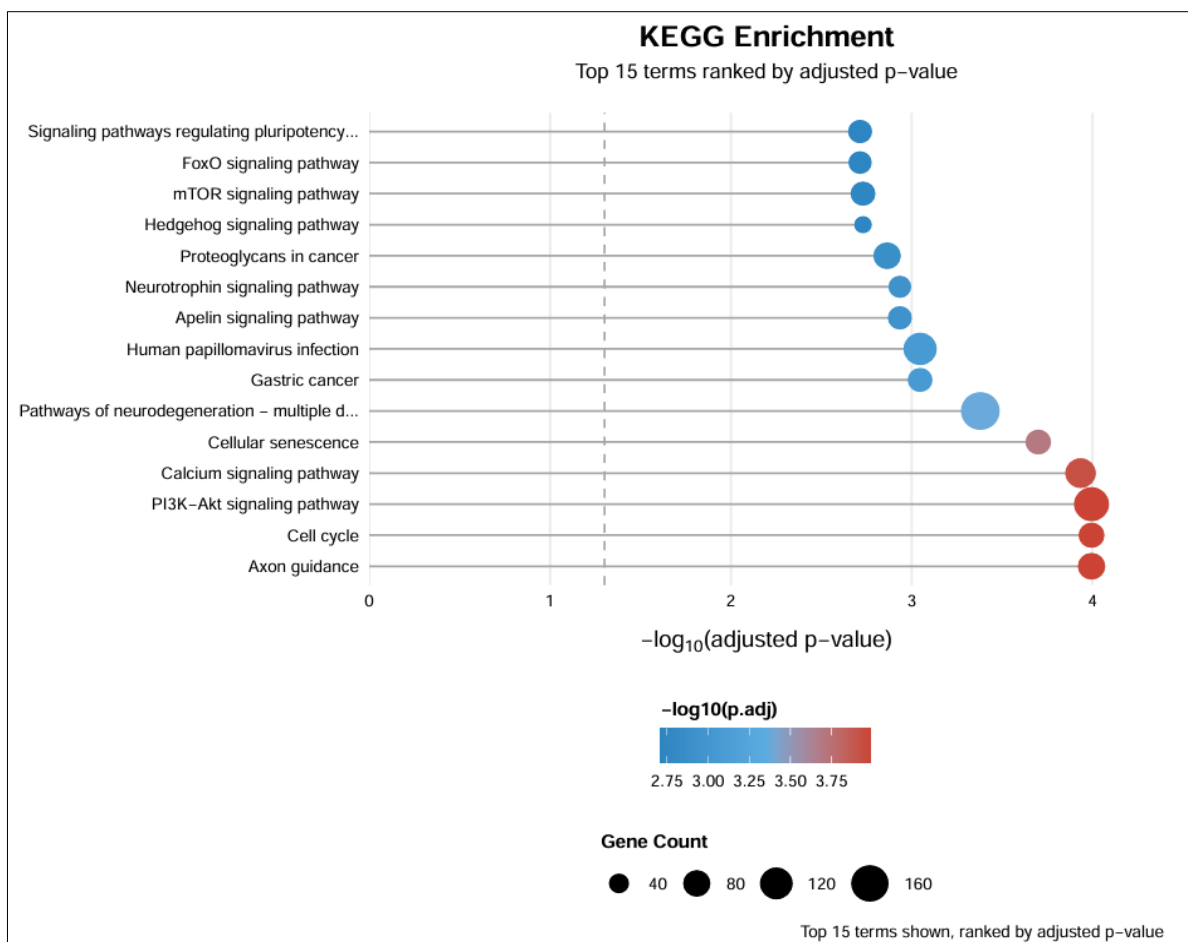


Rycina 36. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków metabolicznych dla genów mapowanych względem istotnych DMRs, linia przerywana stanowi granicę istotności. Wykres dotyczy porównania osób dorosłych z GD (AGD) oraz zdrowych dorosłych (HC). Baza ontologiczna Gene Ontology, GeneO, została oznaczona na rycinie jako „GO”). Na rycinie zestawiono nazwy wzbogaconych szlaków oraz stopnie wzmocnienia szlaków, względem $-\log_{10}$ o podstawie 10 ze skorygowanej wartości istotności statystycznej p , wraz ze skalowanym wysyceniem kolorystycznym (oś x). Liczbę genów w zbiorze dla wzmocnionego szlaku przedstawiono graficznie – liczbowo oraz przy pomocy skalowanej średnicy punktów (Gene Count).

Tabela 12. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG. (Baza GeneO).

Lp.	Wzbogacony szlak	p	q	Wielkość zbioru
1	Rozwój embrionalny narządów	1,94E-14	9,75E-11	206
2	Rozwój oka	8,37E-11	3,57E-08	172
3	Rozwój przydatków	8,69E-11	3,57E-08	95
4	Aksonogeneza	1,58E-10	4,95E-08	193
5	Rozwój narządu wzroku	2,20E-10	6,15E-08	172
6	Rozwój funkcjonalny oka (ang. camera-type)	5,72E-09	1,06E-06	149
7	Sygnalizacja Wnt	1,43E-07	1,56E-05	185
8	Morfogeneza oka	1,27E-05	5,50E-04	72
9	Wydzielanie hormonalne	9,13E-05	2,34E-03	120
10	Transport hormonów	1,24E-04	2,95E-03	123
11	Transport endosomalny	1,25E-04	2,95E-03	112
12	Regulacja adhezji komórkowej	2,20E-04	4,46E-03	88
13	Odpowiedź na hormony steroidowe	2,21E-04	4,46E-03	127
14	Odpowiedź komórkowa na GKS	2,49E-04	4,83E-03	32
15	Rozwój powieki	4,32E-04	6,87E-03	10
16	Organizacja złącz międzykomórkowych	4,34E-04	6,87E-03	84
17	Sygnalizacja komórkowa	4,95E-04	7,64E-03	78
18	Odpowiedź na TGF-beta	6,44E-04	9,29E-03	115
19	Regulacja adhezji komórkowej	3,33E-03	2,76E-02	170
20	Różnicowanie komórek soczewki	2,98E-03	2,58E-02	19
21	Sygnalizacja TNF	2,69E-03	2,40E-02	48
22	Sygnalizacja TGF-beta	2,37E-03	2,19E-02	91
23	Różnicowanie komórek neuroendokrynych	1,02E-03	1,25E-02	11
24	Przyleganie komórkowe do macierzy zewnątrzkomórkowej	8,47E-04	1,11E-02	92
25	Różnicowanie limfocytów Th	1,85E-02	8,68E-02	30
26	Aktywacja limfocytów T	1,88E-02	8,68E-02	31
27	Różnicowanie limfocytów Th17	2,95E-02	1,18E-01	15
28	Rekrutacja limfocytów T CD4+ i CD8+	3,45E-02	1,29E-01	13
29	Regulacja sygnalizacji receptora Fc	3,82E-02	1,34E-01	6
30	Synteza hormonów tarczycy	3,99E-02	1,36E-01	11

Objaśnienia skrótów: CD4 – antygen różnicowania komórkowego CD4, CD8 – antygen różnicowania komórkowego CD8, Fc – receptor Fc, GCS – glikokortykosteroidy, TGF-beta – transformujący czynnik wzrostu, Th – limfocyt pomocniczy, TNF – czynnik martwicy nowotworu, Wnt, – szlak sygnalizacyjny Wnt,



Rycina 37. Wykres o typie lolipop dla wzbogacenia funkcjonalnego szlaków metabolicznych dla genów mapowanych względem istotnych DMRs, linia przerywana stanowi granicę istotności. Dotyczy porównania osób dorosłych z GD (AGD) oraz zdrowych dorosłych (HC); baza ontologiczna Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG. Na rycinie zestawiono nazwy wzbogaconych szlaków oraz stopnie wzmocnienia szlaków, względem $-\log$ arytmu o podstawie 10 ze skorygowanej wartości istotności statystycznej p, wraz ze skalowanym wysyceniem kolorystycznym (oś x). Liczbę genów w zbiorze dla wzmocnionego szlaku przedstawiono graficznie – liczbowo oraz przy pomocy skalowanej średnicy punktów (Gene Count).

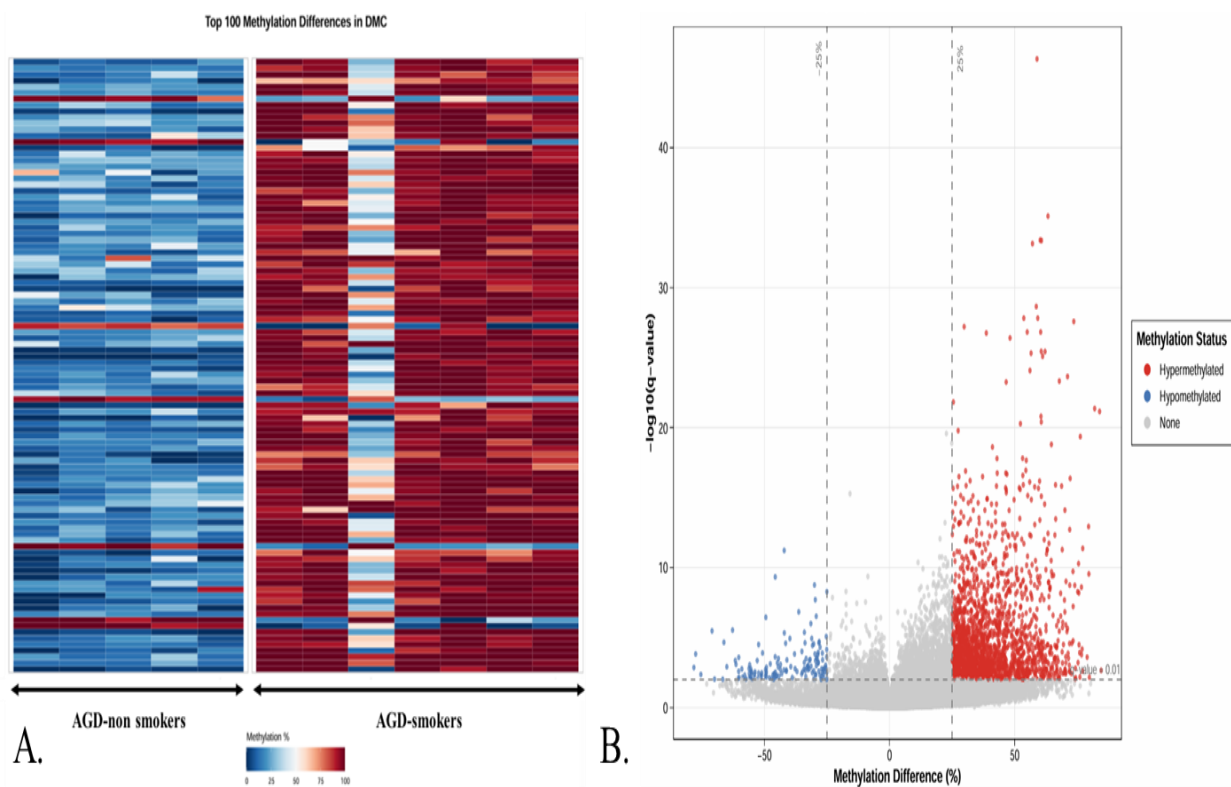
Tabela 13. Lista wybranych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego dla dinukleotydów CpG (Baza KEGG).

Lp.	Wzbogacony szlak	p	q	Wielkość zbioru
1	Sygnalizacja Hedgehog	6,63E-05	1,20E-03	29
2	Sygnalizacja mTOR	6,96E-05	1,20E-03	65
3	Sygnalizacja MAPK	1,17E-04	1,25E-03	110
4	Migracja przeznablonkowa leukocytów	1,18E-04	1,25E-03	50
5	Apoptoza	1,32E-04	1,25E-03	57
6	Sygnalizacja cAMP	1,51E-04	1,36E-03	86
7	Sygnalizacja aksonalna	3,71E-07	6,54E-05	81
8	Cykl komórkowy	7,56E-07	6,54E-05	71
9	Sygnalizacja PI3K-Akt	8,75E-07	6,54E-05	139
10	Sygnalizacja związana z jonem wapnia	1,34E-06	7,52E-05	103
11	Synteza, wydzielanie i działanie PTH	1,53E-03	7,46E-03	46
12	Sygnalizacja AMPK	1,85E-03	8,63E-03	48
13	Sygnalizacja TGF-beta	1,92E-03	8,69E-03	44
14	Sygnalizacja p53	2,30E-03	9,90E-03	32
15	Oporność endokrynną	2,42E-03	9,90E-03	40
16	Różnicowanie limfocytów Th1 i Th2	1,55E-02	3,50E-02	35
17	Sygnalizacja TNF	1,71E-02	3,83E-02	43
18	Oporność inhibitora kinazy tyrozynowej związanej z EGFR	1,40E-02	3,30E-02	31
19	WZW C	3,05E-03	1,20E-02	59

Objaśnienia skrótów: AMPK – kinaza aktywowana przez AMP, cAMP – cykliczny adenozymonogofosforan, EGFR – receptor nabłonkowego czynnika wzrostu, MAPK – kinazy aktywowane mitogenami, mTOR – kinaza mTOR, p53 – białko p53, PTH – parathormon, TGF-beta – transformujący czynnik wzrostu beta, Th1 – limfocyty pomocnicze Th1, Th2 – limfocyty pomocnicze Th2, TNF – czynnik martwicy nowotworu, WZW C – wirusowe zapalenie wątroby typu C

Rozkład próbek w analizie PCA dot. dorosłych i dzieci z GD (separacja 4/5 chorych z wieloletnim wywiadem nikotynizmu i wspólne klastrowanie pozostałych nieodstających próbek) oraz dotychczasowy stan wiedzy nt. palenia papierosów w GD poskutkowały analizą eksploracyjną poświęconą wpływowi nikotynizmu na DNAm w AGD. W analizie globalnego profilu DNAm w grupie wszystkich chorych z AGD (n=12, 7 palących vs. 5 niepalących) wykazano hipermetylację palących członków podgrupy AGD: 1,86 %.

W analizie różnicowej między grupami odnotowano 317732 odmiennie zmetylowanych cytozyn, z czego 2183 pozycji CpG było istotnych statystycznie, a 1284 zidentyfikowano w oparciu o HGNC. Na Rycinie 38A-B., w formie mapy cieplnej przedstawiono różnicę wzorców DNAm dla 100 topowych pozycji CpG (hipermetylacja chorych grupy AGD palących papierosy) oraz wszystkie istotne różnicujące DMCs w formie wykresu wulkanicznego. Do mapowanych względem znalezionych CpG regionów DNA, ważnych funkcjonalnie oraz w zestawieniu z wynikami wcześniejszych analiz, należały m.in.: *CD2*, *CD7*, *ATXN7*, *CDK2AP2P2* oraz mnogie loci *MICALL2*, *MIR*, *LINC*, *FANK1*, *MUC6*, *AVEN*, *BAGE2* oraz *NNAT*. Ponadto, odnotowano wzbogacenie funkcjonalne szlaku Notch (wg KEGG, ilość genów w zbiorze: 13, stopień wzmocnienia 1,59, q=0,023).



Rycina 38A-B. A. Wykresy heatmap, dla analizy różnicowej (top 100 CpG) podgrup chorych dorosłych z GD w zależności od palenia papierosów; grupą badaną byli chorzy palący („AGD-smokers”), członkowie grup zostali oznaczeni strzałkami (kolumny). Kolorem niebieskim oznaczono wzorce DNAm **hipometylowane**, a czerwonym **hipermetylowane** (rzędy). Intensywność koloru danego wzorca odpowiada stopniowi metylacji DNA zgodnie z uwzględnioną skalą. B. Wykres wulkaniczny dla istotnych dinukleotydów CpG w analizie chorych dorosłych z GD w zależności od palenia papierosów, grupą badaną byli chorzy palący, na osi x przedstawiono różnicę stopnia metylacji DNA, a na osi y wartość istotności statystycznej w formie $-\log_{10}(q\text{-value})$. Kolorem czerwonym oznaczono istotne CpG **hipermetylowane**, a kolorem niebieskim **hipometylowane**. Dinukleotydy CpG o najwyższej pozycji rankingowej znajdują się najwyżej.

IX. Dyskusja

GD jest chorobą wieloczynnikową z wiodącą rolą genetycznej predyspozycji do zachorowania. Jednakże pełne wyjaśnienie jej etiologii, w tym dotyczące polimorfizmów genetycznych, nie zostało do tej pory osiągnięte [13-16]. Z uwagi na postulowane mechanizmy w GD i GO, łączące ze sobą czynniki genetyczne, osobnicze i środowiskowe, wydawało się zasadne poszukiwanie epigenetycznych uwarunkowań choroby [102-104, 121]. Ich charakteryzowanie byłoby istotne, biorąc również pod uwagę dotychczasowe doniesienia uwzględniające nieoptymalne kliniczne i nieokreślone genetyczne znamiona predykcyjne przebiegu oraz powodzenia terapii GD i GO [13].

W bieżącej rozprawie doktorskiej podjęto więc próbę zbadania i omówienia następujących zagadnień z obszaru epigenetyki i obrazu klinicznego GD i GO: całogenomowych oraz szczegółowych (pojedyncze CpG) wzorców DNAm w GD i GO oraz ich zmian w przebiegu leczenia GO przy pomocy ivGCS. W projektach tworzących rozprawę dokorską scharakteryzowano zarówno i) pacjentów z często kilkuletnim przebiegiem GD i GO, pozostających w stanie wyrównania czynności tarczycy, w kontekście przebytego już leczenia przeciwtarczycowego (ATD, RAI, operacji usunięcia tarczycy) oraz podejmowania terapii pulsami ivGCS, jak również ii) chorych ze świeżym rozpoznaniem GD (w tym podgrupy dzieci), w fazie nadczynności tarczycy i bez wcześniej podejmowanego leczenia przeciwtarczycowego.

Przedstawiono związek całogenomowej hipometylacji DNAm z GO i GD, zarówno na poziomie całogenomowym jak i szczegółowym, a także znaczenie funkcjonalne (wzbogacenie szlaków metabolicznych) zaburzeń DNAm. Wytypowano sygnatury metylacyjne w postaci CpG mapowanych na wiele *loci* związanych m.in. z układem odpornościowym i metabolizmem komórkowym, potwierdzając przy tym doniesienia literaturowe i podkreślając przy tym również rolę nikotynizmu w obrazie zaburzeń DNAm oraz prawdopodobnej patogenezie GD [108, 111-113, 122]. Po raz pierwszy wykazano również różnice w stopniu DNAm u dzieci z GD, w skali całogenomowej i szczegółowej, a także przedstawiono różnice wzorców DNAm w GD w zależności od wieku.

IX.1. Grupy badane

W raporcie PREGO III, obejmującym łącznie 16 ośrodków klinicznych EUGOGO, przedstawiono kompleksową charakterystykę nowo zdiagnozowanych pacjentów z GO (n=437) oraz porównano ją z chorymi objętymi wcześniejszym raportem (PREGO II w 2012 r.) [150]. Należy przy tym podkreślić, że naszą grupę chorych Projektu 1. w całości stanowili pacjenci z umiarkowaną do ciężkiej, aktywną GO, podczas gdy orbitopatia w tej formie stanowiła odpowiednio 39,9% i 24,5% w raportach PREGO III i PREGO II [150]. W pracy dot. PREGO III pokazano średni wiek zachorowania na GO w 2019 r. – $50,5 \pm 13$ lat (w porównaniu z $47,7 \pm 14$ lat w 2012 r., $p=0.007$), będącym zbliżonym względem chorych objętych Projektem 1. bieżącej rozprawy (mediana wieku GO 49,5 lat, IQR: 41,5-65 lat; Tabela 3.). Ponadto, na przestrzeni 2012-2019 r. zaobserwowano zdecydowaną przewagę płci żeńskiej wśród chorych: 77,3%-79,2%, czemu odpowiadała charakterystyka naszej kohorty (79,19% kobiet). W badaniu PREGO III wskazano ponadto, że względem 2012 r. istotnie więcej chorych przyjmowało ATD przed zgłoszeniem się do centrum EUGOGO (80,2% vs. 45,%; $p<0.001$). Dla porównania, wszyscy chorzy w badanej przez nas grupie z GO przyjmowali ATD przed rozpoznaniem i leczeniem ivGCS. Według wyników PREGO III nie zmieniła się natomiast istotnie częstość poprzedzającego leczenia RAI (15,1% vs. 17,9%) oraz tyreidektomii (24,1% vs. 22,7%), występujących w naszej grupie odpowiednio w 20,83% i 29,17%. Dodatkowo wywiady nikotynizmu (aktualnego czynnego/biernego oraz eksnikotynizmu) wykazało 70,83% chorych Projektu 1., więcej niż zaprezentowano w ramach analizy PREGO w 2019 r. (61,4%) i pozostając zbliżone względem danych z 2012 r. (67,9%). Po terapii w postaci 12 infuzji z ivGCS, 14 z 24 chorych (58,33%) uzyskało odpowiedź na leczenie według przyjętych kryteriów [67,79]. W literaturze, odpowiedź na leczenie pulsami ivGCS w aktywnej, umiarkowanej do ciężkiej GO waha się między 50-80% , zależnie od cytowanej pracy [67, 79-81].

Charakterystyka ogólna dorosłych pacjentów objętych Projektem 2. również pozostawała w zbieżności z prezentowaną w literaturze. Dla chorych grupy AGD obserwowano typowy dla GD podział względem płci (75% kobiet) i przedział wiekowy zachorowania, tj. 43,5 lat (IQR: 35,5-53) – w porównaniu ze średnim wiekiem 30-60 lat wg literatury [1-3]. Częstość nikotynizmu w grupie AGD wynosiła 58,33%. Przedstawiono nieliczną kohortę dzieci z GD (n=6) z medianą wieku 15 lat (IQR: 12-17). W literaturze, zgodnie opisywano występowanie

GD u dzieci <10 r.ż jako jedynie 21,4 %, zwracała przy tym natomiast uwagę dysproporcja płci męskiej w grupie PGD Projektu 2. – 50%, w porównaniu z 23,43% w pracy Simon i wsp. [151].

IX.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem orbitopatii tarczycowej oraz skutecznością leczenia dożylnymi glikokortykosteroidami

IX.2.1. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem GO

W analizach globalnej metylacji DNA różniące grupy dorosłych zdrowych oraz z orbitopatią tarczycową, u chorych z GO stwierdzono wyraźnie dominującą hipometylację zarówno w skali całogenomowej, tj. wzorców DNAm dla grup (heat-mapa, Rycina 8.), jak i wszystkich chromosomów (Rycina 7.) oraz średniej wartości bezwzględnej różnicy DNAm (-13,14%), potwierdzając tym samym wcześniejsze opisane asocjacje między DNAm i chorobami autoimmunizacyjnymi, w tym AITD [102-104]. Co ważne z funkcjonalnego oraz klinicznego punktu widzenia, w analizie szczegółowej zdecydowaną większość odnotowanych DMRs stanowiły CpG miejsc promotorowych (Rycina 10.). Również analiza głównych komponentów składowych dla Projektu 1. wyodrębniła wyraźną separację większości pacjentów z GO od osób zdrowych (Rycina 9.), co potwierdziło tym samym wyniki pracy chińskich autorów [122].

Xin i wsp. przeprowadzili badanie na mniej licznej grupie uczestników (n=6 GO i n=6 kontroli), w oparciu o identyczną metodę analizy DNAm (RRBS), stwierdzając w pracy 1583 DMRs, z czego 841 było rozpoznanych wg nomenklatury HGNC [122]. Autorzy za miarę różnicy stopnia metylacji w analizach przyjęli tzw. fold-change: zmianę krotności wartości stopnia metylacji między grupami, w oparciu o logarytm o podstawie 2. Pełna lista 841 DMRs dostępna jest w materiałach dodatkowych publikacji: Supplementary Table 1 [122]. Dodatkowo, wprowadzono definicję regionów o różnicy <0,5 jako hipometylowane, a te ze wskaźnikiem >2 jako hipermetyleowane. Na tej podstawie wyróżniono CpG mapowane na 148 *loci* uwzględnionych w analizie DNAm i parametrów klinicznych [122]. Różnica stopnia DNAm w Projektach rozprawy musiała wynosić $\geq 25\%$ i spośród regionów spełniających to kryterium wyznaczono istotne CpG. W szczegółowej analizie CpG grupy badanej (GO), odnotowano 2894 istotnych DMRs (głównie hipometylowanych – 99,17%, Rycina 11.), a do bazy HGNC przypisano 2254 z nich. Co interesujące, w pracach poświęconych chińskiej kohorcie zaprezentowano spójną z naszymi wynikami charakterystykę szczegółową zaburzeń DNAm: m.in. *DRD4*, *COL18A1*, *FOXC1* (Tabela 14.) [122-123]. Wreszcie, poza wspólnymi z

cytowaną pracą regionami genowymi mapowanymi na istotne CpG, wykazaliśmy inne spójne lub kodujące zbliżone funkcjonalnie białka (w tym uczestniczące w mechanizmach epigenetycznych, jak białka z domeną palca cynkowego), m.in.: *GLI2*, *CDK1*, *ZCCHC9*, *ZNF844*, *S100A10*. Zestawienie przykładów takich *loci* uwzględniono w Tabeli 14.

Tabela 14. Porównanie ilościowe i jakościowe dla CpG anotowanych na *loci* w pracy Xin i wsp. (wybrane przykłady regionów) oraz w odpowiadającej kohorcie chorych z orbitopatią tarczycową przed podjęciem leczenia pulsami metyloprednizolonu (P1 protokołu Projektu 1.), obejmującego analizę DNAm u chorych z orbitopatią tarczycową (GO) i u zdrowych osób (HC)

	Projekt 1. (GO vs. HC)	Xin i wsp. [122]
GO/HC, n	24/7	6/6
DMRs istotne-HGNC/DMRs istotne	2254/2894	841/1583
DMRs hipometylowane, n	2870	530
DMRs zgodne (przykłady)	<i>CTBP2, DRD4, COL18A1, DGKH, DLX1, DMRTA2, FOXC1, FOXD1, GLI2, HAND1, HES2, HIVEP3, IRX3, LRRC31, LYPD3, MAD1L1, METTL10, MSX1, MUC5AC, MYOD1, NDUFA4L2, OSR1, OTP, PAX2, PAX3, PAX5, PRDM16, PTPRU, RCOR2, SLC35D3, SLC35E2B, SLF13, SMOC2, TFR2, TGFB1, ZNF304</i>	<i>CTBP2, DRD4, COL18A1, DGKH, DLX1, DMRTA2, FOXC1, FOXD1, GLI2, HAND1, HES2, HIVEP3, IRX3, LRRC31, LYPD3, MAD1L1, METTL10, MSX1, MUC5AC, MYOD1, NDUFA4L2, OSR1, OTP, PAX2, PAX3, PAX5, PRDM16, PTPRU, RCOR2, SLC35D3, SLC35E2B, SLF13, SMOC2, TFR2, TGFB1, ZNF304</i>
DMRs zbliżone biologicznie (przykłady)	<i>ABHD3, C2orf57, CACNG4, CLDN5, HMX1, HOXD8, MDGA1, PRDM13, SIX2, SNAI3, ZNF844, ZIC5, ZC3H4, ZCCHC9, ZFP42</i>	<i>ABHD5, C2orf49, CACNG8, CLDN6, HMX2, HOXD4, MDGA2, PRDM14, SIX1, SNAIL, ZNF843, ZIC4, ZC3H3, ZCCHC6, ZFP37</i>
DMRs hipermetylowane, n	24	311
DMRs zgodne (przykłady)	-	-
DMRs zbliżone biologicznie (przykłady)	<i>RNU6-328P</i>	<i>RNU6-2</i>

Objaśnienia skrótów: ABHD3 – fosfolipaza ABHD3, ABHD5 – fosfolipaza ABHD5, C2orf49 – białko C2orf49, C2orf57 – białko C2orf57, CACNG4 – podjednostka gamma 4 kanału wapniowego bramkowanego napięciem, CACNG8 – podjednostka gamma 8 kanału wapniowego bramkowanego napięciem, CLDN5 – kładyna 5, CLDN6 – kładyna 6, COL18A1 – kolagen 18A1, CTBP2 – białko wiążące fragment C-końcowy typu 2, DGKH – kinaza diacyloglicerolu, DLX1 – białko DLX1, DMR – odmiennie zmetylowany region, DMRTA2 – białko DMRTA2, DRD4 – receptor dopaminowy D4, FOXC1 – czynnik transkrypcyjny FOXC1, FOXD1 – czynnik transkrypcyjny FOXD1, GLI2 – białko z domeną palca cynkowego z rodziny GLI2, HAND1 – białko HAND1, HES2 – czynnik transkrypcyjny HES2, HIVEP3 – czynnik transkrypcyjny wirusa HIVEP3, HMX1 – czynnik transkrypcyjny HMX1, HMX2 – czynnik transkrypcyjny HMX2, HOXD4 – czynnik transkrypcyjny HOXD4, HOXD8 – czynnik transkrypcyjny HOXD8, IRX3 – białko IRX3, LRRC31 – białko bogate w powtórzenia leucyny typu 31, LYPD3 – białko zawierające domenę LY6/PLAUR typu 3, MAD1L1 – białko punktu kontrolnego składania wrzeciona mitotycznego MAD1, MDGA1 – białko MDGA1, MDGA2 – białko MDGA2, METTL10 – metylotransferaza METTL10, MSX1 – białko MSX1, MUC5AC – mucyna 5AC, MYOD1 – czynnik transkrypcyjny MYOD, NDUFA4L2 – białko NDUFA4L2, OSR1 – czynnik transkrypcyjny OSR1, OTP – czynnik transkrypcyjny OTP, PAX2 – białko PAX2, PAX3 – białko PAX3, PAX5 – białko PAX5, PRDM13 – białko z domeną PR typu 13, PRDM14 – białko z domeną PR typu 14, PRDM16 – białko z domeną PR typu 16, PTPRU – receptor fosfatazy tyrozynowej typu U, RCOR2 – korepresor REST typu 2, RNU6-2 – snRNA RNU6-2, RNU6-328P – snRNA RNU6-328P, SIX1 – czynnik transkrypcyjny SIX1, SIX2 – czynnik transkrypcyjny SIX2, SLC35D3 – białko SLC35E2B, SLC35E2B – białko SLC35E2B, SLF13 – białko SLF13, SMOC2 – białko SMOC2, SNAI1 – białko SNAI1, SNAI3 – białko SNAI3, TFR2 – białko związane z telomerami TFR2, TGFB1 – transformujący czynnik wzrostu beta 1, ZC3H3 – białko z domeną palca cynkowego ZC3H3, ZC3H4 – białko z domeną palca cynkowego ZC3H4, ZCCHC6 – białko z domeną palca cynkowego ZCCHC6, ZCCHC9 – białko z domeną palca cynkowego ZCCHC9, ZFP37 – białko z domeną palca cynkowego ZFP37, ZFP42 – białko z domeną palca cynkowego ZFP42, ZIC4 – białko z domeną palca cynkowego ZIC4, ZIC5 – białko z domeną palca cynkowego ZIC5, ZNF304 – białko z domeną palca cynkowego 304, ZNF843 – białko z domeną palca cynkowego 843, ZNF844 – białko z domeną palca cynkowego 844

Patogeneza GO jest układem złożonych procesów, w których zaangażowane są zróżnicowane subpopulacje limfocytów T (głównie Th1, Th2 oraz Th17), a także fibroblasty oczodołu [152, 153]. Wydaje się, że wobec interakcji komórkowych przy uczestnictwie IGFI-R oraz TSH-R, cząsteczek immunomodulujących (CD20, CD28, CD40, CD154) oraz cytokin (mi.n. IL-2, IL-6, IL-17), skutkujących migracją i naciekiem komórkowym oraz adipogenezą w obrębie oczodołu, prowadzi to do rozwoju stanu zapalnego, różnicowania fibroblastów, reorganizacji macierzy łącznotkankowej i wreszcie, powstania obrzęku tkanek oraz orbitopatii [154]. W Projekcie 1. wykazaliśmy DMRs w regionach czynników transkrypcyjnych, m.in. *FOXP1* (Tabela 4a-d.) oraz innych z grupy *FOX*. Warianty *FOXP3* są znanymi genetycznymi czynnikami ryzyka GO [16, 18]. Z kolei niejasna jest odnotowana hipometylacja w obrębie dwóch CpG (wewnątrz CGI) *FOXO3*, czynnika transkrypcyjnego przyjmowanego dotychczas za represor transdukcji sygnałów IGF1R oraz TSHR, powodujących rozwój i adipogenezę komórek oczodołu w patogenezie GO [155]. Warto zaznaczyć, że hipometylowane CpG mapowane na *FOXO3* znajdowały się powyżej TSS i poza regionem promotorowym.

Poza regionami komentowanymi dotychczas w pracach innych autorów (Tabele 1-2. [121-124, 127]), w Projekcie 1. odnotowano również inne, istotne DMRs uczestniczące w złożonej patogenezie GO. Zaliczyć tu możemy hipometylację (-69,29%) CpG regionu *LOXL3* – genu oksydazy lizylowej typu 3 (ang. lysyl oxidase-like 3), dla której zaproponowano rolę w patogenezie i możliwego punktu uchwytu terapeutycznego GO (Tabela 4a-d.) [156]. Inhibicja produktu białkowego, LOXL3, zapewniła bowiem ograniczenie stanu zapalnego, włóknienia oraz różnicowania fibroblastów oczodołów [156]. Kolejne istotne i hipometylowane DMRs były mapowane na właściwe *loci* białek służących za cel w terapii immunologicznej GO. Były to regiony punktów uchwytu dla przeciwciał monoklonalnych – w tym tocilizumabu (*IL-6R*) oraz dla teprotumumabu (*IGF1R*) (Tabela 4a-d.) [67, 157-158]. W związku z wielotorowym działaniem IL-6, m.in. poprzez łączenie ze swoim rozpuszczalnym receptorem (ang. soluble interleukin-6-receptor, sIL-6R) oraz receptorem błonowym, a także interakcję kompleksów międzykomórkowych, skutkując głównie aktywnością prozapalną – sugerowane w patogenezie GO role IL-6 wydają się być złożone [159]. Wśród nich wymienia się promocję rozwoju stanu zapalnego, dojrzewania i różnicowania swoistych limfocytów, aktywację fibroblastów oraz produkcji białek macierzy zewnątrzkomórkowej [158-159]. Znaczenie terapii z wykorzystaniem tocilizumabu było widoczne u chorych z GO, w tym nieodpowiadających na leczenie ivGCS, prowadząc do redukcji aktywności choroby (w skali CAS), podwójnego widzenia czy wytrzeszczu [160-161]. Obecnie prowadzone jest również randomizowane badanie III fazy poświęcone innemu inhibitorowi IL-6R – satralizumabowi oraz chorym z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO (Satra-GO2; <https://clinicaltrials.gov/study/NCT06106828>) [158]. Z kolei w badaniach poświęconych teprotumumabowi, hamującemu kaskadę zależną od IGF-1R-TSH-R, zauważono zmniejszenie wytrzeszczu, aktywności CAS oraz poprawę jakości życia chorych, z ogólną odpowiedzią na leczenie rzędu 83% vs. 10% w grupie placebo [67, 162-163].

Z klinicznego punktu widzenia warto osobno wymienić kolejny istotny CpG Projektu 1., mapowany na region *CD55*. Co ciekawe, w przypadku antygeny dojrzewania *CD55* postuluje się jego rolę w potencjalizacji odpowiedzi na terapię rytuksymabem – kolejnym przeciwciałem monoklonalnym (anty-*CD20*) stosowanym w leczeniu drugiego rzutu aktywnej, umiarkowanej do ciężkiej GO, mającym od dawna szerokie zastosowanie również w terapii chorób autoimmunizacyjnych czy nowotworów limfoproliferacyjnych [67, 162, 164]. Na poziomie hodowli komórkowej linii opornego chłoniaka, wykazano bowiem największą skuteczność dla bi-specyficznego przeciwciała antyCD-20-CD55 – w porównaniu z leczeniem celowanym

przeciwko tym cząsteczkom powierzchniowym pojedynczo [164]. Autorzy jednej z prac pokazali ponadto udział cząsteczki CD55 w gojeniu ran (blokada przeciwciałami anti-CD55) i procesach przebudowy łącznotkankowej [165]. W Projekcie 1. odnotowano również mnogie różnice w DNAm genów białek uczestniczących w odpowiedzi immunologicznej oraz komunikacji z macierzą zewnątrzkomórkową na różnym poziomie, w tym: *CD274*, *CD34*, *CD200* oraz *CD82*. W kontekście antygenów CD274 i CD82, dotychczasowe doniesienia obejmowały rolę tych cząsteczek powierzchniowych w komunikacji międzykomórkowej niszy komórek guzów litych [166-167]. W przypadku CD200 wykazano z kolei udział w immunomodulacji, a rola glikoproteiny CD34 wyrażała się przede wszystkim w metabolizmie fibroblastów, w tym możliwie również w progresji GO i parakrynej produkcji IL-6 [168-171].

W pracy włoskich autorów, obejmującej fibroblasty oczodołu, wykazano m.in. zaburzenia DNAm w zakresie genów czynników wzrostu i ich receptorów (jak IGF-1R, FGF-R, Tabela 2.) [127]. W pracy badaczy holenderskich przedstawiono hipermetylację *GNAS*, a także hipometylację w obrębie genów związanych z adipogenezą oraz autoimmunizacją (grupa z nieaktywną GO) [126]. Było to kolejne badanie oparte o analizę DNAm hodowli wyizolowanych fibroblastów oczodołów (GO n=8, zdrowe kontrole n=5), a nie komórek krwi obwodowej. W naszej grupie chorych z GO, CpG w regionie *GNAS* znajdował się wewnątrz regionu promotorowego i był hipometylowany, dowodząc tkankowo-zróżnicowanych wzorców DNAm. Interesującym był fakt, że chorzy z aktywną GO wykazali z kolei hipermetylację DNA regionów związanych ze stanem zapalnym oraz hipometylację *AIRE* oraz *HLA-A* [126]. W naszym projekcie poświęconym świeżo zdiagnozowanym GD również odnotowano istotną hipometylację CpG powyżej TSS regionu *AIRE*, będącego genem ważnego białka regulatorowego tolerancji immunologicznej.. W pracy Virakul i wsp., dla całej grupy GO odnotowano także hipermetylację *SLC39A8* względem zdrowych kontroli [126]. Zaburzenia DNAm w regionach z tej rodziny białek odnotowana w naszej pracy, została już omówiona powyżej. Autorzy zacytowanej pracy zwrócili uwagę na zwiększoną ekspresję białek związanych z zapaleniem i macierzą zewnątrzkomórkową, w zależności od statusu aktywności GO, a także niespójność w istotnych DMRs w skali członków grupy (Tabela 2.) [126].

Spośród pozostałych DMRs wymagających komentarza, odnotowaliśmy też mnogie *loci*, których transkrypty uczestniczą w modyfikacjach epigenetycznych, potranslacyjnych syntezy białek oraz metabolizmie i transporcie komórkowym: długich niekodujących RNA, LINC (ang. long intergenic non-coding RNA, n=29), microRNA, MIR (n=42), kinaz aktywowanych

mitogenami, MAPK (ang. mitogen-activated protein kinases, n=8), białek otwartych ramek odczytu chromosomów, Corf (ang. chromosome open reading frame, n=60), białek z motywem palca cynkowego, ZNF (ang. zinc finger protein, n=44), białek kolagenu (COL) oraz rodziny SLC (ang. solute carrier family member, n=31) [172]. Uchwycono także hipometylację w CpG mapowanym na metylotransferazę DNA – DNMT3B. W pracy poświęconej kohorcie japońskiej wykazano polimorfizmy funkcjonalne tego genu, jak również odmienną DNAm u chorych z GD i zależną od tych zmiennych odpowiedź na leczenie w AITD [119]. Czynniki transkrypcyjne KLF9 (ang. Krüppel-like transcription factor), w którego *locus* odnotowano istotny CpG zarówno w naszej grupie GO jak i GD (vs. HC), jest związany z niedokrwinną neuropatią nerwu wzrokowego [173]. Co istotne, również wiele innych DMRs omówionych w doniesieniach literaturowych dotyczących zaburzeń DNAm w GD (Tabela 1.) było istotnych w naszej kohorcie GO (Tabela 4a-d.) [109, 118].

Wreszcie, w Projekcie 1. odnotowano wzbogacenie wielu szlaków metabolicznych (Tabele 6-7., Ryciny 12-13.). Dotyczyły zarówno kluczowych dróg związanych z komunikacją i cyklem komórkowym (m.in. sygnalizacją PI3K-Akt, MAPK, mTOR, cAMP, związaną z jonami wapnia i Wnt, połączeniami międzykomórkowymi przylegającymi, jak i tych związanych z chorobami autoimmunizacyjnymi (migracja przeznabłonkowa limfocytów, sygnalizacja TNF, sygnalizacja receptora TCR i różnicowanie limfocytów, w tym Th17), nowotworowymi (rak prostaty i żołądka) oraz, co istotne, procesami związanymi z GO – rozwojem oka i powieki, odpowiedzią komórki na GCS oraz gruczołem tarczowym (rak tarczycy). W kwestii rozwoju narządu wzroku, w innej pracy chińskich autorów przedstawiono związek niektórych DMRs z wolumetrią oczodołu u chorych z GO [174]. Co ciekawe, uchwycono również wzbogacenie szlaków metabolicznych związanych z infekcjami, jak np. jersinioza czy WZW C, łączonymi za środowiskowymi czynnikami etiopatogenezy GD (Rycina 1., Tabele 6-7.) [12, 40]. Obrazuje to złożony i potencjalnie pośredni wpływ odmiennego stopnia DNAm na liczne procesy komórkowe, a także możliwie patogenezę GD oraz GO. Xin i wsp. scharakteryzowali wzorce DNAm chorych z GO, przedstawiając najpierw DMRs różniące obie grupy, a następnie skupiając się w pracach na analizie funkcjonalnej [122-123]. W przeprowadzonej analizie wzbogacenia uchwycono różnorodne procesy (wg GenoO) mapowane na istotne CpG, wśród nich spójne z naszymi wynikami, m.in. dla szlaków metabolizmu i transportu komórkowego czy połączeń międzykomórkowych (pełna lista 84 szlaków GeneO dostępna jest w materiałach dodatkowych publikacji [122]: Supplementary Table 2) [121-123].

IX.2.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a skutecznością leczenia orbitopatii tarczycowej dożylnymi glikokortykosteroidami

W analizie PCA dotyczącej chorych z GO i odpowiedzią na leczenie (R) lub jej brakiem (NR), zaobserwowano chaotyczne wzorce dwuwymiarowego układu klastrów próbek obu grup, zarówno przed jak i po zakończeniu leczenia (Rycina 19.). Nie znaleziono istotnych sygnatur metylacyjnych różnicujących obie grupy, nie wyznaczono więc również pozycji predykcyjnych powodzenia leczenia. W eksploratywnej analizie obejmującej zmiany DNAm u chorych z osobna, wykazano liczne CpG ulegające zmianie DNAm, dla każdego chorego z osobna (Tabela 5.). Po uwzględnieniu, jako dodatkowych czynników, nikotynizmu oraz poprzedzających ujawnienie GO: RAI i tyreidektomii (punkt P1 protokołu Projektu 1.), a także po zastosowaniu terapii ORTH (w punkcie P2), nie otrzymano znamiennych różnic w obu grupach na poziomie globalnym i specyficznym dla pojedynczego CpG. Jednocześnie, zarówno na poziomie całogenomowym jak i szczegółowym, odnotowano związek między DNAm a zastosowanym leczeniem GO większą kumulacyjną dawką ivGCS (7,5 g ivMP; Rycina 20A-D. Wyniki tych subanaliz są szczególnie istotne w kontekście praktycznym i klinicznym, biorąc pod uwagę silny, znany związek nikotynizmu z zachorowaniem i gorszym przebiegiem zarówno GD jak i GO oraz rekomendowanym w wytycznych zaprzestaniem palenia tytoniu jako podstawowej nefarmakologicznej formy leczenia tych schorzeń [67]. Możliwe, że obserwowany efekt stosowania ivGCS na obraz DNAm w GO jest wynikiem wieloczynnikowego procesu obejmującego zarówno: i) wcześniejsze leczenie jak i ii) aktualny status kliniczny i wreszcie iii) aktualne leczenie, w tym dawkę ivGCS oraz towarzyszące leczenie AITD/GO (jak ciągłe stosowanie ATD – o udowodnionym i omówionym już wpływie na DNAm w GD, czy np. ORTH) oraz iv) aktywny/bierny nikotynizm; zastosowanie pojedynczej stratyfikacji może więc nie oddawać znamienności znalezionych różnic w skali grupy (R vs. NR) lub dla chorych z osobna. Otrzymane wyniki mogą więc sugerować podejście w przyszłych badaniach poświęconych DNAm u pacjentów z GO poddawanych leczeniu ivGCS, gdzie w celu zbadania związku metylacji z odpowiedzią na leczenie zasadne byłoby włączenie chorych z orbitopatią aktywną, umiarkowaną do ciężkiej, jednak bez poprzedzającego leczenia RAI/zabiegowego, a także nieuwzględnianie pacjentów stosujących ORTH. Dodatkowo, znaczenie dla uzyskanych wyników może mieć także populacja leukocytów poddawana analizie DNAm, co zostało omówione szerzej w dalszej sekcji dyskusji – ograniczeń projektów.

IX.3. Ocena całogenomowej metylacji DNA komórek krwi obwodowej u dorosłych i dzieci ze świeżym rozpoznaniem choroby Gravesa i Basedowa (Projekt 2.)

IX.3.1. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a rozwojem choroby Gravesa i Basedowa

W głównej analizie Projektu 2. oceniono różnice w zakresie DNAm między nieleczonymi przeciwtarczycowo osobami dorosłymi z GD (grupa AGD) i osobami zdrowymi (HC), stwierdzając hipometylację w grupie chorych.

Jeśli chodzi o dystrybucję chromosomalną i prezentację wzorców globalnych dla analizowanych grup – uwidoczniło wyraźną globalną hipometylację dla każdego z chromosomów autosomalnych oraz grupy AGD (Ryciny 21-22.). W pracy Guo i wsp. także obserwowano pierwotnie hipometylację (technika kolorymetrycznej immunoprecypitacji MEDIP, ang. Methylated DNA Immuno-Precipitation) chorych ze świeżym rozpoznaniem GD i następnie wzrost profilu globalnej DNAm po trzymiesięcznym leczeniu ATD i RAI [117]. W wynikach naszej pracy zaobserwowano ponadto wyraźne grupowanie próbek AGD i kontroli w ramach analizy PCA (Rycina 23.). Dwubiegunowy charakter klastrowania próbek grupy badanej można tłumaczyć uwikłaniem kolejnego czynnika – nikotynizmu, dolny biegun stanowi bowiem zgrupowane chorych palących wiele lat, a górny osób niepalących i chorej palącej 3 lata.

Większość znalezionych CpG mapowana była na regiony promotorowe (Rycina 24.). Łącznie zidentyfikowano ponad 53000 DMRs, z czego aż 10700 (20,18%) stanowiły istotne pozycje, a wśród nich 99,58% CpG było hipometylowane (Tabela 9a-c., Rycina 25.). Cai i wsp. wykorzystując technikę mikromacierzy, również zaprezentowali analizę DNAm u GD chorych bez poprzedzającego leczenia przeciwtarczycowego [117]. Wykazali globalną hipometylację porównując chorych z GD i kontrole, a także po stratyfikacji względem płci (istotne różnice dla grupy kobiet) oraz zaprezentowali 133 DMRs hipometylowanych (w tym 70,68% regionów promotorowych) i 132 hipermetylowanych (w tym 51,52% regionów promotorowych) [108]. Wśród istotnych regionów wyróżniono m.in. *loci* białek zaangażowanych w procesy przylegania komórkowego, immunologiczne, a także choroby autoimmunizacyjne, w tym: *ADRB2*, *B3GNT2* (hipermetylacja u chorych), *ICAM-1* i *PADI4* (hipometylacja u chorych). W naszej kohorcie AGD, spośród 32 istotnych i zidentyfikowanych wg HGNC hipermetylowanych DMRs warto wymienić 7 CpG w regionie promotorowym *DHX32* (ang. DEAH Asp-Glu-Ala-His box polypeptide 32). Wyciszenie tego genu ma związek z proliferacją

komórek guzów litych, jak rak wątroby, piersi czy jelita grubego [175]. Nadekspresję tego genu zauważono natomiast w limfoblastach, co można wytłumaczyć udziałem wyspecjalizowanych i dojrzałych limfocytów T w patogenezie GD oraz wyników pracy porównującej ekspresję *DHX32* w różnych hodowlach limfocytów [176]. Do innych hipermetylowanych DMRs należały m.in.: 3 CpG *GNAS-AS1* oraz 2 CpG *ATP8B3* (ang. ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 3). Z kolei z łącznie 4 CpG *FANK1* (ang. fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1), 2 CpG powyżej TSS były hipermetylowane, a pozostałe 2 hipometylowane i znajdowały się w obrębie CGI i wewnątrz TSS. Zwiększona ekspresja *FANK1* została zidentyfikowana w nacieku limfocytów regulatorowych na nisze raka trzustki [177].

W pracy Cai i wsp. *locus* ICAM-1 było hipometylowane i niezwiązane z parametrami klinicznymi (TRAb, wielkością wola, wiekiem) [108]. Shalby i wsp. również przedstawili hipometylację *ICAM-1* w AITD [113]. W naszej pracy odnotowaliśmy różnicę stopnia DNAm *ICAM-1* w AGD (-58,32%) względem zdrowych kontroli, a także hipometylację innych *loci* z grupy ICAM (*ICAM-3*, *ICAM-5*). Również w połączonych kohortach GD z Dani i Australii zidentyfikowano CpG w zróżnicowanych DMRs, w tym wspólnych dla [108] (jak *ICAM-1*, *ADRB2*, *B3GNT2*) oraz naszych wyników analizy AGD vs. HC (*CAMK2A*, *CDKN2C*, *SERPINA1*, *RANBP9*, *ICAM-1*, *PTPRA*; Tabele 1. i 9a-c.) [113]. Ponadto wśród istotnych DMRs wykazaliśmy *DNMT3B*, a także CpG anotowane na *B3GNT3* oraz inne (omówione już przy chorych z GO), jak hipometylacja *KLF-9* (Tabela 2. i 4a-d.). Xin i wsp. przedstawili w pracy CpG mapowany na *GLI3*, który został z kolei odnotowany jako istotny dla 2 CpG w naszej grupie dorosłych chorych z GD (Projekt 2.) [122].

W Projekcie 2. bieżącej pracy doktorskiej pokazaliśmy także przykłady CpG mapowanych na regiony promotorowe lub CGI innych *loci* patogenetycznych układu odpornościowego, związanych z AITD i DNAm (także w kontekście leczenia tyreostatykami), tj. *ILR2A*, *IL6R*, *IL17REL* czy *TNF-alfa* (Tabela 9a-c.) [9-11, 114-116, 118]. Wykorzystywano w nich jednak odmienne metody analizy DNAm – zarówno na poziomie genomowym jak i pojedynczego *locus* [114-116, 118]. W pracach poświęconych głównie cytokinom prozapalnym i modulującym przekaznictwo sygnału podczas prezentacji antygenu, pokazano związek chorych z GD z zaburzeniami DNAm *loci*: *CTLA-4*, *IFN-gamma*, *ILR2A*, *IL-6*, *IL-10*, *IL-17* czy *TNF-alfa* [114-116, 118, 120]. W pracach badaczy z Japonii przedstawiono związek polimorfizmów genetycznych i DNAm dla *IFN-gamma* i *TNF-alfa* u chorych z AITD oraz związek z powodzeniem ich leczenia [114-115]. W kontraście, nie odnotowaliśmy istotnych CpG w regionie *IFN*, natomiast w grupie AGD stwierdzona została m.in. hipometylacja (-63,81%)

TNFRSF1B (ang. tumor necrosis factor receptor superfamily, member 1B). Warto zaznaczyć tu również 4 hipometylowane CpG (każde w obrębie CGI) dla *IL-12RB1* (ang. interleukin 12 receptor, beta 1), będącym *locus* receptora beta1 dla IL-12 (p40). Wspomniany receptor bierze udział w stymulacji komórek T (CD4 i CD8) oraz NK, a także moduluje różnicowanie limfocytów Th17 [178-180]. Podjednostka p40 służy też bowiem jako receptor dla IL-23, wykazując tym wielotorowe i zależne od ligandu efekty wewnątrzkomórkowe, mające istotny udział w autoimmunizacji i patogenezie GD [178-180].

Jeśli chodzi o nowe sygnatury metylacyjne Projektu 2. niniejszej rozprawy, w pierwszej kolejności warto zaznaczyć możliwą rolę w GD regionu *CD72*, związanego ze szlakami odpowiedzi swoistej autoreaktywnych limfocytów T CD4+ [181]. Zwracały uwagę również odmiennie metylowane regiony genów głównych białek powierzchniowych leukocytów, w tym limfocytów (*CD5*, *CD7*, *CD8A*), ale również te omówione już przy chorych z GO (jak *CD151*, *CD200*). Ponadto, odnotowano hipometylację *CD44*, genu glikoproteiny uczestniczącej w regulacji demetylacji histonów (zależnie od endocytozy jonów żelaza) oraz będącej markerem nacieku limfocytarnego w raku żołądka [182-183]. Zauważono także (Tabela 9a-c.), że CpG mapowane na regiony związane z apoptozą i cyklem komórkowym (jak *BCL-2*, *BCL-9*, *CDKN2C*, *CDK1*, *JAK2*, *TP53*, *WNT*), co może się wiązać z czasem przeżycia, zmienioną funkcją i potencjałem biologicznym patogennych komórek w GD [184-185].

Z kolei do wytypowanych szlaków wzbogacenia funkcjonalnego należały m.in.: rekrutacja i dojrzewanie limfocytów Th, rozwój narządu wzroku, regulacja adhezji komórkowej (Ryciny 36-37., Tabele 12-13.). Choć w kontekście patologii GD i GO topowe szlaki dotyczyły głównie rozwoju struktur oka i cyklu komórkowego, w Projekcie 2. odnotowaliśmy również liczne, istotne szlaki dotyczące limfocytów bezpośrednio zaangażowanych w kaskadę patologii omawianych chorób. Co interesujące, Cai i wsp. na podstawie zgodnych z naszą pracą baz KEGG i GeneO przedstawił spójnie wzbogacone szlaki, w tym: indukcji apoptozy, cyklu i wzrostu oraz przylegania komórkowego, a także prezentacji antygenów oraz transportu i transdukcji sygnału komórkowego (Ryciny 36-37., Tabele 12-13.) [108].

Bezwzględny profil wartości stopnia całogenomowej DNAm był podobny u dzieci zdrowych i chorych (różnica 1,93%), jednak w odróżnieniu od identycznej analizy dla osób dorosłych, w PGD przeważała hipermetylacja, a topowe wzorce różnicujące nie klastrowały wyraźnie pacjentów od kontroli (Ryciny 21.-22. oraz 26.-27.). Wzorce DNAm w zakresie ocenianego genomu obu grup wyraźnie nie wykazywały odmiennych cech, co szczególnie dobrze uwidoczniło się w chaotycznym wykresie typu heatmap (Rycina 27.), ale także w nachodzącym na siebie, nieseparującym grup klastrowaniu próbek w ramach analizy PCA (Rycina 28.).

Ponadto, w kontraście do analiz zestawiających dorosłe osoby zdrowe i z GO lub GD, DMRs analizy poświęconej dzieciom z GD i zdrowym nie były umiejscowione najczęściej w promotorach. Obie grupy pediatrycznych uczestników Projektu 2. różnicowało łącznie 350024 DMRs, a wśród scharakteryzowanych nielicznych istotnych *loci* (18), zasadne wydaje się skomentowanie CpG zlokalizowanego w regionie promotorowym *TAGLN* (hipometylacja, Tabela 11.). Jest to gen kodujący białko transgelineę, uczestniczące w prezentacji antygenów limfocytom T przez komórki dendrytyczne oraz ich dojrzewaniu oraz migracji do węzłów chłonnych w modelu mysim [186-187]. Ponadto, odnotowano hipermetylację *GDNF*, w odróżnieniu od analiz poświęconych dorosłym zdrowym i chorym z GD (istotna hipometylacja *GDNF*), a także hipermetylację *ONECUT1* (ang. one cut homeobox 1), *locus* dla czynnika transkrypcyjnego zaangażowanego w rozwój różnych typów cukrzycy oraz metabolizmu komórek wątroby i endokrynnych trzustki [188-189]. *NKX6-3* (ang. NK6 homeobox 3), w regionie którego także odnotowaliśmy hipometylację w grupie dzieci z GD, uczestniczy z kolei w różnicowaniu limfocytów B [190]. Uzyskane wyniki, wskazujące na niejednorodność w zakresie zaburzeń DNAm w grupach chorych z GD o różnym wieku zachorowania (PGD i AGD vs. odpowiadające zdrowe kontrole), w połączeniu z danymi o odmiennym przebiegu klinicznym schorzenia w tych grupach oraz wspólnych genetycznych determinantach zachorowania, skłania do pogłębienia badań w tym polu i bezpośredniego zestawienia profilu DNAm pacjentów dorosłych i dzieci.

IX.3.2. Ocena związku pomiędzy całogenomową metylacją DNA komórek krwi obwodowej a wiekiem rozwoju choroby Gravesa i Basedowa

W ujęciu globalnym, chore dzieci z GD prezentowały niewielką hipermetylację w stosunku do dorosłych z GD (0,086%), co przedstawiono również graficznie dla większości chromosomów na Rycinie 31. Jednocześnie topowe DMC różnicujące PGD i AGD były hipometylowane (względem PGD, Rycina 32B.). Szczególnie interesujący był rozdział próbek w analizie PCA dla analizowanych grup (Rycina 33.). Wyraźnie oddzielała się grupa chorych dorosłych, w tym 4 z 5 palących papierosy. Wspominany wielokrotnie w tej rozprawie wpływ nikotynizmu na wystąpienie i przebieg zarówno GD i GO oraz założenie wpływu środowiska jako potencjalnego aktywatora mechanizmów epigenetycznych, spowodował ujęcie palenia papierosów jako aspektu analizy eksploratywnej (również jako czynnika różnicującego chorych z AGD; Ryciny 32 A, 38A-B.). Tak jak w przypadku dzieci z GD oraz zdrowych, odnotowane

DMRs analizy AGD vs. PGD nie były umiejscowione najczęściej w promotorach, zidentyfikowano wśród nich także pojedyncze istotne CpG (Ryciny 29. i 34., Tabele 10. i 11.). W analizie PGD vs. AGD, cztery istotne CpG znajdowały się w obrębie CGI mapowanego na pseudogen *CDK2AP2P2* (hipometylacja, Tabela 11.). Rola pseudogenów – kopii fragmentów DNA niekodujących białek, choć nieoczywista i do tej pory nie wiązana z biologiczną funkcjonalnością, wydaje się nabierać znaczenia w patogenezie wielu nowotworów litych, w tym zakresie regulacji transkrypcji onkogenów [191]. Ponadto, istotne okazały się CpG mapowane na geny *GRM2*, *C9orf92* i *FANK1*. *GRM2* wykazuje możliwy patogenny udział w szlaku Raf/MEK/ERK1/2, w chorobach układu nerwowego, a jego zaburzona DNAm występuje w leukocytach chorych z fibromialgią oraz nadciśnieniem płucnym [192-193]. *FANK1* został już wspomniany w analizie dorosłych zdrowych i świeżo rozpoznanej GD (AGD), a w porównaniu wszystkich pacjentów z GD – dzieci prezentowały hipometylację 2 CpG regionu *FANK1* wewnątrz TSS (Tabela 11.).

Widoczna dominacja występowania DMRs w regionach promotorowych analiz osób zdrowych i GD oraz GO, nie była jednak obecna w odpowiadającej analizie dla dzieci (PGD vs. pHc), a także wszystkich chorych z GD – gdzie obserwowano dominację DMRs międzygenowych. Może to oznaczać zmienność i wieloczynnikowość samej natury procesów epigenetycznych, czego wynikiem jest stopień zmetylowania DNA. Zjawisko to niewątpliwie wymaga dalszych badań, jednak wydaje się, że pośrednio pokazuje też skalę różnic w DNAm w kontekście wieku zachorowania i czasu wpływu czynników środowiskowych. Może też stanowić uzupełnienie wniosków naszej publikacji przedstawiającej wspólne czynniki genetyczne zachorowania na GD, niezależnie od wieku [34]. W pracy autorów (będących członkami zespołu badaczy projektów bieżącej rozprawy), wykazano wstępnie związek z wiekiem zachorowania na GD dla m.in. *MAGI3*, *PRICKLE* oraz *HCP5*, jednak wyniki nie znalazły potwierdzenia po poprawce wielokrotnych porównań (poza *HCP5*) [34; Kuś, Radziszewski, Bossowski, Bednarczuk i wsp.]. Co ciekawe, wspomniane geny stanowią też regiony mapowane na istotne, hipometylowane CpG odkryte w ramach analiz porównujących dorosłe osoby z GD i zdrowe (AGD vs. HC, Tabela 9a-c.) [34]. Biorąc pod uwagę brak wyraźnych różnic między grupami PGD i AGD, zarówno w zakresie całogenomowej DNAm komórek krwi obwodowej, jak i genetycznych wariantów ryzyka, tematyka wieku zachorowania na GD powinna stanowić pole dalszych badań naukowych. W kontekście klinicznym, dzieci dorośli z GD wykazują między sobą istotne różnice, a szczególnie ważne wydają się dyskrepancje powodzenia leczenia przeciwtarczycowego [194]. Obserwowana była też odmienna skala nawrotów po podjętym leczeniu w obu tych grupach [71-75]. Z uwagi na przytoczone różnice obrazu klinicznego tych

pacjentów wydaje się więc zasadne, aby poszukiwać wskaźników i czynników różnicujących GD w zależności od wieku zachorowania.

W nielicznych pracach poświęconych kohortom pediatrycznym i DNAm oraz innym chorobom autoimmunizacyjnym, jak np. T1DM, wykazano zaburzenia DNAm w grupie chorych [195]. Kyrgios i wsp. przedstawił z kolei różnice w DNAm miejsca promotorowego *ILR2A* u dzieci z GD [110]. Możliwe, że nieobecność spójności w zakresie różnic wzorców metylacyjnych w grupie dorosłych i dzieci z GD względem zdrowych kontroli oraz różnica w zaznaczonej przewodzie hipometylacji osób dorosłych z GD w porównaniu do zdrowych, może wynikać z wpływu środowiska zewnętrznego. Przyjmując to założenie, w analizie eksploratywnej skupiono się na znaczeniu nikotynizmu u pacjentów obu Projektów. W życiu człowieka zaznaczona jest zmienna podatność na ksenobiotyki i nikotynizm genów niepodlegających imprintingowi, a poza rozwojem prenatalnym, za okres o największym narażeniu na czynniki środowiskowe wskazano dorosłość [196].

IX.4. Związek zaburzeń metylacji DNA w chorobie Gravesa i Basedowa oraz orbitopatii tarczycowej z czynnikami środowiskowymi

Wpływ środowiska jest nierozzerwalnie związany z organizmami żywymi, a próby obiektywizacji i pomiaru efektu tego wpływu były rozpatrywane również w zakresie zaburzeń DNAm [197-199]. W badaniu Hannon i wsp. odnotowano różnice między bliźniakami jedno- i dwujajowymi znajdując silniejszą korelację DNAm między parami bliźniaków jednojajowych i podkreślając jednocześnie wpływ zarówno genetycznych jak i środowiskowych czynników na wariancję stopnia DNAm obu grup [200]. Wpływ środowiska miał szczególne znaczenie w przypadku zaburzeń DNAm w regionach TSS, a czynników genetycznych bezpośrednio powyżej i poniżej TSS [200]. Dodatkowo, w pracy przedstawiono addytywny wpływ czynników genetycznych na zaburzenia DNAm w CpG silnie związanych z BMI i paleniem papierosów.

W literaturze widnieją doniesienia o wpływie palenia papierosów na specyficzne zmiany DNAm: zarówno hipermetylację jak i hipometylację, ponadto zmiany wzorców były częściowo odwracalne po zaprzestaniu palenia przez ponad 3 miesiące [107, 201]. Dowody na wpływ nikotynizmu na wzorce metylacyjne DNA we krwi obwodowej kobiet ciężarnych i tkanki płodu są natomiast niespójne [202]. Chorzy palący papierosy prezentowali również znamienne punktowe zaburzenia DNAm, na poziomie pojedynczych dinukleotydów CpG oraz przejawiają różnice etniczne [203-204]. Co ciekawe, po zaprzestaniu palenia papierosów, zmiana obrazu wzorców i stopnia DNAm wydaje się następować po różnym czasie – od 3 miesięcy do wielu

lat [107, 205]. Prowadzić to może nawet do przywrócenia pierwotnej formy DNAm lub przeciwnie, zależnie od regionów – w ogóle nie zmieniać wzorców DNA po kilkudziesięciu latach [107, 205]. W wynikach niniejszej rozprawy doktorskiej przedstawiono związek nikotynizmu z całogenomowymi wzorcami chorych ze świeżym rozpoznaniem GD (AGD smokers, Projekt 2., Rycina 38A-B.), odnotowano również mnogie *loci* anotowane na znalezione DMC, w tym geny mucyny, miRNA, *FANK1* czy *NNAT*. Zaburzenia DNAm mogą więc stanowić efektor dla narażenia na palenie tytoniu w jakiegokolwiek postaci wśród chorych z GD. Wyniki te wydają się być niezwykle istotnym elementem pracy doktorskiej, bowiem nikotynizm jest absolutnie kluczowym środowiskowym czynnikiem ryzyka GD (oraz GO), o udowodnionym wpływie na skuteczność i czas leczenia oraz nawrotu choroby [66-67, 70-71]. Co ciekawe, podczas gdy dorośli chorzy z GD prezentowali ewidentną globalną hipometylację w porównaniu ze zdrowymi uczestnikami, palący chorzy z grupy AGD odznaczyli się hipermetylacją DNA na poziomie zarówno specyficznym dla *locus* jak i w obrazie całogenomowym. Pokazuje to, że wzorce globalne – stanowiące wskaźnik dla choroby mogą się różnić (jak w przypadku PGD vs. AGD, Ryciny 31. i 32 A-B.) lub być spójne dla swoistych, istotnych sygnatur ryzyka dla pojedynczych CpG i choroby (jak w przypadku palących AGD, Rycina 38A-B.). Zwraca również uwagę fakt zbieżnego obrazu całogenomowego DNAm chorych AGD niepalących i pacjentki z krótkimi wywiadami nikotynizmu oraz czasem od całkowitego zaprzestania palenia (Rycina 32A.). Taki efekt jest zbieżny z pracą, gdzie przedstawiono zmianę stopnia DNAm wytypowanych *loci* po przerwaniu palenia [205]. Podkreśla to również dynamikę procesu DNAm i charakterystykę markerów epigenetycznych, zwracając uwagę na ostrożną interpretację procesu w czasie i lokalizacji w genomie.

Istnieją również doniesienia dotyczące zmian genomowej DNAm wobec ilości dostarczonego w pożywieniu jodu [206-208]. W jednej z prac dotyczącej patogenezy AITD oraz grup chorych pochodzących z 3 lokacji o odmiennej dostępności jodu, zbadano zaburzenia DNAm w regionach szlaku PI3K-AKT [206]. Zwrócono uwagę na udział *loci* *ITGA6* oraz *PRKAA2_3* jako potencjalnych sygnatur metylacyjnych AITD, podczas gdy w innej pracy wykazano hipometylację i zwiększoną ekspresję *RAB8A* oraz *RAP1A* u osób z AITD [206-207]. CpG *RAB8A* i *RAP1A* były głównie hipometylowane w obszarach o nadmiernym zasobie wodnym jodu. Zhou i wsp. wykazali z kolei zaburzenia DNAm regionów szlaków apoptozy w grupach chorych zależnie od poziomu jodu w zbiornikach wodnych [209]. Również w projektach niniejszej rozprawy odnotowano powyższe DMRs jako istotne, nie przeprowadzono jednak odrębnej analizy dotyczącej podaży jodu oraz położenia geograficznego chorych. Jednakże,

zgodnie z badaniem polskich autorów, wszyscy pacjenci Projektów mogą być zaliczeni do obszarów o optymalnej podaży tego mikroelementu [210].

Jednocześnie, pierwsze dowody związku niedoboru jodu i zmian DNAm dowodzą kolejnego, poza nikotynizmem istotnego wpływu czynników środowiskowych na DNAm, a dodatkowo mogą zostać jeszcze uzupełnione naszymi wynikami dotyczącymi wzbogacenia funkcjonalnego szlaków infekcji *Yersinia* i WZWC (Tabela 6). W odniesieniu do przedstawionej, potencjalnej interakcji czynników środowiskowych i DNAm, ten mechanizm epigenetyczny wydaje się być również związany z czynnikami osobniczymi, jak XCI i płeć (żeńską) [12, 47, 50-53]. Ponadto, w grupie ciężarnych kobiet (n=13) z HT rozpoznanym przed ciążą oraz zdrowych ciężarnych (n=8), przy pomocy MEDIPchip odnotowano we krwi obwodowej łącznie 162 hipermetylowane i 490 hipometylowanych DMRs, a wśród wzbogaconych szlaków wytypowanych na podstawie istotnych DMRs znaleziono m.in. te dotyczące różnicowania limfocytów T [211].

IX.5. Ograniczenia Projektów

Projekty tworzące niniejszą rozprawę doktorską wykazują istotne, wymagające skomentowania ograniczenia.

IX.5.1. Heterogenność badanych grup

W pierwszej kolejności należy wymienić heterogenność grupy badawczej Projektu 1., w tym w zakresie historii medycznej i prezentacji klinicznej. Pacjenci z GO prezentują różnorodny przebieg i obraz choroby, a czas jej ujawnienia, leczenie i postać zaawansowania – wieloczynnikowe [13, 65-66, 82]. Kohorta pacjentów objętych Projektem 1. niniejszej rozprawy odzwierciedla to zróżnicowanie, m.in. znacząco różniąc się przebiegiem GO przed podjęciem leczenia ivGCS. Chorzy przebyli leczenie ATD (wszyscy, n=24), a także leczenie radykalne w postaci RAI (n=5) oraz tyreidektomii (n=7). Dochowano staranności w wykluczeniu wpływu GCS (doustnego lub iv) oraz zaburzeń funkcji tarczycy (hipertyreoza/hipotyreoza) przed podjętym leczeniem ivGCS. Dane literaturowe wskazywały na zmiany stopnia DNAm już po trzymiesięcznym leczeniu przeciwtarczycowym (ATD, RAI), skutkując wzrostem globalnej DNAm u chorych z wyjściową hipometylacją [117]. Ponadto, istnieją doniesienia o zmianach stopnia DNAm po zabiegach chirurgicznych (resekcji raka jelita, planowej i ostro dyżurowej operacji stawu biodrowego) oraz pomostowaniu aortalno-

wieńcowym [212-213]. W badaniu tym przedstawiono odmienną różnicę w DNAm w pierwszym dniu i 4-7.dnia względem okresu przedoperacyjnego, nie prowadzono jednak analizy długoterminowej zmian DNAm [212]. Jednakże, w literaturze porównano też obraz DNAm chorych sprzed leczenia z okresem pooperacyjnym zabiegów bariatrycznych po 24 miesiącach, dokonując analizy krwi obwodowej i tkanki tłuszczowej, zauważając przewagę hipometylowanych DMRs we krwi oraz hipermetylację w tkance tłuszczowej, z jednoczesną niewielką zgodnością DMRs w każdej z tych tkanek (1,2-2,4%) [214]. Wreszcie, zaburzenia DNAm zostały również przeanalizowane w kontekście bólu ostrego i przewlekłego, uwidaczniając globalne i specyficzne zaburzenia DNAm (jak *TET*, *DNMT3B* czy *GRM2* w fibromialgii) [192, 215]. Warto podkreślić, że bóle zagałkowe i towarzyszące ruchom gałek ocznych stanowią jedne z istotniejszych dla komfortu życia oraz głównych skarg chorych z GO, występując u 42,25 % z nich [65, 67, 216-217].

Z kolei dorośli, chorzy uczestnicy Projektu 2. (AGD), stanowiący klinicznie bardziej homogenną grupę oraz prezentujący typowy fenotyp choroby, byli też wyselekcjonowani pod kątem uwikłania czynników w postaci kryterium nieobecności wcześniej podejmowanego leczenia przeciwtarczycowego, a poza wiekiem, różnicowało ich przede wszystkim palenie papierosów. Wobec spodziewanego, nie w pełni poznanego wpływu XCI i fMC w kontekście mechanizmów epigenetycznych oraz osobniczych, wyniki obejmujące dzieci z GD powinny być interpretowane ostrożnie z uwagi na nietypową liczebność kohorty męskiej w PGD.

IX.5.2. Materiał biologiczny i uwikłanie czynników związane ze stosowaniem dożylnych glikokortykosteroidów

Kolejnym istotnym ograniczeniem omawianych projektów jest populacja komórek (wszystkich leukocytów) będących przedmiotem analizy zaburzeń DNAm. W niniejszej pracy doktorskiej oceniono wzorce i stopnie metylacji DNA w krwinkach białych krwi obwodowej uczestników. Z uwagi na istotne trudności logistyczne, w tym dostępność kolejnej pracowni w okresowo wyjątkowej sytuacji epidemiologicznej związanej z pandemią koronawirusa SARS-COV2, w realizacji projektu nie wyodrębniano przy pomocy fikolu i cytometrii przepływowej frakcji limfocytów kluczowych dla patogenezy GD, analizując pełną krew obwodową [218]. Ponadto, ostateczne niezdecydowanie się na to rozwiązanie nie prowadziło do ryzyka uzyskania niedostatecznego minimalnego materiału wyjściowego DNA do izolacji, trawienia i przygotowania bibliotek metylacyjnych. Dla RRBS zbyt niski input DNA może prowadzić bowiem do uzyskania wyników o niewystarczającej rozdzielczości [219]. Mimo, że spójne z

bieżącą rozprawą doktorską podejście (ocena DNAm we krwi obwodowej) można spotkać w większości dostępnej literatury poświęconej GD i zaburzeń DNAm (Tabele 1. i 2.), wykazanie różnic DNAm, w tym zwłaszcza w zakresie kluczowych dla GD i GO *loci*, mogło być utrudnione. Kontekst ten jest szczególnie podkreślony w subanalizie poświęconej związkowi DNAm i terapii ivGCS w GO, gdzie z uwagi na znany mechanizm rekrutacji neutrofilów do krwi obwodowej pod wpływem GCS oraz bazowy stosunek populacji krwinek białych ulegał sukcesywnym zmianom w trakcie trwania 12-tygodniowej terapii glikokortykosteroidowej [220-223]. Neutrofile są najliczniejszą frakcją granulocytów i wszystkich leukocytów (50-70%), a w warunkach nieobecności czynnika wywołującego, np. zapalnego, umierają w ciągu godzin od pojawienia się we krwi obwodowej [224]. Limfocyty natomiast, będące mniej liczną grupą leukocytów żyją dłużej (w zależności od podtypu i funkcji), od kilku dni do lat [224]. Obserwowane wyniki Projektów powinny być zatem interpretowane z dużą ostrożnością, obejmują bowiem DMRs z różnych frakcji krwinek białych krwi obwodowej, a Projekcie 1. możliwie także z różnych puli subpopulacji krwinek białych powstających w czasie leczenia. Odrębnym istotnym aspektem analiz Projektu 2. jest charakterystyka zbadanych dziecięcych uczestników: PGD i pHc – prezentujących odpowiednio wiek 15 (IQR: 12-17; minimalny wiek 9 lat) i 15,5 (IQR: 12-16; minimalny wiek 6 lat) lat, a także znany fizjologiczny spadek ilości limfocytów (i wzrost neutrofilii) we krwi obwodowej dzieci od ok. 5 r.ż., prowadząc do norm przyjętych dla osób dorosłych [225]. Krwinki te są uważane za główne ogniwo patogenetyczne AITD i w analizach bieżącej rozprawy uniknięto wpływu efektu odmiennego rozkładu subpopulacji krwinek białych pacjentów. Z innej strony, choć według obecnej wiedzy limfocyty stanowią kluczowe komórki układu odpornościowego w patogenezie GD i GO, postuluje się w niej również ważny udział innych komórek, np. limfocytów NK (ang. natural killers, NKs) czy komórek dendrytycznych (ang. dendritic cells, DCs) [226-227]. Udowodniono też zmiany poziomu DCs we krwi obwodowej 1-8 dni po terapii ivGCS [222, 227]. Wreszcie, z uwagi na jasno określone w wytycznych EUGOGO wskazania kliniczne, chorzy z GO otrzymali leczenie pulsami ivGCS o różnej kumulacyjnej dawce, tj. 4,5 g (n=17) oraz 7,5 g (n=7), co również mogło wpływać na ostatecznie uzyskane wyniki DNAm oraz frakcje krwinek białych poddawanych analizie w punkcie P2 Projektu 1. Efekt dawki 7,5 g ivMP został przedstawiony w subanalizie eksploratywnej Projektu 1., wykazując odmienną DNAm na poziomie szczegółowym pojedynczych CpG oraz hipermetylację DNA wzorców pacjentów stosujących wyższe dawki ivGCS podczas terapii GO.

IX.5.3. Metoda laboratoryjna oceny metylacji DNA i analiza wyników

Należy również rozważyć rozbieżność uzyskiwanych wyników i podejścia do ich interpretacji, w zależności od rodzaju analizy DNAm [228-231]. Techniki te różnią się kosztem, dokładnością, głębokością i pokryciem odczytów sekwencji, a także częścią genomu poddawanemu analizie (w przypadku narzędzi całogenomowych), w zależności od użytej metody/metod molekularnych [230]. Obecnie dysponujemy różnymi technikami analizy DNA, w tym na poziomie całego genomu (metylomu), globalnych lub danego locus [144, 228]. Należą do nich metody oparte na sekwencjonowaniu nowej generacji oraz inne, jak np. wykorzystujące techniki mikromacierzy [145, 228]. Do pierwszej grupy zaliczamy techniki wykorzystujące wzbogacanie analizowanych regionów DNA w sekwencje o podwyższonej zawartości CpG – wiązanie domen bogatych w CpG (technika Methylated DNA Binding Domain Sequencing, MBD-seq) czy przeciwciała wiążące 5-MC (MeDIP-seq), a także inne, jak sekwencjonowanie całego genomu (Whole Genome Bisulfite Sequencing, WGBS) czy zredukowane reprezentacyjne sekwencjonowanie bisulfitowe (ang. reduced representation bisulfite sequencing, RRBS). W metodach tych spotykamy różnice w zakresie rodzaju informacji dotyczącej analizy pokrycia CpG różnych regionów metylomu oraz wykrywania 5-MC poza CpG [142-144, 231]. W przypadku RRBS, skupienie się na wzbogaceniu CpG oraz CGI, czyli funkcjonalnym kontekście opartym o analizę miejsc promotorowych i transkrypcyjnych w genomie, stwarzało trudność zestawienia z wynikami uzyskiwanymi innymi technikami. Analiza RRBS i) pokrywa kilka procent ludzkiego genomu, jednakże obejmuje przy tym najważniejsze, biologicznie istotne regiony (ok. 85% fragmentów wysp CGI, promotorów genów), ponadto ii) jest czuła względem detekcji większych skupisk CpG (jak CGI), iii) uwzględnia różnice w stopniu DNAm dla pojedynczego nukleotydu (nie fragmentu kilkudziesięciu bp, jak MEDIP) a także iv) pozwala przy tym na większą w porównaniu do MEDIP głębokość odczytu próbki [231]. Wreszcie, zastosowanie metody RRBS dało realną szansę na zrealizowanie projektu w porównaniu do metody WGBS (wyższy koszt), jednocześnie zachowując sens w kontekście funkcjonalnym zaburzeń DNAm (ocena w głównej mierze DNAm miejsc promotorowych genów) [145-146, 148]. Jednocześnie, limity finansowe wciąż kosztochłonnej metodyki skutkowały zrekrutowaniem i ostatecznym wprowadzeniem łącznie 12 zdrowych kontroli i 42 chorych z GD (w tym 24 chorych z GO), uzyskując tym samym n=78 zsekwencjonowanych bibliotek metylacyjnych w ramach obu Projektów. Liczebność bazowa grup projektów, będąca pochodną ograniczeń finansowych, stanowiła więc kolejny limit, jednak w porównaniu do cytowanej literatury stanowiła jedną z

najliczniejszych grup wykorzystujących techniki całogenomowe (Tabele 1. i 2.). Arbitralnie przyjęte odcięcie różnicy dla zmian stopnia DNAm – 25% wraz ze standardowym, akceptowalnym minimalnym pokryciem – 10x (zapobiegające wynikom fałszywie dodatnim; dotyczy RRBS), miało zwiększyć wiarygodność uzyskanych wyników [145-148]. W literaturze, poza zróżnicowanymi technikami analizy laboratoryjnej DNAm w AITD (Tabele 1-2.), spotykamy również odmienne podejścia do analizy statystycznej. W badaniach poświęconych DNAm w AITD można spotkać różnie przyjęte punkty odjęcia dla istotnej różnicy DNAm, jak np. 10% w przypadku pracy poświęconej zaburzeniom DNAm w grupie chorych z Hashimoto [232]. Również w tym kontekście porównywanie wyników prac poświęconych DNAm jest trudne, a przedstawianie i komentowanie wyników własnych powinno być przeprowadzane krytycznie.

IX.5.4. Podsumowanie

Zgodnie z naszą wiedzą, w projektach tworzących rozprawę doktorską po raz pierwszy (i) wykazano wpływ ivGCS na obraz całogenomowej DNAm w GO, a także (ii) scharakteryzowano szczegółowe i całogenomowe zaburzenia DNAm w grupie dzieci z GD oraz (iii) wśród palących, dorosłych pacjentów z GD. Zgodnie z literaturą, nasze badania – tworzące projekty poświęcone GD i DNAm wykonano na najliczniejszej dotychczas grupie chorych w oparciu o metodę RRBS.

Podsumowując, obecnie etiopatogeneza GD (i GO) jest poznana jedynie częściowo, przy czym zwraca uwagę jej wieloczynnikowe podłoże, wśród których najpewniej znajdują się również zaburzenia DNAm. Pacjenci z GD oraz z GO prezentują odmienne wzorce DNAm i dominującą hipometylację DNA względem osób zdrowych, zarówno w ujęciu całogenomowym jak i na poziomie regionów związanych z licznymi procesami immunologicznymi, wzrostu i różnicowania komórek, a także stanu zapalnego. Dzieci z GD wykazują pojedyncze różnice stopnia DNAm na poziomie *loci*, a ich globalne wzorce DNAm są zbliżone do tych u niepalących chorych dorosłych. Nie różnią też się wzorcami DNAm względem zdrowych dzieci. Wpływ terapii ivGCS w aktywnej umiarkowanej do ciężkiej GO wyraża się w postaci zmiany wzorców DNA niezależnie od odpowiedzi na terapię, a dla poszczególnych pacjentów również w postaci zmiany stopnia DNAm niektórych z *loci*. Z uwagi na obecny stan wiedzy, dotyczący natury procesu powstawania DNAm, jej zmienności i możliwej dwustronnej zależności od czynników genetycznych, endogennych i środowiskowych (szczególnie nikotynizmu), konieczne są kolejne badania w tym polu. Warto przy tym podkreślić wartość badań celowanych na komórki najpełniej zaangażowane w proces patogeny GD i GO. Wskazana jest także ostrożna interpretacja wyników zaburzeń DNAm w AITD, obejmująca analizę uwikłania czynników klinicznych, jak np. wcześniejszego leczenia przeciwtarczycowego.

X Wnioski (Projekty 1. i 2.)

- Całogenomowe wzorce DNAm różnicują osoby zdrowe z chorymi z GD oraz z chorymi z GO
- Zarówno pacjenci z GD, jak i aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO prezentują całogenomową hipometylację DNA względem osób zdrowych, a na poziomie szczegółowym m.in. w zakresie licznych regionów związanych z układem immunologicznym
- Całogenomowe wzorce DNAm ulegają zmianie po terapii ivGCS u chorych z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO
- Zmiana stopnia DNAm nie ma związku z odpowiedzią na leczenie ivGCS u chorych z aktywną, umiarkowaną do ciężkiej GO
- Dzieci z GD wykazują pojedyncze, odmienne wzorce DNAm względem dzieci zdrowych, natomiast analiza szczegółowa ujawniła związek PGD z zaburzeniami metylacji pojedynczych *loci*, jak: *TAGLN*, *ONECUT1*, *OSM*, *NKX6-3*, *CALML5*
- Dorośli i dzieci z GD nie różnią się profilem całogenomowej DNAm, a dyskryminującym czynnikiem dla wzorców DNAm obu grup jest nikotynizm, związany z hipermetylacją u osób palących
- Szczegółowe różnice w stopniu DNAm między osobami dorosłymi i dziećmi z GD są związane m.in. z *FANK1*, *GRM2* oraz *CDK2AP2P2*
- Odpowiednie, istotne CpG różnicujące osoby zdrowe z chorymi z GD oraz z chorymi z GO, są mapowane na geny wykazujące wpływ na liczne szlaki metaboliczne, w tym m.in. różnicowania kluczowych w patogenezie GD komórek odpornościowych (limfocytów T), cytokin prozapalnych, czynników wzrostu i rozwoju narządu wzroku
- Potrzebne są dalsze badania nad czynnikami zachorowania i markerami prognostycznymi dla chorych z odmiennymi fenotypami GD oraz predykcją powodzenia ich leczenia

XI Piśmiennictwo

1. Alessandro Antonelli. Graves' disease: Epidemiology, genetic and environmental risk factors and viruses. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020 Jan;34(1):101387.
2. Abraham-Nordling M et al. Incidence of hyperthyroidism in Sweden. *Eur J Endocrinol.* 2011; 165(6): 899–905.
3. Smith TJ et al. Graves' disease. *N Engl J Med* 2016; 375: 1552–1565.
4. Peter N Taylor. Global epidemiology of hyperthyroidism and hypothyroidism. *Nat Rev Endocrinol.* 2018 May;14(5):301-316.
5. McLeod DS et al. Variation in rates of autoimmune thyroid disease by race/ethnicity in US military personnel. *JAMA* 2014; 311: 1563-1565.
6. Wiersinga WM et al. Hyperthyroidism: aetiology, pathogenesis, diagnosis, management, complications, and prognosis. *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2023 Apr;11(4):282-298.
7. Christian M Girgis et al. Current Concepts in Graves' Disease. *Ther Adv Endocrinol Metab.* 2011 Jun;2(3):135–144.
8. Hussain et al. Epidemiology, management and outcomes of Graves' disease—real life data. *Endocrine* (2017) 56:568–578.
9. Rydzewska M, Bossowski et al. Role of the T and B lymphocytes in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Thyroid Research* (2018) 11:2
10. Qian Li et al. The pathogenesis of thyroid autoimmune diseases: New T lymphocytes - Cytokines circuits beyond the Th1-Th2 paradigm. *J Cell Physiol.* 2019 Mar;234(3):2204-2216.
11. Alessandro Antonelli. Graves' disease: Clinical manifestations, immune pathogenesis (cytokines and chemokines) and therapy. Alessandro Antonelli. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2020 Jan;34(1):101388.
12. Effraimidis G, Wiersinga WM. Mechanisms in endocrinology: autoimmune thyroid disease: old and new players. *Eur J Endocrinol.* 2014;170(6):R241-52.
13. Mikołaj Radziszewski, Aleksander Kuś, Tomasz Bednarczuk. Genotype-phenotype correlations in Graves' disease. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, Volume 37, Issue 2, March 2023, 101745.
14. Coppedè F. Epigenetics and Autoimmune Thyroid Diseases. *Front Endocrinol (Lausanne)*.2017; 8:149.
15. Michele Marinò et al. Role of genetics and epigenetics in Graves' orbitopathy. *European Thyroid Journal.* 2024 Nov 6;13(6):e240179.

16. Simmonds MJ. GWAS in autoimmune thyroid disease: redefining our understanding of pathogenesis. *Nat Rev Endocrinol*. 2013 May;9(5):277-87.
17. Thomas Heiberg Brix et al. Evidence for a Major Role of Heredity in Graves' Disease: A Population-Based Study of Two Danish Twin Cohorts. *J Clin Endocrinol Metab*. 2001 Feb;86(2):930-4.
18. Owen CJ et al. Genetic association studies of the FOXP3 gene in Graves' disease and autoimmune Addison's disease in the United Kingdom population. *Journal of Molecular Endocrinology* 2006 37 97–104.
19. Ban Y et al. The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. *Journal of Autoimmunity* 2007 28 201–207.
20. Rafał Płoski, Tomasz Bednarczuk et al. The genetic basis of graves' disease. *Curr Genomics*. 2011 Dec;12(8):542-63.
21. Heward JM et al. The development of Graves' disease and the CTLA-4 gene on chromosome 2q33. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84(7):2398–401.
22. Thomas Heiberg Brix et al. Twin studies as a model for exploring the aetiology of autoimmune thyroid disease. *Clinical Endocrinology* (2012) 76, 457–464
23. Kuś A, Bednarczuk T, Płoski R et al. Gender-dependent and age-of-onset-specific association of the rs11675434 single-nucleotide polymorphism near TPO with susceptibility to Graves' ophthalmopathy. *J Hum Genet*. 2017 Mar;62(3):373-377.
24. Bufalo NE et al. TSHR intronic polymorphisms (rs179247 and rs12885526) and their role in the susceptibility of the Brazilian population to Graves' disease and Graves' ophthalmopathy. *J Endocrinol Investig* 2015;38(5):555–61.
25. Chng CL et al. Ethnic differences in the clinical presentation of Graves' ophthalmopathy. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2012;26(3):249–58.
26. Bednarczuk T, Płoski R, et al. Susceptibility genes in Graves' ophthalmopathy: searching for a needle in a haystack? *Clin Endocrinol* 2007;67(1):3–19.
27. Liu YH et al. Single nucleotide polymorphisms at the PRR3, ABCF1, and GNL1 genes in the HLA class I region are associated with Graves' ophthalmopathy in a gender-dependent manner. *Ophthalmology* 2014;121(10):2033–9.
28. Stasiak M et al. Significance of HLA in the development of Graves' orbitopathy. *Genes Immun* 2023. <https://doi.org/10.1038/s41435-023-00193-z>
29. Yin X et al. Genetic profiling in Graves' disease: further evidence for lack of a distinct genetic contribution to Graves' ophthalmopathy. *Thyroid* 2012;22(7):730–6.

30. Kuś A, Bednarczuk T et al. The association of thyroid peroxidase antibody risk loci with susceptibility to and phenotype of Graves' disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2015 Oct;83(4):556-62
31. Jurecka-Lubieniecka B et al. Association between polymorphisms in the TSHR gene and Graves' orbitopathy. *PloS One* 2014;9(7):e102653.
32. Bednarczuk T et al. Association of tumor necrosis factor and human leukocyte antigen DRB1 alleles with Graves' ophthalmopathy. *Hum Immunol* 2004;65(6):632–9.
33. Du P et al. Associations of CTLA4 gene polymorphisms with Graves' ophthalmopathy: a meta-analysis. *Int J Genom* 2014;2014:537969.
34. Kuś A, Radziszewski M, Bossowski A, Bednarczuk T, Płoski R. et al. Paediatric-onset and adult-onset Graves' disease share multiple genetic risk factors. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2019 Feb;90(2):320-327.
35. Tanrikulu S et al. The predictive value of CTLA-4 and Tg polymorphisms in the recurrence of Graves' disease after antithyroid withdrawal. *Endocrine* 2006;30(3):377–81.
36. Kim KW et al. Susceptible alleles of the CD40 and CTLA-4 genes are not associated with the relapse after antithyroid withdrawal in Graves' disease. *Thyroid* 2007;17(12):1229–34
37. Pawlak-Adamska E et al. CD28/CTLA-4/ICOS haplotypes confers susceptibility to Graves' disease and modulates clinical phenotype of disease. *Endocrine* 2017;55(1):186–99.
38. F. Eliana et al. The role of cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 (CTLA-4) gene, thyroid stimulating hormone receptor (TSHR) gene and regulatory T-cells as risk factors for relapse in patients with Graves' disease. *Acta Med Indones*, 49 (3) (2017), pp. 195-20
39. M. Rydzewska et al. Analysis of chosen polymorphisms rs2476601 a/G - PTPN22, rs1990760C/T - IFIH1, rs179247 a/G - TSHR in pathogenesis of autoimmune thyroid diseases in children. *Autoimmunity*, 51 (4) (2018), pp. 183-190
40. M Marinò et al. Role of genetic and non-genetic factors in the etiology of Graves' disease. *J Endocrinol Invest*. 2015 Mar;38(3):283-94
41. Diana Grove-Laugesen et al. Effect of Vitamin D Supplementation on Graves' Disease: The DAGMAR Trial. *Thyroid*. 2023 Sep;33(9):1110-1118.
42. Rui Zhao et al. Immunomodulatory Function of Vitamin D and Its Role in Autoimmune Thyroid Disease. *Front Immunol*. 2021 Feb 19;12:574967.
43. Giulia Lanzolla et al. Selenium in the Treatment of Graves' Hyperthyroidism and Eye Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Jan 26;11:608428.

44. Simmonds MJ et al. Skewed X chromosome inactivation and female preponderance in autoimmune thyroid disease: an association study and meta-analysis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 2014 99 E127–E131. (doi:10.1210/jc. 2013-2667)
45. Chabchoub G et al. Analysis of skewed X-chromosome inactivation in females with rheumatoid arthritis and autoimmune thyroid diseases. *Arthritis Res. Ther.*, 2009, 11, R106.
46. Brix, T.H. et al. High frequency of skewed X-chromosome inactivation in females with autoimmune thyroid disease: a possible explanation for the female predisposition to thyroid autoimmunity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2005, 90, 5949-5953.
47. Smith-Bouvier, D.L. et al. A role for sex chromosome complement in the female bias in autoimmune disease. *J. Exp. Med.*, 2008, 205, 1099-1108.
48. Valentina Cirello Fetal cell microchimerism: a protective role in autoimmune thyroid diseases. *Eur J Endocrinol.* 2015 Jul;173(1):111-8. doi: 10.1530/EJE-15-0028. Epub 2015 Apr 27.
49. Kennedy, R.L. et al. Thyroid function and pregnancy: Before, during and beyond. *J. Obstet. Gynaecol.*, 2010, 30, 774-783.
50. Yin, X. et al. Thyroid epigenetics: X chromosome inactivation in patients with autoimmune thyroid disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2007, 1110, 193-200.
51. Ando, T. et al. Postpartum Autoimmune Thyroid Disease: The Potential Role of Fetal Microchimerism. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2003, 88, 2965-2971.
52. Ozcelik, T. et al. Evidence from autoimmune thyroiditis of skewed X-chromosome inactivation in female predisposition to autoimmunity. *Eur. J. Hum. Genet.*, 2006, 14, 791-797.
53. Suttikarn Santiwatana et al. Skewed X chromosome inactivation in girls and female adolescents with autoimmune thyroid disease. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2018 Dec;89(6):863-869.
54. In-Cheol Baek et al. Assessment of XCI skewing and demonstration of XCI escape region based on single-cell RNA sequencing: comparison between female Grave's disease and control. *BMC Mol Cell Biol.* 2025 Jan 31;26(1):8.
55. Sun Y. Lee et al. Hyperthyroidism: A Review. *JAMA*. 2023 Oct 17;330(15):1472-1483.
56. Samia Farooqi et al. High risk and low prevalence diseases: Thyroid storm. *Am J Emerg Med.* 2023 Jul;69:127-135.
57. Bartalena L, Piantanida E et al. Epidemiology, Natural History, Risk Factors, and Prevention of Graves' Orbitopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020; 11: 615993
58. Laurberg P, Berman DC et al. Incidence and clinical presentation of moderate to severe Graves' orbitopathy in a Danish population before and after iodine fortification of salt. *J Clin Endocrinol Metab* (2012) 97:2325–32. doi: 10.1210/jc.2012-1275

59. Perros P et al. Graves' orbitopathy as a rare disease in Europe: a European Group on Graves' Orbitopathy (EUGOGO) position statement. *Orphanet J Rare Dis* (2017) 12:72. doi: 10.1186/s13023-017-0625-1
60. Piantanida E et al. Prevalence and natural history of Graves' orbitopathy in the XXI century. *Journal of Endocrinological Investigation* 2013 36 444–449.
61. Cui et al. A review of TSHR- and IGF-1R-related pathogenesis and treatment of Graves' orbitopathy. (2023) A review of TSHR- and IGF-1R-related pathogenesis and treatment of Graves' orbitopathy. *Front. Immunol.* 14:1062045.
62. Bartalena L et al. Extrathyroidal manifestations of Graves' disease: a 2014 update. *J Endocrinol Invest.* 2014;37(8):691–700. .
63. Nickisa M. Hodgson et al. Current Understanding of the Progression and Management of Thyroid Associated Orbitopathy: A Systematic Review. *Ophthalmol Ther* (2020) 9:21–33.
64. Katharina A Ponto et al. The tale of radioiodine and Graves' orbitopathy. *Thyroid.* 2010 Jul;20(7):785-93.
65. Tanda et al. Prevalence and Natural History of Graves' Orbitopathy in a Large Series of Patients With Newly Diagnosed Graves' Hyperthyroidism Seen at a Single Center. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013 Apr;98(4):1443-9.
66. Wiersinga W et al. Predictive score for the development or progression of Graves' orbitopathy in patients with newly diagnosed Graves' hyperthyroidism. *Eur J Endocrinol.* 2018 Jun;178(6):635-643.
67. L. Bartalena, G.J. et al. The 2021 European Group on Graves' orbitopathy (EUGOGO) clinical practice guidelines for the medical management of Graves' orbitopathy. *Eur. J. Endocrinol.* 185(4), G43–G67.
68. Shivangi Nikhil Dwivedi. Thyroid autoantibodies. *J Clin Pathol.* 2023 Jan;76(1):19-28.
69. Stożek et al. Functional TSH receptor antibodies in children with autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity* (2018), 51(2), 62–68.
70. Kahaly GJ et al. Mini-Review. Management of Graves Thyroidal and Extrathyroidal Disease: An Update. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2020, Vol. 105, No. 12, 3704–3720
71. Kahaly GJ et al. 2018 European Thyroid Association Guideline for the Management of Graves' Hyperthyroidism. *Eur Thyroid J.* 2018 Aug;7(4):167-186.
72. Léger J et al. Graves' disease in children. *Ann Endocrinol (Paris).* 2018 Dec; 79(6):647-655

73. Léger J et al. MANAGEMENT OF ENDOCRINE DISEASE: Arguments for the prolonged use of antithyroid drugs in children with Graves' disease. *Eur J Endocrinol*. 2017 Aug;177(2):R59-R67
74. Laurberg et al. Relapse following antithyroid drug therapy for Graves' hyperthyroidism. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2014 Oct;21(5):415-21
75. Xander G Vos et al. Predicting the Risk of Recurrence Before the Start of Antithyroid Drug Therapy in Patients With Graves' Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Apr;101(4):1381-9.
76. Masiello E et al. Antithyroid drug treatment for Graves' disease: baseline predictive models of relapse after treatment for a patient-tailored management. *J Endocrinol Investig* 2018;41(12):1425–32
77. Vos XG et al. Predicting the Risk of Recurrence Before the Start of Antithyroid Drug Therapy in Patients With Graves' Hyperthyroidism. *J Clin Endocrinol Metab*. 2016 Apr;101(4):1381-9.
78. Marcocci C et al. Selenium and the course of mild Graves' orbitopathy. *New England Journal of Medicine* 2011
79. Bartalena L et al. Does early response to intravenous glucocorticoids predict the final outcome in patients with moderate-to-severe and active Graves' orbitopathy? *J Endocrinol Invest*. 2017;40(5):547-53.
80. Zhu W et al. A prospective, randomized trial of intravenous glucocorticoids therapy with different protocols for patients with graves' ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab*. 2014; 99(6): 1999–2007.
81. S. Zang et al. Intravenous Glucocorticoids for Graves' Orbitopathy: Efficacy and Morbidity. *J Clin Endocrinol Metab*, February 2011, 96(2):320–332
82. Bartalena L et al. Current concepts regarding Graves' orbitopathy. *J Intern Med*. 2022 Nov;292(5):692-716.
83. S M Singh et al. Epigenetic contributors to the discordance of monozygotic twins. *Clin Genet*. 2002 Aug;62(2):97-103.
84. Moore, L.D. et al. DNA methylation and its basic function. *Neuropsychopharmacology*, 2013. 38(1): p. 23-38.
85. Soumen Manna et al. Epigenetic signaling and crosstalk in regulation of gene expression and disease progression. *Epigenomics*. 2023 Jul;15(14):723-740.
86. Madeleine P Ball et al. Targeted and genome-scale strategies reveal gene-body methylation signatures in human cells. *Nat Biotechnol*. 2009 Apr;27(4):361-8.

87. Xiaodong Cheng et al. Mammalian DNA methyltransferases: a structural perspective. *Structure*. 2008 Mar;16(3):341-50.
88. U Aapola et al. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family. *Genomics*. 2000 May 1;65(3):293-8.
89. Humaira Gowher et al. Mechanism of stimulation of catalytic activity of Dnmt3A and Dnmt3B DNA-(cytosine-C5)-methyltransferases by Dnmt3L. *J Biol Chem*. 2005 Apr 8;280(14):13341-8.
90. Isao Suetake et al. DNMT3L stimulates the DNA methylation activity of Dnmt3a and Dnmt3b through a direct interaction. *J Biol Chem*. 2004 Jun 25;279(26):27816-23.
91. Ozren Bogdanović et al. DNA methylation and methyl-CpG binding proteins: developmental requirements and function. *Chromosoma*. 2009 Oct;118(5):549-65.
92. George V Avvakumov et al. Structural basis for recognition of hemi-methylated DNA by the SRA domain of human UHRF1. *Nature*. 2008 Oct 9;455(7214):822-5.
93. de Oliveira NFP et al. Can Global DNA Methylation Be Influenced by Polymorphisms in Genes Involved in Epigenetic Mechanisms? A Review. *Genes* 2024, 15, 1504.
94. Rahul M Kohli et al. TET enzymes, TDG and the dynamics of DNA demethylation. *Nature*. 2013 Oct 24;502(7472):472-9.
95. Hannon E et al. Characterizing genetic and environmental influences on variable DNA methylation using monozygotic and dizygotic twins. 2018. *Plos Genet*. 14:e1007544
96. Bird, A.P. CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, 1986.
97. Babenko, V.N. et al. Genomic landscape of CpG rich elements in human. *BMC Evol Biol*, 2017. 17(Suppl 1): p. 19.
98. Schulz, W.A. et al. Methylation of endogenous human retroelements in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2006. 310: p. 211-50.
99. Serge Saxonov et al. A Genome-Wide Analysis of CpG Dinucleotides in the Human Genome Distinguishes Two Distinct Classes of Promoters *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Vol. 103, No. 5 (Jan. 31, 2006), pp. 1412-1417
100. Michael Weber et al. Distribution, silencing potential and evolutionary impact of promoter DNA methylation in the human genome. *Nat Genet*. 2007 Apr;39(4):457-66.
101. Irizarry RA et al. The human colon cancer methylome shows similar hypo- and hypermethylation at conserved tissue-specific CpG island shores. *Nat Genet* 41 (2009):178–186.

102. Judith M Greer et al. The role of epigenetic mechanisms and processes in autoimmune disorders. *Biologics: Targets and Therapy* 2012;6 307–327
103. Li J et al. Insights Into the Role of DNA Methylation in Immune Cell Development and Autoimmune Disease. *Front. Cell Dev. Biol.* 9(2021):757318. .
104. Maltby VE et al. Genome-wide DNA methylation profiling of CD8⁺ T cells shows a distinct epigenetic signature to CD4⁺ T cells in multiple sclerosis patients. *Clin Epigenetics*. 2015;7:118.
105. Ehsan Razmara et al. Graves' disease: introducing new genetic and epigenetic contributors. *J Mol Endocrinol*. 2021 Feb;66(2):R33-R55.
106. Claire Prince et al. Investigating the impact of cigarette smoking behaviours on DNA methylation patterns in adolescence. *Human Molecular Genetics*,2019, Vol. 28, No. 1, 155–165
107. Tsaprouni et al. Cigarette smoking reduces DNA methylation levels at multiple genomic loci but the effect is partially reversible upon cessation. *Epigenetics*. 2014; 10:1382-96.
108. Cai TT et al. Genome-wide DNA methylation analysis in Graves' disease. *Genomics*. 2015;105(4):204-10.
109. Tiantian Cai et al. Identifying and Validating Differentially Methylated Regions in Newly Diagnosed Patients with Graves' Disease. *DNA Cell Biol*, 2021 Mar;40(3):482-490.
110. Kyrgios I et al. DNA methylation analysis within the IL2RA gene promoter in youth with autoimmune thyroid disease. *Eur J Clin Invest*. 2020 Mar;50(3):e13199.
111. Limbach M et al. Epigenetic profiling in CD4⁺ and CD8⁺ T cells from Graves' disease patients reveals changes in genes associated with T cell receptor signaling. *J Autoimmun*. 2016;67:46-56.
112. Nicole Lafontaine. Epigenome-wide Association Study Shows Differential DNA Methylation of MDC1, KLF9, and CUTA in Autoimmune Thyroid Disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2023 Nov 14;109(4):992–999.
113. Sally M Shalaby et al. Promoter methylation and expression of intercellular adhesion molecule 1 gene in blood of autoimmune thyroiditis patients. *Mol Biol Rep*. 2019 Oct;46(5):5345-5353.
114. Morita E et al. Methylation levels of the TNFA gene are different between Graves' and Hashimoto's diseases and influenced by the TNFA polymorphism. *Autoimmunity*. 2018 May;51(3):118-125.

115. Hidemi Hashimoto et al. Association of IFNG gene methylation in peripheral blood cells with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases *Cytokine* Volume 123, November 2019, 154770
116. Riku Kinoshita et al. Methylation levels of the IL10 gene in peripheral blood are related to the intractability of Graves' disease *Clin Immunol.* 2024 Jun;263:110196.
115. Guo Q et al. Alterations of Global DNA Methylation and DNA Methyltransferase Expression in T and B Lymphocytes from Patients with Newly Diagnosed Autoimmune Thyroid Diseases After Treatment: A Follow-Up Study. *Thyroid.* 2018 Mar;28(3):377-385.
118. Hirai N et al. Association of IL6 gene methylation in peripheral blood cells with the development and prognosis of autoimmune thyroid diseases. *Autoimmunity.*
119. Arakawa Y et al. Association of polymorphisms in DNMT1, DNMT3A, DNMT3B, MTHFR and MTRR genes with global DNA methylation levels and prognosis of autoimmune thyroid disease. *Clinical and experimental immunology* 2012 170(2) 194–201
120. Hiroki Ohtani et al. Effect of DNA methylation at the CTLA4 gene on the clinical status of autoimmune thyroid diseases. *Clin Immunol.* 2024 Oct;267:110338.
121. Cao JM et al. Epigenetics effect on pathogenesis of thyroid-associated Ophthalmopathy. *Int J Ophthalmol*, Vol. 14, No. 9, Sep.18, 2021
122. Xin Z et al. A genome-wide DNA methylation analysis in peripheral blood from patients identifies risk loci associated with Graves' orbitopathy. *J Endocrinol Invest.* 2018;41(6):719-27.
123. Xin et al. A Pathway Analysis Based on Genome-Wide DNA Methylation of Chinese Patients with Graves' Orbitopathy. *Biomed Res Int.* 2019; 2019: 9565794
124. Ting-Ting Shi et al. Identifying and Validating Genes with DNA Methylation Data in the Context of Biological Network for Chinese Patients with Graves' Orbitopathy *Int J Endocrinol.* 2019 Mar 14;2019:6212681.
125. Cai Y et al. Machine learning-based prediction of diagnostic markers for Graves' orbitopathy. *Endocrine.* 2023 Apr 15;81(2):277–289.
126. Sita Virakul 1 et al. Integrative Analysis of Proteomics and DNA Methylation in Orbital Fibroblasts From Graves' Ophthalmopathy. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2021 Feb 15;11:619989.
127. Dottore et al. Insights Into the Role of DNA Methylation and Gene Expression in Graves Orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2023 Apr 13;108(5):e160-e168
128. Weaver IC. Epigenetic effects of glucocorticoids. *Semin Fetal Neonatal Med.* 2009;14(3):143-50.

127. Cain DW et al. Immune regulation by glucocorticoids. *Nat Rev Immunol.* 2017;17(4):233-47.
130. Wan ES et al. Systemic Steroid Exposure Is Associated with Differential Methylation in Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2012 Dec;186(12):1248–1255.
131. Jing D et al. Lymphocyte-Specific Chromatin Accessibility Pre-determines Glucocorticoid Resistance in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* 2018 Dec 10;34(6):906-921
132. Somi Kim et al. CTCF as a multifunctional protein in genome regulation and gene expression. *Experimental & Molecular Medicine* volume 47, pagee166 (2015)
133. Hu Y et al. Function of regulatory T-cells improved by dexamethasone in Graves' disease. *Eur J Endocrinol.* 2012 Apr;166(4):641-6.
134. Chen et al. MiR-346 regulates CD4+CXCR5+ T cells in the pathogenesis of Graves' disease. *Endocrine* volume 49, pages752–760 (2015)
135. Zhu L et al. The critical role of m(6)A methylation in the pathogenesis of Graves' ophthalmopathy. *Eye Vis (Lond).* 2020 Dec 1;7(1):55.
136. Martínez-Hernández R et al. A MicroRNA signature for evaluation of risk and severity of autoimmune thyroid diseases. *J Clin Endocrinol Metab* 2018;103(3):1139-1150.
137. Otsu H et al. Intraindividual variation of microRNA expression levels in plasma and peripheral blood mononuclear cells and the associations of these levels with the pathogenesis of autoimmune thyroid diseases. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*
138. Shen L et al. Circulating microRNA predicts insensitivity to glucocorticoid therapy in Graves' ophthalmopathy. *Endocrine* 2015;49(2):445-456.
139. Ni Yan et al. Histone hypoacetylation and increased histone deacetylases in peripheral blood mononuclear cells from patients with Graves' disease. *Mol Cell Endocrinol.* 2015 Oct 15;414:143-7.
140. Spólnicka M, Gasperowicz P, Bednarczuk T, Płoski R et al. DNA methylation in ELOVL2 and C1orf132 correctly predicted chronological age of individuals from three disease groups. *Int J Legal Med.* 2018;132:1–11
141. Virdee S et al. "Real Life" Utility of the Graves' Ophthalmopathy-Quality of Life in a Multidisciplinary Thyroid Eye Disease Service. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* 2025 Apr 16.
142. Wreczycka K et al. Strategies for analyzing bisulfite sequencing data. *J Biotechnol.* 2017 Nov 10;261:105-115. doi: 10.1016/j.jbiotec.2017.08.007. Epub 2017 Aug 16. PMID: 28822795.

143. Sergey Kurdyukov et al. DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* (Basel). 2016 Jan 6;5(1):3.
144. Liu X et al. Beyond the base pairs: comparative genome-wide DNA methylation profiling across sequencing technologies. *Briefings in Bioinformatics*, 2024, 25(5), bbae440.
145. Gu H. et al. Preparation of reduced representation bisulfite sequencing libraries for genome-scale DNA methylation profiling. *Nat. Protoc.* 2011, 6, 468-481.
146. Doherty R et al. Exploring genome wide bisulfite sequencing for DNA methylation analysis in livestock: a technical assessment. *Front Genet.* 2014 May 13;5:126.
147. Seiler Vellame D et al. Characterizing the properties of bisulfite sequencing data: maximizing power and sensitivity to identify between-group differences in DNA methylation. *BMC Genomics*. 2021 Jun 15;22(1):446.
148. Ziller MJ et al. Coverage recommendations for methylation analysis by whole-genome bisulfite sequencing. *Nat Methods*. 2015 Mar;12(3):230-2, 1 p following 232.
149. van Gurp TP et al. epiGBS: reference-free reduced representation bisulfite sequencing. *Nat Methods*. 2016 Apr;13(4):322-4.
150. Schuh A et al. Presentation of Graves' orbitopathy within European Group On Graves' Orbitopathy (EUGOGO) centres from 2012 to 2019 (PREGO III). *Br J Ophthalmol.* 2024 Jan 29;108(2):294-300.
- 151 Simon M et al. Epidemiology of Childhood Hyperthyroidism in France: A Nationwide Population-Based Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2018 Aug 1;103(8):2980-2987..
- 152 Hansen M et al. Characterizing the Interplay of Lymphocytes in Graves' Disease. *Int J Mol Sci.* 2023 Apr 6;24(7):6835.
153. Zhang Z et al. A comprehensive epigenetic network can influence the occurrence of thyroid-associated ophthalmopathy by affecting immune and inflammatory response. *Sci Rep.* 2024 Jun 12;14(1):13545.
154. Fang S et al. Mechanisms That Underly T Cell Immunity in Graves' Orbitopathy. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021 Apr 1;12:648732.

155. Zhang L et al. Reversal of Pathological Features of Graves' Orbitopathy by Activation of Forkhead Transcription Factors, FOXOs. *J Clin Endocrinol Metab.* 2016 Jan;101(1):114-22.
156. Park SH et al. Role of Lysyl Oxidase-Like Protein 3 in the Pathogenesis of Graves' Orbitopathy in Orbital Fibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2024 Nov 4;65(13):33.
157. Cui X et al. A review of TSHR- and IGF-1R-related pathogenesis and treatment of Graves' orbitopathy. *Front Immunol.* 2023 Jan 19;14:1062045. doi: 10.3389/fimmu.2023.1062045.
158. Murdock J et al. The role of IL-6 in thyroid eye disease: an update on emerging treatments. *Front Ophthalmol (Lausanne).* 2025 Apr 14;5:1544436.
159. Millrine D et al. Making sense of IL-6 signalling cues in pathophysiology. *FEBS Lett.* 2022 Mar;596(5):567-588.
160. Duarte AF et al. Efficiency and safety of tocilizumab for the treatment of thyroid eye disease: A systematic review. *Ophthalmic Plast Reconstr Surg.* (2024) 40:367–73.
161. Sun A et al. The efficacy and safety of intravenous tocilizumab to treat Graves' ophthalmopathy: A systematic review and single-arm meta-analysis. *J Clin Endocrinol Metab.* (2024) 110(3):e886–96.
162. Smith TJ. Understanding Pathogenesis Intersects With Effective Treatment for Thyroid Eye Disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022 Aug 8;107(Suppl_1):S13-S26
163. Douglas RS et al. Teprotumumab for the treatment of active thyroid eye disease. *New England Journal of Medicine* 2020 382 341–352.
164. Lee SM et al. Effective clearance of rituximab-resistant tumor cells by breaking the mirror-symmetry of immunoglobulin G and simultaneous binding to CD55 and CD20. *Sci Rep.* 2023 Oct 25;13(1):18275.
165. Kang L et al. Critical Role of CD55 in Controlling Wound Healing. *J Immunol.* 2024 Apr 1;212(7):1142-1149.
166. Park JH et al. Effect of CD274 (PD-L1) overexpression on survival outcomes in 10 specific cancers: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Pathol.* 2023 Jul;76(7):450-456.
167. Zheng S et al. The untold story of CD82: Exploring its non-canonical roles in cancer. *Pathol Res Pract.* 2025 Jun;270:155979.

168. Rauber Set al. CD200⁺ fibroblasts form a pro-resolving mesenchymal network in arthritis. *Nat Immunol.* 2024 Apr;25(4):682-692.
169. Smith TJ. Potential Roles of CD34⁺ Fibrocytes Masquerading as Orbital Fibroblasts in Thyroid-Associated Ophthalmopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2019 Feb 1;104(2):581-594.
170. Basak M et al. Peripheral blood mononuclear cells - Can they provide a clue to the pathogenesis of Graves' Orbitopathy? *Endocrine.* 2022 Feb;75(2):447-455.
171. Fang S et al. Regulation of Orbital Fibrosis and Adipogenesis by Pathogenic Th17 Cells in Graves Orbitopathy. *J Clin Endocrinol Metab.* 2017 Nov 1;102(11):4273-4283.
172. Khan A et al. Solute carriers: The gatekeepers of metabolism. *Cell.* 2025 Feb 20;188(4):869-884.
173. Kumar V et al. Dual Specific Phosphatase 14 Deletion Rescues Retinal Ganglion Cells and Optic Nerve Axons after Experimental Anterior Ischemic Optic Neuropathy. *Curr Eye Res.* 2021 May;46(5):710-718.
174. Hu YF et al. Preliminary evidence of the association between DNAm and orbital volumetry in GO. *Endocr Connect.* 2020 Jul;9(7):617-626.
175. Wei Q et al. Structure and function of DEAH-box helicase 32 and its role in cancer. *Oncol Lett.* 2021 May;21(5):382.
176. Abdelhaleem M et al. DHX32 expression suggests a role in lymphocyte differentiation. *Anticancer Res.* 2005 Jul-Aug;25(4):2645-8.
177. Chen K et al. Single-cell RNA-seq reveals dynamic change in tumor microenvironment during pancreatic ductal adenocarcinoma malignant progression. *EBioMedicine.* 2021 Apr;66:103315.
178. Glassman CR et al. Structural basis for IL-12 and IL-23 receptor sharing reveals a gateway for shaping actions on T versus NK cells. *Cell.* 2021 Feb 18;184(4):983-999.e24.
179. Zeiträg J et al. Inflammatory and tolerogenic dendritic cells and T lymphocytes in Graves' thyroidal and orbital disease. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2025 Jun;1871(5):167747.
180. Torimoto K et al. Comprehensive immunophenotypic analysis reveals the pathological involvement of Th17 cells in Graves' disease. *Sci Rep.* 2022 Oct 7;12(1):16880

181. Eiza N et al. Soluble CD72, is a T-cell activator probably via binding to CD6 in homeostasis and autoimmunity. *Front Immunol*. 2024 Jul 4;15:1367120.
182. Müller L et al. Blood methylation pattern reflects epigenetic remodelling in adipose tissue after bariatric surgery. *EBioMedicine*. 2024 Aug;106:105242.
183. Hou W et al. CD44 is a prognostic biomarker and correlated with immune infiltrates in gastric cancer. *BMC Med Genomics*. 2022 Oct 31;15(1):225.
184. Xu X et al. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Biosci Rep*. 2019 Jan 18;39(1):BSR20180992.
185. Rim EY et al. The Wnt Pathway: From Signaling Mechanisms to Synthetic Modulators. *Annu Rev Biochem*. 2022 Jun 21;91:571-598.
186. Kim HR et al. Cell-permeable transgelin-2 as a potent therapeutic for dendritic cell-based cancer immunotherapy. *J Hematol Oncol*. 2021 Mar 17;14(1):43.
187. Cheng X et al. TAGLN-RhoA/ROCK2-SLC2A3-mediated Mechano-metabolic Axis Promotes Skin Fibrosis. *Int J Biol Sci*. 2025 Jan 1;21(2):658-670.
188. Dashti M et al. *ONECUT1* variants beyond type 1 and type 2 diabetes: exploring clinical diversity and epigenetic associations in Arab cohorts. *Front Genet*. 2023 Oct 24;14:1254833.
189. Wokasch AS et al. CUTting through the distance: A disease-relevant long-range *ONECUT1* enhancer. *Cell Rep*. 2024 Nov 26;43(11):114897.
190. Nagel S et al. NKL homeobox gene activities in B-cell development and lymphomas. *PLoS One*. 2018 Oct 11;13(10):e0205537.
191. Lister NC et al. Pseudogenes: A Novel Source of Trans-Acting Antisense RNAs. *Methods Mol Biol*. 2021;2324:219-236.
192. Gerra MC et al. DNA Methylation Changes in Fibromyalgia Suggest the Role of the Immune-Inflammatory Response and Central Sensitization. *J Clin Med*. 2021 Oct 27;10(21):4992
193. Benincasa G et al. Association Between Circulating CD4+ T Cell Methylation Signatures of Network-Oriented *SOCS3* Gene and Hemodynamics in Patients Suffering Pulmonary Arterial Hypertension. *J Cardiovasc Transl Res*. 2023 Feb;16(1):17-30.

194. Król A et al. Definitive treatment of Graves' disease in children and adolescents. *Endokrynol Pol.* 2021;72(6):661-665.
195. Pahkuri S et al. DNA methylation differences within INS, PTPN22 and IL2RA promoters in lymphocyte subsets in children with type 1 diabetes and controls. *Autoimmunity.* 2023 Dec;56(1):2259118.
196. Alvarado-Cruz I et al. Environmental Epigenetic Changes, as Risk Factors for the Development of Diseases in Children: A Systematic Review. *Ann Glob Health.* 2018 Jul 27;84(2):212-224.
197. Lim U et al. DNA Methylation as a Biomarker of Aging in Epidemiologic Studies. *Methods Mol Biol.* 2018;1856:219-231.
198. Hawe JS et al. Genetic variation influencing DNA methylation provides insights into molecular mechanisms regulating genomic function. *Nat Genet.* 2022 Jan;54(1):18-29.
199. Kaur G et al. A systematic review of smoking-related epigenetic alterations. *Arch Toxicol.* 2019 Oct;93(10):2715-2740.
200. Hannon E et al. Characterizing genetic and environmental influences on variable DNA methylation using monozygotic and dizygotic twins. *PLoS Genet.* 2018 Aug 9;14(8):e1007544.
201. Tsai PC et al. Smoking induces coordinated DNA methylation and gene expression changes in adipose tissue with consequences for metabolic health. *Clin Epigenetics.* 2018 Oct 20;10(1):126.
202. Fa S et al. Assessment of global DNA methylation in the first trimester fetal tissues exposed to maternal cigarette smoking. *Clin Epigenetics.* 2016 Nov 25;8:128.
203. Hulls PM et al. DNA methylation signature of passive smoke exposure is less pronounced than active smoking: The Understanding Society study. *Environ Res.* 2020 Nov;190:109971.
204. Christiansen C et al. Novel DNA methylation signatures of tobacco smoking with trans-ethnic effects. *Clin Epigenetics.* 2021 Feb 16;13(1):36.
205. Guida F et al. Dynamics of smoking-induced genome-wide methylation changes with time since smoking cessation. *Hum Mol Genet.* 2015 Apr 15;24(8):2349-59.

206. Ren B et al. Effect of different iodine levels on the DNA methylation of PRKAA2, ITGA6, THEM4 and PRL genes in PI3K-AKT signaling pathway and population-based validation from autoimmune thyroiditis patients. *Eur J Nutr.* 2022 Oct;61(7):3571-3583.
207. Chen Y et al. DNA Methylation of KLRC1 and KLRC3 in Autoimmune Thyroiditis: Perspective of Different Water Iodine Exposure. *Biomed Environ Sci.* 2024 Sep 20;37(9):1044-1055.
208. Shen H et al. The whole blood DNA methylation of *RAB8A* and *RAP1A* in autoimmune thyroiditis: evidence and validation of iodine exposure in a population from different water iodine areas. *Int J Environ Health Res.* 2024 Aug;34(8):2923-2935.
209. Zhou Z et al. Effects of different iodine levels on the DNA methylation of intrinsic apoptosis-associated genes and analysis of gene-environment interactions in patients with autoimmune thyroiditis. *Br J Nutr.* 2023 Dec 28;130(12):2039-2052.
210. Trofimiuk-Müldner M et al. Current iodine nutrition status in Poland (2017): is the Polish model of obligatory iodine prophylaxis able to eliminate iodine deficiency in the population? *Public Health Nutr.* 2020 Oct;23(14):2467-2477.
211. Wenqian C et al. Genome-wide DNA methylation analysis of Hashimoto's thyroiditis during pregnancy. *FEBS Open Bio.* 2020 Dec;10(12):2780-2790.
212. Sadahiro R et al. Major surgery induces acute changes in measured DNA methylation associated with immune response pathways. *Sci Rep.* 2020 Apr 1;10(1):5743.
213. Fischer MA et al. Longitudinal profiling in patients undergoing cardiac surgery reveals postoperative changes in DNA methylation. *Clin Epigenetics.* 2022 Dec 30;14(1):195.
214. Müller L et al. Blood methylation pattern reflects epigenetic remodelling in adipose tissue after bariatric surgery. *EBioMedicine.* 2024 Aug;106:105242.
215. Xiong HY et al. Epigenetic Landscapes of Pain: DNA Methylation Dynamics in Chronic Pain. *Int J Mol Sci.* 2024 Jul 30;25(15):8324.
216. Smith TJ et al. How patients experience thyroid eye disease. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Nov 9;14:1283374.

217. Ramesh S et al. IRIS RESEARCH ANALYTIC CENTER CONSORTIUM. Thyroid Eye Disease and its Vision-Threatening Manifestations in the Academy IRIS Registry: 2014-2018. *Am J Ophthalmol*. 2023 Sep;253:74-85.
218. hu Na et al. China Novel Coronavirus Investigating and Research Team. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020; 382(8): 727–733
219. Liu Q et al. Novel enzyme-based reduced representation method for DNA methylation profiling with low inputs. *Nucleic Acids Res*. 2025 Jun 20;53(12):gkaf558.
220. Jia WY et al. Effects of glucocorticoids on leukocytes: Genomic and non-genomic mechanisms. *World J Clin Cases*. 2022 Jul 26;10(21):7187-7194.
221. Ronchetti S et al. How Glucocorticoids Affect the Neutrophil Life. *Int J Mol Sci*. 2018 Dec 17;19(12):4090.
222. Zang S et al. Steroids and the immune response in Graves orbitopathy. *Immunol Endocr Metab Agents Med Chem* 2011; 11: 90–98.
223. Längericht J et al. Glucocorticoids in Graves' orbitopathy: mechanisms of action and clinical application. *Ther Adv Endocrinol Metab*. 2020 Dec 14;11:2042018820958335.
224. Li K et al. Age-dependent changes of total and differential white blood cell counts in children. *Chin Med J (Engl)*. 2020 Aug 20;133(16):1900-1907.
225. Künzli M et al. CD4+ T cell memory. *Nat Immunol*. 2023 Jun;24(6):903-914.
226. Gallo D et al. Immunological Drivers in Graves' Disease: NK Cells as a Master Switcher. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020 Jul 17;11:406.
227. Starosz A et al. Evaluating the Role of Circulating Dendritic Cells in Methimazole-Treated Pediatric Graves' Disease Patients. *Genes (Basel)*. 2021 Jan 26;12(2):164.
228. Longtin A et al. Cost-effective solutions for high-throughput enzymatic DNA methylation sequencing. *PLoS Genet*. 2025 May 22;21(5):e1011667.
229. Fóthi Á et al. Improve-RRBS: a novel tool to correct the 3' trimming of reduced representation sequencing reads. *Bioinform Adv*. 2024 May 24;4(1):vbae076.

230. Bock C et al. Quantitative comparison of genome-wide DNA methylation mapping technologies. *Nat Biotechnol.* 2010 Oct;28(10):1106-14.
231. Beck D et al. "Genome-wide CpG density and DNA methylation analysis method (MeDIP, RRBS, and WGBS) comparisons." *Epigenetics* 17.5 (2022): 518-530.
232. Zhou Z et al. Genome-wide DNA methylation pattern in whole blood of patients with Hashimoto thyroiditis. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2023 Nov 24;14:1259903.

XII Opinia Komisji Bioetycznej lub Etycznej



Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym

Tel.: 022/ 57 - 20 -303
Fax: 022/ 57 - 20 -165

ul. Żwirki i Wigury nr 61
02-091 Warszawa

e-mail: komisja.bioetyczna@wum.edu.pl
www.komisja-bioetyczna.wum.edu.pl

KB/¹⁵¹...../2019

Komisja Bioetyczna przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym
w dniu 07 października 2019 r. po zapoznaniu się z wnioskiem:

Lek. Mikołaj Radziszewski
Katedra i Klinika Chorób Wewnętrznych i Endokrynologii
ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

dotyczącym: wyrażenia opinii w sprawie badania pt : „ Zaburzenia metylacji całogenomowej
w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej u pacjentów z chorobą Gravesa i Basedowa.”

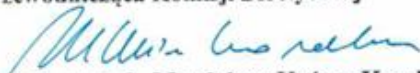
wyraża następującą opinię

- stwierdza, że jest ono dopuszczalne i zgodne z zasadami naukowo-etycznymi*.
- ~~—stwierdza, że jest ono niedopuszczalne i niezgodne z zasadami naukowo-etycznymi.*~~

Uwagi Komisji – *verte*

Komisja działa na podstawie art.29 ustawy z dnia 5.12.1996r. o zawodzie lekarza /Dz.U.nr 28/97 poz.152 wraz z późn.zm./, zarządzenia MZiOS z dn.11.05.1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych /Dz.U.nr 47 poz.480/, Ustawy prawo farmaceutyczne z dnia 6 września 2001r. (Dz.U.Nr 126, poz. 1381 z późn. zm.) oraz Zarządzenie nr 56/2007 z dnia 15 października 2007r. w sprawie działania Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym /Regulamin Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym/.
Komisja działa zgodnie z zasadami GCP .

Przewodnicząca Komisji Bioetycznej


Prof. dr hab. n. med. Magdalena Kuźma-Kozakiewicz

*niepotrzebne skreślić