

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 dożylny puls 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 antygeny – 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 bisulfidowe (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.