



**UNIWERSYTET
RZESZOWSKI**
WYDZIAŁ MEDYCZNY

mgr inż. Marek Cieśla

**Ocena metylacji DNA i polimorfizmów wybranych genów oraz ekspresji
wyselekcjonowanych mikro-RNA u chorych na reumatoidalne zapalenie
stawów**

ROZPRAWA DOKTORSKA

Promotor pracy:

Prof. dr hab. n med. Dorota Darmochwał-Kolarz

Promotor pomocniczy:

Dr n. med. Bogdan Kolarz

Rzeszów 2019

Pani prof. dr hab. n. med. Dorocie Darmochwał-Kolarz

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania

za poświęcony czas oraz opiekę na każdym etapie

przygotowywania niniejszej rozprawy

Panu dr n. med. Bogdanowi Kolarzowi

Składam serdeczne podziękowania za cenne wskazówki

oraz opiekę merytoryczną

SPIS TREŚCI

SPIS TREŚCI.....	3
WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW	6
I. WSTĘP	9
1.1. Reumatoidalne zapalenie stawów	9
1.2. Epigenetyczna i genetyczna regulacja ekspresji genów	10
1.2.1. Wpływ polimorfizmów na ekspresję genów	10
1.2.2. Wpływ metylacji DNA na regulację ekspresji genów	10
1.2.3. Wpływ mikro-RNA na regulację ekspresji	11
1.3. Charakterystyka genu <i>IRF5</i> i wybranych polimorfizmów	13
1.4. Charakterystyka genu <i>IL6R</i> i wybranych polimorfizmów	15
1.5. Charakterystyka genu <i>SOC3</i> i wybranych polimorfizmów	16
1.6. miR-22	18
1.7. miR-221	19
II. CELE PRACY	20
III. MATERIAŁY I METODY	21
3.1. Charakterystyka grupy badanej	21
3.2. Analiza <i>in-silico</i> zależności pomiędzy badanymi genami a badanymi miRami	21
3.3. Analiza rejonów do badania metylacji DNA	22
3.4. Analizowane parametry laboratoryjne i molekularne	23

3.5. Metody	24
3.5.1. Izolacja genomowego DNA	24
3.5.2. Reakcja chemicznej konwersji DNA odczynnikiem wodorosiarczynowym	24
3.5.3. Ocena metylacji rejonów promotorowych	24
3.5.4. Oznaczenia polimorfizmów	30
3.5.5. Oznaczenie ekspresji mikro-RNA	30
3.5.6. Wykaz odczynników nie ujętych we wcześniejszej części metodyki	32
3.5.7 Analiza statystyczna	32
IV. WYNIKI	35
4.1. ANALIZA METYLACJI	35
4.1.1. <i>IRF5</i>	36
4.1.2. <i>SOCS3</i> oraz <i>IL6R</i>	37
4.2. GENOTYPOWANIE	37
4.2.1. <i>IRF5</i>	38
4.2.2. <i>SOCS3</i>	42
4.2.3. <i>IL6R</i>	46
4.3. EKSPRESJA MIKRO-RNA	50
4.3.1. MiR-22	50
4.3.2. MIR-221	54
DYSKUSJA	55
<i>IRF5</i>	55
<i>SOCS3</i> oraz <i>IL6R</i>	58

Ekspresja miR-22 oraz miR-221	62
WNIOSKI	65
SPIS TABEL	66
SPIS RYCIN	67
PIŚMIENNICTWO	68
STRESZCZENIE	77
SUMMARY	79

WYKAZ UŻYWANYCH SKRÓTÓW

5mC – 5-metylocytozyna

ACPA – przeciwciała przeciwko cyklicznemu, cytrulinowanemu peptydowi (*ang. anti-citrullinated protein antibodies*)

ACR- Amerykańskie Kolegium Reumatologii (*ang. American College of Rheumatology*)

ACTB – gen β -aktyny

AGO – białko Argonauta

APPs – białka ostrej fazy (*ang. the acute phase proteins*)

BF – czynnik Bayesa

cDMARD – klasyczne leki modyfikujące przebieg choroby (*ang. Classical Disease-Modifying Antirheumatic Drugs*)

cDNA – komplementarne DNA utworzone na matrycy RNA

CI – 95% przedział ufności

CMV – cytomegalowirus

CRP – białko c-reaktywne

CYR61 – białko 61 bogate w cysteinę indukujące angiogenezę (*ang. cysteine rich angiogenic inducer*)

DAS-28 – skala aktywności choroby

DMP – odmiennie zmetylowane pozycje (*ang. differentially methylated positions*)

DNA - kwas deoksyrybonukleinowy

DNMT1 – metylotransferaza DNA typu I

EBC – wirus Epstein-Barr'a

EULAR – Europejska Liga Przeciwko Reumatyzmowi (*ang. European League Against Rheumatism*)

EWAS – badanie asocjacyjne w skali epigenomu

GWAS – badanie asocjacyjne w skali genomu

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C

HLA – ludzkie antygeny leukocytarne

IL – interleukina

IL6R – receptor dla interleukiny 6

IRF5 – czynnik V regulowany interferonem

JAK – kinaza Janusowa

LD – nierównowaga sprzężeń polimorfizmów (*ang. linkage disequilibrium*)

MBP – białka przylaczające się do zmetylowanych sekwencji DNA (*ang. methyl-binding proteins*)

MIP – białka zapalne makrofagów (*ang. macrophage inflammatory proteins*)

miR – mikro-RNA

miRISC – kompleks wyciszający ekspresję genu utworzony z mikro-RNA i mRNA

MMP – metaloproteinaza

MSP – PCR specyficzny do zmetylowanych sekwencji DNA

NTC – kontrola bez matrycy DNA

OASF – fibroblasty pochodzące od pacjentów z zapaleniem kości

OD – iloraz szans (*ang. odds ratio*)

PABPs – białka wiążące sekwencje poli(A)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy

RANTES – czynnik regulowany przez aktywację, ulegający ekspresji i wydzielaniu przez prawidłowe limfocyty T

RASF – fibroblasty pochodzące od pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów

Real-time PCR – PCR w czasie rzeczywistym

RF – czynnik reumatoidalny

RNA – kwas rybonukleinowy

RPKM – odczyt w tysiąca zasad na milion

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

SLE – toczeń rumieniowaty układowy

SNP – polimorfizm typu pojedynczego nukleotydu

SOCS3 – supresor III aktywacji cytokin

SS – zespół Sjörgena

TLR – receptory Toll podobne

T_m – temperatura topnienia startera

TNF- α – czynnik martwicy nowotworów alfa

TSS – miejsce rozpoczęcia transkrypcji (*ang. transcription start site*)

UTR – rejon nie podlegający translacji

VAS PGA – wizualna skala analogowa wykonana przez pacjenta (*ang. visual analog scale patient global assessments*)

VAS PhGA – wizualna skala analogowa wykonana przez lekarza (*ang. visual analog scale physician global assessments*)

VEGF – czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (*ang. vascular endothelial growth factor*)

I. WSTĘP

1.1. Reumatoidalne zapalenie stawów

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest przewlekłą chorobą autoimmunologiczną dotykającą około 1% populacji ogólnej, w przebiegu której dochodzi do obrzęku stawów, ich bolesności oraz degeneracji błony maziowej, co prowadzi do niepełnosprawności i przedwczesnej śmiertelności [1, 2]. Etiopatogeneza choroby obejmuje głównie trzy obszary: autoimmunizację, ogólnoustrojowy stan zapalny oraz destrukcję stawów. Autoimmunizacja charakteryzuje się produkcją specyficznych przeciwciał przeciwko własnym immunoglobulinom (Ig) w klasie IgG, znanych jako czynnik reumatoidalny (RF, *ang. rheumatoid factor*) lub specyficznych przeciwko cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi (ACPA, *ang. anti-citrullinated protein antibodies*) [3]. W roku 2010 Amerykańskie Kolegium Reumatologii (ACR, *ang. American College of Rheumatology*) wraz Europejską Ligą przeciwko Reumatyzmowi (EULAR, *ang. European League Against Rheumatism*) uaktualniło wcześniejsze kryteria z roku 1987 dotyczące rozpoznawania RZSu przyjmując m.in. oba markery serologiczne do kryteriów diagnostycznych [1, 4]. Pomimo wprowadzenia diagnostyki serologicznej, wciąż rozpoznanie choroby na jej wstępnym etapie pozostaje problematyczne, gdyż u znacznego odsetka chorych w początkowej fazie choroby nie stwierdza się zmian radiologicznych (około 50% chorych) oraz brak jest podwyższonego miana RF (około 30 % chorych) [4]. Istotną kwestią jest czułość oraz swoistość diagnostyczna markerów serologicznych, która dla RF wynosi odpowiednio 65% i 98% [[1].

Współistnienie środowiskowych i genetycznych czynników ryzyka zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju choroby. Czynniki ryzyka można podzielić na dwie grupy: czynniki środowiskowe oraz czynniki genetyczne. Do pierwszych można zaliczyć palenie tytoniu oraz infekcje bakteryjne i wirusowe. Mikroorganizmy zwiększające ryzyko rozwoju RZSu to m.in.: *Porphyromonas gingivalis*, *Proteus mirabilis*, pałeczkę coli, wirus Epstein-Barr'a (EBV), cytomegalowirus (CMV) [5]. Do drugich zalicza się m.in. nosicielstwo alleli ryzyka w układzie HLA (*ang. human leukocyte antigen*), głównie dotyczy to pacjentów RF lub ACPA pozytywnych w locus *HLA-DRB1*, ale może obejmować również inne geny. Pomimo dużej wiedzy o czynnikach ryzyka molekularny mechanizm choroby wciąż nie jest do końca zrozumiały [2].

1.2. Epigenetyczna i genetyczna regulacja ekspresji genów

1.2.1. Wpływ polimorfizmów na ekspresję genów

Wpływ polimorfizmów lub mutacji punktowych na sekwencję białka i jego funkcję został dobrze poznany na przykładzie wielu chorób dziedzicznych [6], jednak wpływ polimorfizmów typu pojedynczego nukleotydu (SNP, *ang. a single nucleotide polymorphism*) na ekspresję genów jako mechanizmu regulacyjnego wciąż nie jest do końca jasny. Polimorfizmy można podzielić na *cis* działające SNP (*cis*-SNP) lub *trans* działające SNP (*trans*-SNP). *Cis*-SNP są to warianty położone w rejonach regulatorowych genów, takich jak promotory czy wzmacniacze ekspresji, które znajdują się przeważnie po stronie 5' genu przed miejscem rozpoczęcia transkrypcji, ale mogą również leżeć nawet kilka set tysięcy par zasad dalej. Elementy *trans* natomiast mogą leżeć w dowolnym miejscu genomu, często na innym chromosomie. Pod względem regulatorowym elementy *cis* wpływają na powstawanie transkryptu lub jego stabilność w sposób allelo-specyficzny, natomiast elementy *trans* oddziałują na oba allele [7].

1.2.2. Wpływ metylacji DNA na regulację ekspresji genów

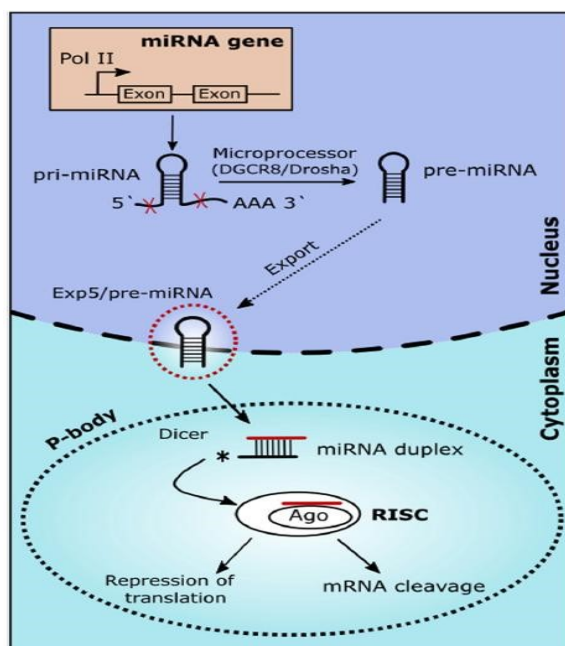
Metylacja DNA jest najbardziej poznany mechanizm epigenetyczny i prowadzi do stabilnego i długiego wyciszenia ekspresji genów. Występowanie zmetylowanej pary dinukleotydów CG, a dokładniej 5-metylocytozyny (5mC) wydaje się być najczęściej badany proces epigenetyczny regulujący ekspresję genomów eukariotycznych [8,9]. Metylacja DNA może dotyczyć nawet 80% sekwencji genomowego DNA, które w większości zlokalizowane są w rejonach promotorowych genów tworzące długie sekwencje bogate w pary GC zwane wyspami CpG. Enzymy katalizujące syntezę 5mC należą do grupy metylotransferaz, wśród których metylotransferaza DNA typu I (DNMT1) oraz metylotransferazy typu III należą do najbardziej istotnych. DNMT1 odpowiada za utrzymanie stałego poziomu metylacji podczas podziału komórki, natomiast druga grupa enzymów odpowiada za zmiany wzoru metylacji podczas wczesnego życia zarodkowego. Wpływ metylacji DNA na ekspresję genów może odbywać się dwukierunkowo. Z jednej strony zmetylowane sekwencje mogą utrudniać wiązanie się do DNA czynników transkrypcyjnych lub innych białek towarzyszących procesowi inicjacji transkrypcji. Drugim sposobem wyciszenia ekspresji jest rozpoznawanie charakterystycznego wzoru metylacji przez białka MBP (*ang. methyl-binding proteins*), które indukują przyłączenie się kompleksu represora, zawierającego m.in. deacylazę histonów, która powoduje kondensację chromatyny i zahamowanie ekspresji genów [6]. Jak wspomniano wcześniej metylacja DNA dotyczy w

znaczącym stopniu rejonów promotorowych, które mogą obejmować sekwencje wiązania czynników transkrypcyjnych lub sekwencje tzw. wzmacniaczy transkrypcji (*ang. enhancers*). Ponadto, metylacja DNA występuje również poza rejonem promotorowym w rejonach ubogich w geny, nieaktywnych transkrypcyjnie, które określane są jako częściowo metylowane domeny (*ang. partially methylated domains*) [8, 10]. Innym przykładem takich niekodujących regionów mogą być wbudowane wtórnie do DNA sekwencje retrowirusów czy transpozony. Metylacja tych elementów zapobiega ich ekspresji [6].

1.2.3. Wpływ mikro-RNA na regulację ekspresji

Mikro-RNA (miR) są to krótkie, około 22 nukleotydowe jednoniciowe RNA, które regulują ekspresję mRNA w sposób post-transkrypcyjny. Regulacja negatywna może odbywać się poprzez zahamowanie translacji lub bezpośrednią degradację mRNA. Regulacja pozytywna może być skutkiem tzn. zwiększenia szybkości procesu translacji [11]. Szacuje się, że 30% genów, które odpowiadają za kodowanie białek może być regulowane przez miRy [12, 13]. Wyciszenie ekspresji mRNA przez miRy polega na ich przyłączeniu się do rejonu 3' UTR (*ang. untranslated region*). Samo wiązanie miRów do sekwencji docelowego mRNA może przebiegać z pełnym dopasowaniem, taki model obserwuje się u roślin i prowadzi do szybkiej degradacji transkryptu przy pomocy aktywności rybonukleazowej białka Argonauty (AGO) [13]. U większości zwierząt (*Metazoa*- zwierzęta wielokomórkowe) przyłączanie miRów do mRNA przebiega z niepełnym dopasowaniem poprzez tzw. sekwencję seed'ową (*ang. seed sequence*). Sekwencja ta składa się z około 6 nukleotydów, zlokalizowana jest od strony 5' miRa i jest komplementarna do rejonu 3' UTR wyciskanego mRNA. Po przyłączeniu się miR może wchodzić w interakcję z danym mRNA, powodując zahamowanie ekspresji. Interakcja ta może odbywać się poprzez dwie drogi: degradację transkryptu lub blokowanie translacji [11, 13]. Schematyczne mechanizm powstawania miRów oraz wyciszania ekspresji genów przedstawia Rycina 1.[14]

Rycina 1. Schematyczny proces syntezy miRów i ich oddziaływania na transkrypty. Rycina pochodzi z publikacji Churov i współ. [14]



Degradacja transkryptów w większości przypadków zachodzi poprzez deadenylację. Sekwencja poli(A) na końcu 3' mRNA występuje u większości eukariotów, których mRNA koduje białka, oczywiście z pewnymi wyjątkami, które obejmują np. część mRNA kodujących białka histonowe. Sekwencja poli(A) u ssaków może mieć nawet 250 nukleotydów i wpływa na ekspresję poprzez stabilizację transkryptu i kontrolę wydajności ekspresji. Sam proces degradacji przebiega w cytoplazmie komórki i jest związany z występowaniem białek wiążących poli(A) (PABPs, *ang. poli(A) binding proteins*). Białka te po związaniu się ze sekwencją docelową wchodzą w interakcję z eukariotycznym czynnikiem inicjacji translacji 4F (eIF4F), który wiąże się ze strukturą 5' kapu mRNA. W wyniku ich wzajemnego oddziaływania następuje cyklizacja mRNA, która jest procesem kontrolnym – tylko tak ukształtowane mRNA mogą ulegać translacji. Ponad to białka PABPs wraz z eIF4F mobilizują małą podjednostkę rybosomu do promocji inicjacji translacji, tak więc skrócenie sekwencji poli(A) lub jest całkowite usunięcie powoduje obniżenie wydajności tego procesu.

Deadenylacja jako mechanizm wyciszający ekspresję genów przebiega wskutek przyłączenia się do sekwencji seed'owej komplementarnego mikro-RNA, co prowadzi m.in. do przyłączeniu AGO oraz GW182/TNRC6. Zostaje utworzony kompleks miRISC (*ang. miRNA-loaded RNA-induced silencing complex*), który jest odpowiedzialny za wyciszanie mRNA. Aby jednak doszło do wyciszenia ekspresji potrzeba zainicjowania deadenylacji

RNA. MiRISC indukuje przyłączanie kompleksu Ccr4-Not, który jest odpowiedzialny za rozpoczęcie deadenylacji. Kompleks Ccr4-Not posiada aktywność egzonukleazy 3' → 5', jest konserwatywny wśród eukariotów. Na przykładzie drożdży rdzeń kompleksu składa się z dwóch deadenylaz: Ccr4p oraz Pop2p/Caf1p, które otoczone są białkami Not oraz białkami Caf40p oraz Caf130p. W komórkach ludzkich występują dwie izoformy zarówno dla Ccr4 (CNOT6/hCcr4a oraz CNOT6L/hCcr4b) jak i dla Pop2 (CNOT7/hCaf1 oraz CNOT8/hPop2). Ze względu na to, że wymienione izoformy posiadają odmienną specyficzność substratową możliwe jest tworzenie różnych wariantów kompleksów Ccr4-Not. Deadenylacja indukowana przyłączeniem miR wymaga jednoczesnej aktywności egzonukleazowej Pop2/Caf1 oraz interakcji pomiędzy białkami AGO oraz GW182/TNRC6. Związanie białek GW182/TNRC6 do mRNA powoduje rekrutację kompleksu Ccr4-Not i w następstwie rozpoczyna deadenylację, która jest niezależna od AGO i miR. Jednak, aby cały proces mógł się odbyć potrzebna jest również interakcja pomiędzy C-terminalną domeną GW182/TNRC6 oraz białkami PABPs, prowadzącą do destabilizacji kompleksu PABP-poli(A), która skutkuje promocją deadenylacji. Dokładny mechanizm tego procesu nie został jednak do końca poznany^[15].

1.3. Charakterystyka genu *IRF5* i wybranych polimorfizmów

Odnosząc się do bazy genomowej ENSEMBL ^[16] gen czynnika V regulowanego interferonem (*IRF5*, ang. *interferon regulatory factor 5*) jest zlokalizowany na chromosomie 7 w pozycji: 128577976-128590089 na nici sensownej w odniesieniu do sekwencji referencyjnej NC_000007.13, składa się z 9 eksonów (NG_012306.1). *IRF5* jest członkiem rodziny białek z rodzaju czynników transkrypcyjnych, które charakteryzują się konserwatywną domeną N-terminalną składającą się z powtórzeń tryptofanu, która jest odpowiedzialna za wiązanie DNA. Ze względu na alternatywny rejon promotorowy oraz alternatywny proces splicingu posiada on 15 wariantów transkrypcyjnych, z których może powstawać 13 produktów białkowych. Średnia ekspresja *IRF5* mierzona w jednostkach RPKM (ang. *Reads Per Kilobase Million*) wynosi 1,03±0,3. Największa ekspresja tego genu jest w leukocytach - 10,8 RPKM, węzłach chłonnych - 4,5 RPKM oraz w nerce - 2,8 RPKM (wg danych projektu Illumina bodyMap2 transcriptome) ^[17, 18]. Produkty białkowe tego genu mogą tworzyć 6 izoform, z czego izoforma 1 została wytypowana jako białko o sekwencji kanonicznej, które zbudowane jest z 498 aminokwasów i posiada masę cząsteczkową 56 kDa ^[19].

Gen pełni kilka funkcji molekularnych, z których najważniejsze to: aktywność czynnika transkrypcyjnego wiążącego się do DNA, w tym do rejonu DNA, który może być regulowany przez polimerazę RNA II. W odniesieniu do biologicznych funkcji jest zaangażowany w następujące procesy: regulację procesów immunologicznych, regulacja transkrypcji na matrycy DNA, regulacja transkrypcji zależną od polimerazy RNA II, odpowiedź na peptydoglikan bakteryjny i dipeptyd muramylowy, regulacja szlaku sygnałowego zależnego od cytokin, stymulację odpowiedzi przeciwko wirusom, w tym stymulację wytwarzania interferonów α , β , γ oraz pozytywna regulacja apoptozy. [17, 18]. Spośród wymienionych funkcji molekularnych jedną z najważniejszych jego funkcji jest powiązanie tego genu z autoimmunologią. Dotychczasowe badania pokazały związek tego genu z rozwojem takich chorób o podłożu autoimmunologicznym jak: toczeń rumieniowaty układowy (SLE, *ang. systemic lupus erythematosus*), zespół Sjörgena (SS, *ang. Sjorgen's syndrome*), nieswoiste zapalenie jelit czy RZS [20, 21]. *IRF5* jest zaangażowany w ścieżkę sygnałową receptorów Toll-podobnych (TLR, *ang. Toll-like receptors pathway*), która według bazy KEGG [22, 23] jest bezpośrednio związana z RZSem. *IRF5* jest odpowiedzialny za reakcję pro-zalane oraz efekt chemotaktyczny. Pierwszy rodzaj reakcji charakteryzuje się aktywacją interleukin (IL) : IL-6, IL-12, IL-1 β oraz czynnika martwicy nowotworów alfa (TNF- α , *ang. tumor necrosis factor alpha*). Efekt chemotaktyczny przejawia się w poburzeniu migracji komórek do miejsca zapalnego np. granulocytów oraz molekuł tj. IL-8, białka zapalne makrofagów 1-alfa i 1-beta (MIP, *ang. macrophage inflammatory protein*), czynnik regulowany przez aktywację, ulegający ekspresji i wydzielaniu przez prawidłowe limfocyty T (RANTES, *ang. regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted*) [22].

SNP w *IRF5*o nr rs10488631 T>C jest zlokalizowany w pozycji chr7:g.128594183 względem sekwencji referencyjnej NC_000007.13 i znajduje się w regionie 3' genu. Frekwencja wariantu C w populacji europejskiej (populacja HapMap CEU) wynosi 0.12, natomiast rozkład genotypów przedstawia się następująco: CC: 0.018; CT: 0,21; TT: 0,77 [24]. Wariant w tej pozycji został zaraportowany jako występujący częściej w RZSie, aczkolwiek brak jest konsensusu czy występuje on w podwyższonej frekwencji u pacjentów seropozytywnych czy seronegatywnych [25, 26]. SNP o nr rs4728142 G>A, zlokalizowany jest w rejonie promotorowym genu w pozycji chr7:g.128573967 względem sekwencji referencyjnej NC_000007.13 [27]. Został zaraportowany jako występujący ze zwiększoną frekwencją w SLE, SS oraz twardzinie układowej [28, 29, 30], aczkolwiek nie ma jednoznacznych danych potwierdzających jego częstsze występowanie u pacjentów z RZSem [31].

1.4. Charakterystyka genu *IL6R* i wybranych polimorfizmów

Gen receptora dla IL-6 (*IL6R*, ang. *interleukin 6 receptor*,) jest zlokalizowany na chromosomie 1 w pozycji: 154405193-154469450 na nici sensownej w odniesieniu do sekwencji referencyjnej NC_000001.11, składa się z 10 eksonów (w odniesieniu do sekwencji referencyjnej NG_012087). Gen posiada 8 wariantów transkrypcyjnych, z których może powstawać 6 produktów białkowych. Średnia ekspresja *IL6R* wynosi $4,7 \pm 1,6$ RPKM. Największa ekspresja tego genu jest w leukocytach: 39,5 RPKM oraz w mięśniach szkieletowych 23,4 RPKM (wg danych projektu Illumina bodyMap2 transcriptome) [32, 33]. Produkty białkowe tego genu tworzą dwie izoformy, z czego izoforma 1 o sekwencji kanonicznej składa się z 468 aminokwasów i posiada masę cząsteczkową prawie 52kDa. *IL6R* posiada wiele funkcji molekularnych do których najważniejszych można zaliczyć: aktywność receptora dla cytokin oraz aktywność czynnika wzrostu. Bierze on udział w aktywacji wielu procesów biologicznych, z których najistotniejsze to: aktywacja chemotaksji leukocytów, udział w ostrej odpowiedzi immunologicznej, aktywacja proliferacji komórek, aktywacja pomocniczych limfocytów T w odpowiedzi immunologicznej, regulacja pozytywną produkcji IL-6, udział w szlaku sygnałowym zależnym od cytokin, aktywacja różnicowania się osteoblastów i in. [34].

IL-6 jest cytokiną, która jest odpowiedzialna na proces zapalny oraz hematopoezę. IL-6 stymuluje wytwarzanie białek ostrej fazy tj. białko C-reaktywne (CRP) i jest odpowiedzialna za niszczenie błony maziowej poprzez stymulację stanu zapalnego. Przyczynia się w ten sposób do rozwoju RZSu [35]. Szlak sygnałowy IL-6 jest pośredniczony przez *IL6R*, który składa się z dwóch glikoprotein: *IL6R α* oraz β (gp130). Gp130 ulega ekspresji na większości komórek , natomiast ekspresja *IL6R α* jest ograniczona [36]. Poprzez proces ograniczonej proteolizy lub alternatywny splicing mRNA może zostać wytworzona rozpuszczalna forma *IL6R*. W procesie trans-sygnałowym aktywowana rozpuszczalna forma *IL6R* może wiązać się z gp130 dając w ten sposób możliwość reakcji komórek na IL-6 [37].

SNP o nr rs2228145 A>C (Asp358Ala) jest zlokalizowany w eksonie 9 (wg sekwencji referencyjnej NG_012087.1) genu *IL6R* w pozycji g.154454494 w odniesieniu do sekwencji referencyjnej NC_000001.11. Frekwencja wariantu w populacji europejskiej (HapMap CEU) wynosi 0.35, natomiast frekwencja genotypów: AA: 0.43; AC: 0.42; CC: 0.14 [38]. Nosicielstwo 1 kopii wariantu 358Ala jest związane z dwukrotnym wzrostem w surowicy rozpuszczalnej formy *IL6R*, co prowadzi do zmniejszenia produkcji CRP indukowanego przez IL-6 i zmniejsza w ten sposób ryzyko choroby wieńcowej [39]. Omawiany wariant

został również zareportowany jako związany z takimi jednostkami chorobowymi jak: astma czy cukrzyca typu I. W odniesieniu do RZSu, allel C redukuje podatność na zachorowanie [40].

SNP o nr rs4129267 jest zlokalizowany w intronie 8, w pozycji g.154453788 w odniesieniu do sekwencji referencyjnej NC_000001.11. Frekwencja wariantu w populacji europejskiej (HapMap CEU) wynosi 0.35, natomiast frekwencja genotypów przedstawia się następująco: CC: 0.43; CT: 0.43; TT: 0.13 [41]. Omawiany wariant został zareportowany jako związany z większą zachorowalnością na astmę u Europejczyków [42].

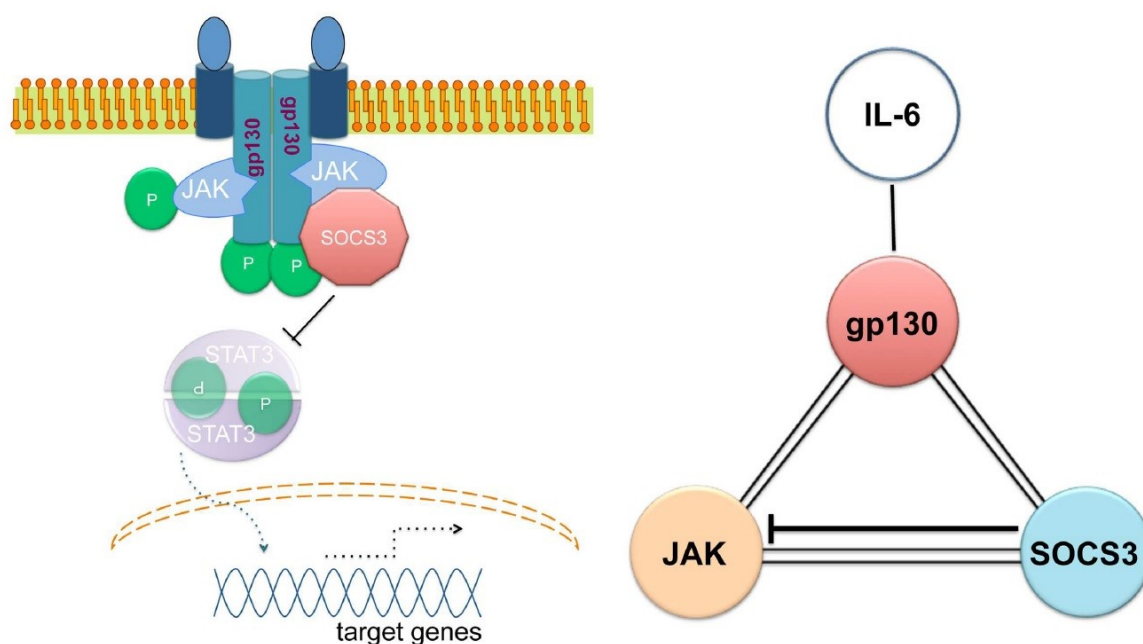
1.5. Charakterystyka genu *SOCS3* i wybranych polimorfizmów

Gen supresora III-go sygnalizacji cytokin (*SOCS3*, ang. *suppressor of cytokine signaling 3*) jest położony na chromosomie 17 na nici antysensownej, w pozycji: g.: 78356777-78360079 względem sekwencji referencyjnej NC_000017.11. Gen składa się z dwóch eksonów (wg. NG_016851.1) oraz może posiadać 2 transkrypty kodujące produkty białkowe. Jego średnia ekspresja wynosi $12,014 \pm 3.6$ RPKM, największa jest w nadnerczach (80 RPKM) i płucach (72,9 RPKM), w leukocytach wynosi 9,5 RPKM (wg danych projektu Illumina bodyMap2 transcriptome) [43, 44]. Produkt białkowy tego genu tworzy izoformę o długości 225 aminokwasów i masie cząsteczkowej 24,8 kDa. SOCS3 pod względem molekularnym bierze udział w hamowaniu aktywności kinaz białkowych oraz wiązaniu reszt fosfotyrozyny. Jedną z ważniejszych funkcji biologicznych SOCS3 jest negatywna regulacja procesów zapalnych poprzez hamowanie szlaku sygnałowego JAK-STAT. Poprzez czynnik transkrypcyjny STAT3 reguluje molekuly posiadające receptor gp130: IL-6, IL-11, IL-27 oraz cytokiny bez gp130 np.: IL-23. Poprzez regulację receptora STAT4 wpływa na IL-12 z wykorzystaniem receptora IL-12 Rb-2 oraz przez STAT1 może wpływać na IL-6 [45].

Oddziaływanie SOCS3 na podjednostkę gp130 przedstawia Rycina 2. Z innych biologicznych funkcji tej molekuly należy wymienić: negatywną regulację apoptozy, pozytywną regulację dojrzewania komórek, negatywną regulację szlaku sygnałowego dla receptora insuliny, regulacja szlaku sygnałowego zależnego od interferonu gamma [46]. Białka z rodziny SOC posiadają centralnie położoną domenę SH2, krótką domenę C-terminalną, SOC-box oraz różnej długości domenę N-terminalną. Białka te blokują kompleks receptora poprzez ubiquitynację, który następnie ulega degradacji zależnej od proteosomu. Posiadanie przez białka SOC domeny SH2 sprawia, że każdy receptor posiadający reszty fosfotyrozyny np. fosfo-JAK, fosfo-STAT, czy każdy inny ufosforylowany receptor może być potencjalnym substratem. Domena SH2 jest adapterem pomiędzy ligazami ubikwitynowymi, a białkami

sygnałowymi aktywowanymi kinazami, pośredniczącą w ich rozkładzie [47]. Sam mechanizm inhibicji IL-6 polega na jednoczesnym wiązaniu kinazy tyrozynowej JAK oraz receptora gp130, który w ten sposób zapewniają specyficzność inhibicji. SOCS3 jest w stanie blokować aktywność enzymatyczną kinazy JAK poprzez uniemożliwienie związania substratu z jednoczesnym zachowaniem specyficzności reakcji tylko wtedy kiedy jest ściśle związana z JAK podczas gdy kinaza jest związana ze specyficznym receptorem (Rycina 2).

Rycina 2. Oddziaływanie SOCS3 na IL6 poprzez blokowanie szlaku sygnałowego JAK-STAT. Rycina pochodzi z publikacji Carow i współ.. [42]



SNP o nr rs4969168A>G w *SOCS3* jest zlokalizowany w rejonie 3'UTR w pozycji g.78357712 w odniesieniu do sekwencji referencyjnej NC_000017.11. Frekwencja wariantu w populacji europejskiej (HapMap CEU) wynosi 0.14 , natomiast frekwencja genotypów: AA: 0.009; GA: 0.27; GG: 0.73 [48]. Polimorfizm o nr rs4969170A>G leży w rejonie promotorowym omawianego genu w pozycji g.78364457 w odniesieniu do sekwencji referencyjnej jak opisano powyżej. Jako allel drugorzędny (MAF, *ang. minor allele*) wg projektu 1000Genomes został opisany allel G, natomiast według danych z projektu TOPMED allelem rzadszym jest A. Wynika to z faktu, że ich frekwencja w zależności od badanej populacji jest różna. Frekwencja wariantu (allel G) w populacji europejskiej (HapMap CEU) wynosi 0.64 , natomiast frekwencja genotypów: AA: 0.13; GA: 0.46; GG: 0.41[49]. W związku z powyższym w dalszej części, obejmującej metodykę, wyniki i dyskusję jako wariant w badanej populacji będzie określany allel A. Oba polimorfizmy badano w odniesieniu do kilku jednostek chorobowych tj.: atopowe zapalenie skóry [50], neutropenia i

trombocytopenia indukowana leczeniem anty-HCV [51] oraz w insulino-oporność u pacjentów z przewlekłym zakażeniem wirusem HCV [52]. W odniesieniu do tych badań głównie SNP o nr rs4969170 był związany z tymi jednostkami chorobowymi. Praktycznie brak jest informacji na temat częstości występowania tych polimorfizmów u pacjentów w RZSem. Wydaje się, że tylko jedna publikacja na populacji chińskiej raportuje brak potencjalnego związku między nimi [53].

1.6. miR-22

Gen kodujący miR-22 leży na chromosomie 17 w rejonie 17p13, który często ulega hypometylacji, delecji lub utracie heterozygotyczności w nowotworach. W tym rejonie znajdują się kilka genów odpowiedzialnych za supresję nowotworową np. *TP53* oraz onkogen *USP6*. Gen kodujący miR-22 znajduje się w eksonie 3 niekodującego genu *C17orf91*. MiR-22 ulega szerokiej ekspresji w wielu zdrowych tkankach człowieka tj.: mózg, płuca, pęcherz, wątroba, nerka, śledziona, jajnik, łożysko i in. Jest raportowany jako molekula supresji nowotworów w odniesieniu do takich jednostek chorobowych jak: białaczki/chłoniaki, rak płuca, piersi, wątroby, trzustki, jajnika, prostaty, szyjki macicy czy jelita grubego. Aktywność supresorowa polega na oddziaływaniu na geny powiązane z rozwojem tych nowotworów tj. gen kodujący receptor alfa dla estrogeny (*ERα*), gen deacetylasy 4 histonów (*HDAC4*), czy geny *CDK6*, *SIRT1*, *MYCBP* i in. Z drugiej strony miR-22 może oddziaływać jako onkogen poprzez wyciszanie genu *PTEN* [54]. MiR-22 wykazuje zależność z innymi chorobami tj. zapalenie kości, przerost kardiomiocytów, zaburzenia lękowe, choroba wieńcowa, SLE czy RZS [54, 55, 14, 56, 57,].

Wśród pacjentów z RZSem ekspresja miR-22 była badana głównie w tkance maziowej, gdzie wykazywał zmniejszoną ekspresję, która powodowała indukcję procesu zapalnego oraz wytworzeniem oporności na proces apoptozy. Badania pokazały, że poziom miR-22 był niższy w płynie maziowy pacjentów z RZSem w stosunku do pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów. Z badań Lin i współ. wynikało, że zmniejszony poziom ekspresji miR-22 powodował wzrost ekspresji molekuly CYR61 (*ang. cysteine rich angiogenic inducer 61*), która jest odpowiedzialna za proliferację fibroblastów u pacjentów z RZSem, jak również wpływa na wydzielanie IL-6. Tak więc udowodniono, że spadek ekspresji miR-22 może pośrednio powodować dysplazję błony maziowej oraz indukowaną stanem zapalnym, pośredniczonym przez IL-6, degradację stawów [14, 58]. Ekspresja miR-22 w surowicy u została opisana jako potencjalna molekula zaangażowana w rozwój stanu zapalnego, który występuje w podwyższonej ekspresji u pacjentów w bardzo wczesniej fazie

RZSu oraz w przypadku pozytywnej reakcji ACPA (bez rozpoznania RZSu) [57]. Inna ważną funkcją miR-22 może być rola jako molekularny marker ryzyka rozwoju choroby, gdyż w tej samej publikacji wykazano jego nadekspresję u pacjentów którzy na wstępie do badania wykazali progres ze stanu układowej autoimmunizacji do stanu RZSu [57].

1.7. miR-221

Ekspresja miR-221 występuje z ko-ekspresją miR-222, gdyż są one kodowane w tandemie, który jest zlokalizowany są na chromosomie X w rejonie Xp11.3, zarówno u człowieka, szczura i myszy. U kręgowców zaliczane są do konserwatywnych miRów, co więcej posiadają tą samą sekwencję seed'ową [59, 60], przez co obie molekuly mogą wywierać wpływ na te same geny, dlatego często w literaturze są rozpatrywane są razem [14]. W literaturze raportowany był związek tych miRów z rozwojem chorób nowotworowych oraz chorób z towarzyszącym procesem zapalnym. Zmieniona ekspresja tych molekuł występowała u pacjentów z miażdżycą tętnic szyjnych oraz choroby wieńcowej, co sugerowało potencjalną rolę tych miRów jako markerów diagnostycznych. Wykazano, że nadekspresja m.in. miR-221/222 w komórkach śródbłónka aorty powoduje indukcję powstawania reaktywnych form tlenu (*ang. reactive oxygen species*), których nagromadzenie może prowadzić do apoptozy i może być przyczyną rozwoju miażdżycy tętnic. Innym przykładem oddziaływania miR-221 na komórki śródbłónka jest tłumienie przez tą molekułę syntezy tlenku azotu (NO) i aktywacja szlaku sygnałowego jądrowego czynnika kappa B w żyłę pępowinowej. Oddziaływanie to jest ukierunkowane na receptor adiponektyny, przez co uważa się że miR-221 może być zaangażowany w regulację śródbłonkowego procesu zapalnego, który odgrywa ważną rolę w rozwoju miażdżycy. Z innych chorób zapalnych, w których zaobserwowano zmienioną ekspresję omawianych miRów było zapalenie kości oraz RZS. [59]

U pacjentów z RZSem miR-221/222 wykazują nadekspresję w fibroblastach, tkance maziowej oraz w surowicy. Uważa się, że nadekspresja miR-221 wzmacnia ekspresję cytokin prozapalnych, proliferację fibroblastów, migrację komórek oraz hamuje apoptozę [14]. Genami, na które może oddziaływać miR-221 są: metaloproteinaza (MMP)-9, MMP-3 czy naczyniowy czynnik wzrostu śródbłónka (VEGF, *ang. vascular endothelial growth factor*) [61].

II. CELE PRACY

Głównym celem niniejszej pracy było oznaczenie markerów molekularnych dla reumatoidalnego zapalenia stawów i ich związku z nasileniem choroby, które obejmowały zmiany epigenetyczne tj. metylacja w obrębie rejonów promotorowych oraz ekspresja mikro-RNA. W zakresie głównego celu było również poszukanie zależności metylacja-ekspresja mikro-RNA.

Drugorzędnym celem pracy była analiza polimorfizmów w wybranych genach obejmująca określenie częstości ich występowania w grupie pacjentów podzielonych ze względu na miano czynnika reumatoidalnego (pozytywni/negatywni).

III. MATERIAŁY I METODY

Cześć doświadczalną niniejszej pracy wykonano w budynku Przyrodniczo-Medycznego Centrum Badań Innowacyjnych Uniwersytetu Rzeszowskiego. Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym w Lublinie wydała pozwolenie na przeprowadzenie badań (Nr zgody KE-0254/7/2016).

3.1. Charakterystyka grupy badanej

Do analizy SNP zakwalifikowano 122 chorych podzielonych na dwie grupy (pozytywni/negatywni) w zależności od miana czynnika reumatoidalnego (RF, *ang. rheumatoid factor*). Do analizy epigenetycznej wstępnie zakwalifikowano 52 chorych oraz 24 zdrowych. Chorzy włączeni do tej części badań zostali podzieleni według skali aktywności choroby (*ang. disease activity score*, DAS-28) na dwie grupy: o wysokiej aktywności choroby ($DAS-28 > 5,1$; $n=30$) oraz będących w remisji ($DAS-28 \leq 2,6$; $n=22$).

Ze względu na brak 3 próbek osocza dla pacjentów z grupy RZS oznaczenie ekspresji mikro-RNA wykonano dla grupy 29 pacjentów o wysokiej aktywności choroby oraz 20 w remisji.

3.2. Analiza *in-silico* zależności pomiędzy badanymi genami a badanymi miRami

Przy pomocy narzędzi predykcyjnego TargetScan 7.2 (dostępny z: http://www.targetscan.org/vert_72) sporządzono pierwotny zbiór miRów, które mogą wchodzić w interakcję z genami ujętymi w analizie metylacji. Następnie przy pomocy narzędzi predykcyjnych miRWalk 3.0 (dostępny z: <http://zmf.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>) oraz miRDB (dostępny z: <http://mirdb.org>) sprawdzono, czy oszacowane pierwotnie interakcje gen-miR są powtarzalne. MiR uznano za potencjalny obiekt badań jeśli co najmniej 1/2 narzędzia predykcyjne z drugiego etapu wskazały, że może przyłączyć się do regionu 3' UTR badanego genu. Następnie przeprowadzono subiektywną analizę literatury pod kątem wcześniejszych zależności pomiędzy ekspresją miR a chorobami autoimmunologicznymi, ze szczególnym uwzględnieniem RZSu, starając się wybrać te miRy, których ekspresja w zdrowej tkance była dobrze zbadana. Ostatnim kryterium wyboru miRów była łatwość zaprojektowania starterów oraz fakt, czy miR może wyciszać więcej niż jeden gen badany. W efekcie końcowym do analizy włączono dwa miRy o dobrze udokumentowanej ekspresji: hsa-miR-22-3p oraz hsa-miR-221-3p.

Wyniki analizy *in-silico* interakcji gen-miR przedstawia Tabela 1.

Tabela 1. Wyniki analizy predykcyjne in-silico interakcji gen-mikro-RNA.

Badany gen	Narzędzie predykcyjne	Potencjalne miry
IRF5	TargetScan 7.2	miR-302-3p */** 372-3p/373-3p/520-3p; miR-22-3p
	miRWalk 3.0	Potwierdzenie: miR-22-3p; 302-3p/372-3p/520-3p
	miRDB	Potwierdzenie: miR-302-3p
SOCS3	TargetScan 7.2	miR-221/222-3p; miR-218-5p; miR-455-5p; miR124-3p/506-3p; miR-30-5p; miR-19-3p; miR- 148-3p/ 152-3p; miR-181-5p; miR-203a-3p; miR- 302c-3p/ miR-520-3p
	miRWalk 3.0	Potwierdzenie: miR-221/222-3p; miR-218-5p; miR- 455-5p; mir-506-3p; mir-152-3p; mir-181-5p; mir- 520-3p
	miRDB	Potwierdzenie: miR-221/222-3p; miR-218-5p; miR- 455-5p; miR-30-5p; miR-19-3p; miR-455-5p;
IL6R	TargetScan 7.2	miR-34-5p/449-5p; miR-143-3p; miR-23-3p; miR- 125-3p; miR-204-5p/211-5p; miR-21-5p/590-5p; miR-22-3p; miR-155-5p; miR-9-5p; miR-7-5p/98- 5p
	miRWalk 3.0	miR-34-5p; miR-143-3p; miR-125-3p; miR-204; miR-590-5p; miR-22-3p; miR-7-5p/98-5p
	miRDB	miR-23-3p; miR-125-3p; miR-204-5p/211-5p; miR- 21-5p/590-5p; miR-22-3p; miR-155-5p

*MiRy o potwierdzonej interakcji gen-miR zostały wytłuszczone. ** Miry oddzielone od siebie '/' posiadają tą samą sekwencję seed'ową. Skróty: IL6R, gen receptora dla interleukiny 6; IRF5, gen czynnika V regulowanego interferonem; miR, mikro-RNA; SOCS3, gen supresora III-go sygnalizacji cytokin.

3.3. Analiza rejonów do badania metylacji DNA

Rejony promotorowe genów włączonych do analizy metylacji zostały znalezione w bazie Eukaryotic Promoter Database (EPD, dostępna z: <https://epd.epfl.ch//index.php>) [62]. Używając wewnętrznego narzędzia EPD motif tool, bazującego na bazie czynników

transkrypcyjnych JASPAR 2018 dla kręgowców, zostały wyszukane potencjalne miejsca regulatorowe do których mogą przyłączyć się czynniki transkrypcyjne.

Dla *IRF5* zostało znalezione potencjalne miejsce przyłączania się czynnika transkrypcyjnego CTCF (punkt odcięcia dla p-value wynosił 0.0001) w pozycjach -224 oraz -17 w odniesieniu do punktu startu transkrypcji (TSS, ang. *transcription start site*). Zaprojektowane startery do oceny metylacji *IRF5* obejmowały rejon od -308 do -192 bp w odniesieniu do TSS.

W promotorze *SOCS3* zostało znalezione potencjalne miejsce wiązania również dla represora transkrypcji CTCF (punkt odcięcia dla p-value wynosił 0.0001) w pozycji -874 w odniesieniu do TSS. Zaprojektowane startery komplementarne do sekwencji zmetylowanych obejmowały rejon promotora od -961 do -835 bp względem TSS.

W *IL6R* został znaleziony bogaty rejon w parę GC na dół od TSS. Startery zostały zaprojektowane w pozycji od -169 do -78 w stosunku do TSS. W tym rejonie zostało znalezione potencjalne miejsce przyłączania dwóch czynników transkrypcyjnych: IRF4 i IRF5 (punkt odcięcia dla p-value wynosił 0.001), które odgrywają ważną rolę w odpowiedzi immunologicznej.

3.4. Analizowane parametry laboratoryjne i molekularne

Analizie poddano następujące parametry: białko C-reaktywne (CRP), Odczyn Biernackiego (OB), oznaczenia te wykonano rutynowymi technikami laboratoryjnymi. Miano ACPA (DiaMetra, Włochy) oraz RF (EIA RF IgG, TestLine Clinical Diagnostics) oznaczono w surowicy metodą ELISA.

Analizy molekularne obejmujące metylacje i genotypowanie przeprowadzono w odniesieniu do następujących genów: receptora dla interleukiny 6 (ang. *Interleukin 6 Receptor*, *IL6R*), czynnik V regulujący interferon (ang. *Interferon Regulatory Factor 5*, *IRF5*) oraz supresora III-go aktywacji cytokin (ang. *Suppressor Of Cytokine Signaling 3*, *SOCS3*).

Ocenę ekspresji obejmowała następujące mikro-RNA: miR-22 (hsa-miR-22-3p), numer wpisu do bazy miRBase: MIMAT0000077 oraz miR-221 (hsa-miR-221-3p), numer wpisu do bazy miRBase: MIMAT0000278).

Wymienione oznaczenia z zakresu biologii molekularnej zostały wykonane na aparacie typu Real-Time PCR Cobaz z480 z oprogramowaniem: LightCycler 480 SW, wersja 1.5.1.62 SP2 – UDF v.2.0.0 (Roche, Niemcy).

3.5. Metody

3.5.1. Izolacja genomowego DNA

Materiał do izolacji DNA stanowiła krew z żyły odłokciowej pobrana na wersenian dwusodowy (EDTA) jako antykoagulant. Do czasu izolacji próbki krwi były przechowywane w -80°C. Izolację DNA przeprowadzono z objętości 200 µl krwi pełnej zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta (Eurx, Polska). Elucję przeprowadzono poprzez dwukrotne przepłukanie złoza kolumnienki objętością 50 µl buforu AE podgrzanego do 70°C. Każda próbka podlegała ilościowej i jakościowej analizie na spektrofotometrze Nanodrop 2000c (Thermo Scientific, USA), która obejmowała: stosunek absorbancji przy długościach fali 260/280 nm, A260/230nm oraz stężenie kwasów nukleinowych.

3.5.2. Reakcja chemicznej konwersji DNA odczynnikami wodorosiarczynowymi

Konwersję przeprowadzono zgodnie z instrukcją producenta przy użyciu zestawu EZ Methylation Gold (ZymoResearch, USA) wykorzystując do reakcji 1000 ng DNA. Elucję przeprowadzono poprzez dwukrotne przepłukanie złoza kolumnienki objętością 25 µl buforu M-elution. Do czasu dalszej analizy DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.5.3. Ocena metylacji rejonów promotorowych

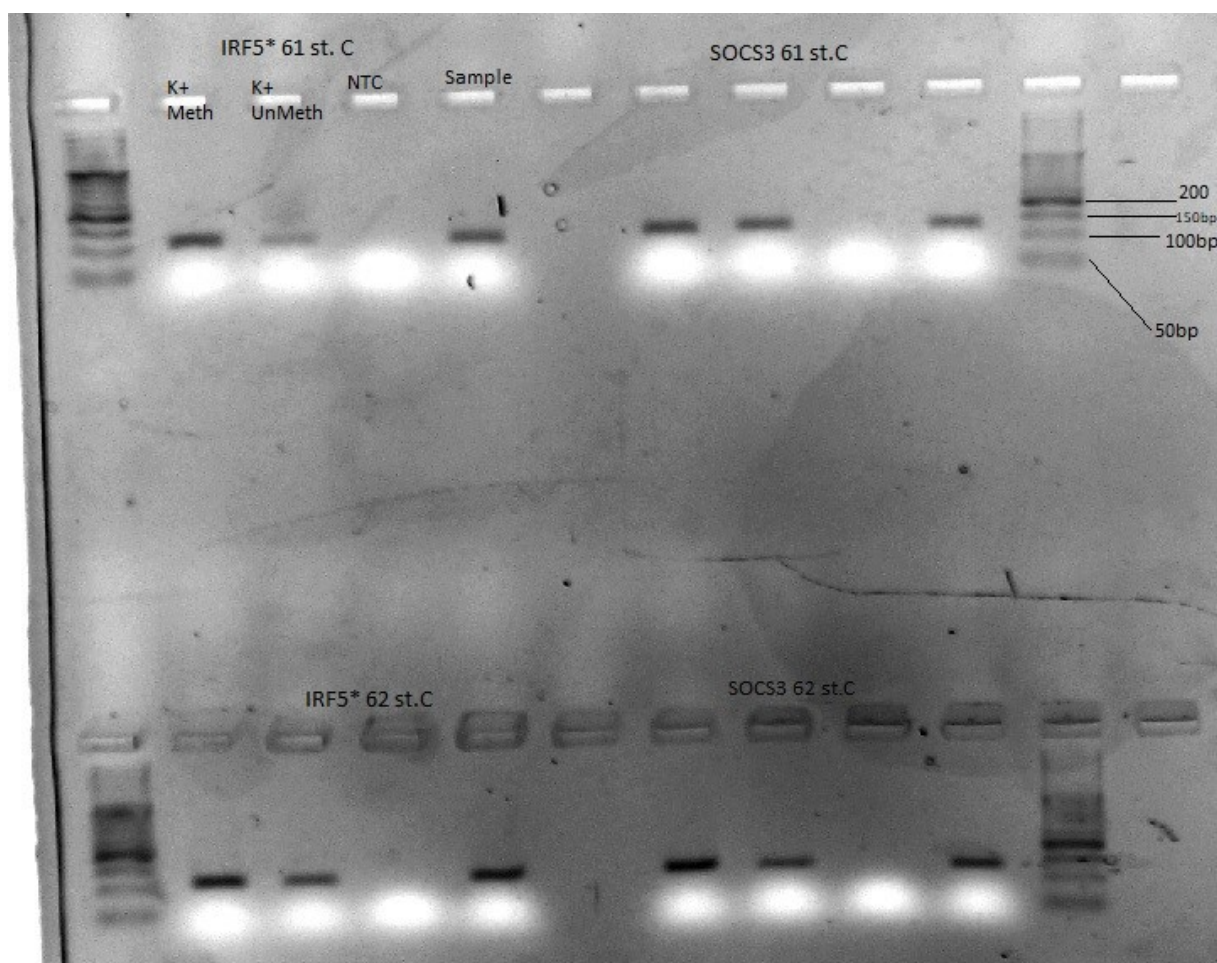
3.5.3.1. Projektowanie metody i wstępna ocena metylacji

Startery (ang. *primers*) użyte do metylacyjno-specyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy, MSP (ang. *methylation-specific Polymerase Chain Reaction*) zostały zaprojektowane przy pomocy oprogramowania MethPrimer (<http://www.urogene.org/methprimer>)^[63], według ogólnych zasad dla projektowania primerów do reakcji MSP^[64] oraz dla łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)^[65], uwzględniając przy tym własne doświadczenie oraz następujące kryteria: długość ampliconu nie powinna przekraczać 150 par zasad, energia swobodna Gibbsa dla struktur typu dimerów nie powinna przekraczać w temperaturze 60°C - 5,5 kcal/mol, dla struktur harpinowych nie powinna przekraczać -2 kcal/mol, różnica w temperaturach topnienia (T_m , ang. *melting temperature*) starterów nie powinna być większa niż 1 °C. T_m starterów powinna wynosić co najmniej 59°C wyliczona względem stężenia 2.5 mM wolnych jonów Mg^{2+} , teoretycznego stężenia starterów 300 pM, stężenia kationów jednowartościowych 50 mM i temperatury przyłączania starterów (ang. *annealing*) 60°C. Dodatkowo aby zwiększyć specyficzność wiązania primerów do sekwencji zmetylowanych lub odmetylowanych na końcu każdego startera w pozycji od 1 do 3 licząc od końca 3' musiało znajdować się miejsce wrażliwe na metylację (ang. *CpG site*). Parametry

termodynamiczne zostały oszacowane przy pomocy oprogramowania NetPrimer (dostępnego z: <http://www.premierbiosoft.com/NetPrimer/AnalyzePrimer.jsp>). Przeprowadzono również analizę *in silico* tworzonych przez nie amplikonów przy pomocy oprogramowania UNAFold (dostępne z : <https://eu.idtdna.com/UNAFold>). Wszystkie amplikony, których teoretyczna temperatura topnienia dla tworzonych przez nie struktur II-rzędowych była wyższa niż założona teoretycznie temperatura annealingu (60°C) zostały odrzucone i sekwencje starterów zostały zaprojektowane na nowo. Wstępnie specyficzność zaprojektowanych starterów została sprawdzona *in silico* przy pomocy narzędzia BiSearch (dostępne z: <http://bisearch.enzim.hu/>) [66].

Sekwencje użytych starterów przedstawiają Tabele 2 i 3, w obrębie starterów komplementarnych do sekwencji zmetylowanych zaznaczono miejsca wrażliwe na metylację. Wykonano reakcję MSP (warunki amplifikacji identyczne jak dla reakcji ilościowej i jakościowej) z kontrolnym DNA 100% zmetylowanym i 100 % odmetylowanym (EpiTec PCR Control DNA Set, Qiagen, Niemcy) w celu określenia specyficzności wiązania starterów do matrycy DNA. Produkty reakcji rozdzielono w 2% żelu agarozowym w obecności markera wielkości DNA o zakresie długości fragmentów 50-1500 par zasad. Nie uzyskano produktów niespecyficznych oraz produktów dla reakcji krzyżowych: startery komplementarne do sekwencji odmetylowanych oraz DNA 100% zmetylowane i odwrotnie. Obraz przykładowego rozdziału elektroforetycznego z etapu walidacji metody przedstawia Rycina 3.

Rycina 3. Obraz przykładowej elektroforezy z etapu walidacji metody.



Objaśnienia skrótów: K+ Meth, kontrolne DNA zawierająca 100% zmetylowanych sekwencji; K+ UnMeth, kontrolne DNA zawierające 100% odmetylowanych sekwencji; NTC –kontrola bez matrycy DNA; Sample – próbka DNA pochodząca od pacjenta. Układ próbek dla wszystkich produktów identyczny jak dla opisanego „IRF5* 61 st.C”.

Wstępną ocenę stopnia metylacji wybranych genów przeprowadzono na 10 losowych próbkach DNA. Dla genu *IRF5* uzyskano sygnał amplifikacyjny pochodzący od sekwencji zmetylowanych i odmetylowanych. Dla genów *IL6R* i *SOCS3* nie uzyskano sygnału amplifikacyjnego od sekwencji zmetylowanych przy jednoczesnym sygnale od DNA kontrolnego (100% zmetylowanego i odmetylowanego). W toku dalsze analizy gen *IRF5* został poddany ilościowej analizie metylacji natomiast pozostałe dwa geny ocenie jakościowej.

Tabela 2. Startery oligonukleotydowe użyte do oceny stopnia metylacji oraz walidacji metody dla genów beta aktyny oraz czynnika V regulowanego interferonem.

Gen	Nazwa startera	Sekwencja 5'→3'	Wielkość amplikonu w parach zasad	Pozycja wg GRCh38 [chromosom:początek:koniec:orientacja*]	Komplementarność do sekwencji zmetylowanych / odmetylowanych
ACT-B	ACTB_F	GGTGGTGATGGAGGAGGTTTAG	115	7:5532117:5532232:-1	Niezależne od metylacji
	ACTB_R	CCCTTAAAAATTACAAAAACCACAACC			Niezależne od metylacji
IRF5	IRF5_methyl_F	AATTGAGTATTGTAG <u>CGGGAGGTAC</u>	116	7:128937673:128937789:1	Zmetylowane
	IRF5_methyl_R	CTCCAAAAAATACCAAA <u>CGACG</u>			Zmetylowane
	IRF5_unmethyl_F	TGAGTATTGTAGTGGGAGGTATGG	113	7:128937676:128937789:1	Odmetylowane
	IRF5_unmethyl_R	CTCCAAAAAATACCAACAACAC			Odmetylowane

* 1: nić DNA sensowna; -1: nić DNA antysensowna. Skróty: ACT-B, gen beta-aktyny. Pozostałe skróty proszę odnieść się do Tabeli 1.

Tabela 3. Startery oligonukleotydowe użyte do oceny stopnia metylacji oraz walidacji metody dla genów supresora III sygnalizacji cytokin oraz receptora dla interleukiny-6.

Gen	Nazwa startera	Sekwencja 5'→3'	Wielkość amplikonu w parach zasad	Pozycja wg GRCh38 [chromosom:początek:koniec:orientacja*]	Komplementarność do sekwencji zmetylowanych / odmetylowanych
SOCS3	SOCS3_methyl_F_ctcf	GTGGAAC <u>CG</u> ATGGTTTTAATTTAC <u>G</u>	126	17:78360912:78361038:1	Zmetylowane
	SOCS3_metyl_R_ctcf	ATTCC <u>CG</u> CAAATCCCTAAC <u>G</u>			Zmetylowane
	SOCS3_unmethyl_F_ctcf	GGTGGAATGATGGTTTTAATTTATG	127	17:78360911:78361038:1	Odmetylowane
	SOCS3_unmethyl_R_ctcf	ATTCCCACAAATCCCTAACATAC			Odmetylowane
IL6R	IL6R_methyl_F	<u>CG</u> TATTTGGGAC <u>CG</u> GTTTAGAGAC <u>C</u>	91	1:154405299:154405390:1	Zmetylowane
	IL6R_metyl_R	CACATAACTCAAAAC <u>CG</u> ACGAAC <u>G</u>			Zmetylowane
	IL6R_unmethyl_F	TTGTATTTTGGGATGGTTTAGAGATG	95	1:154405298:154405393:1	Odmetylowane
	IL6R_unmethyl_R	TCACACATAACTCAAAACAACAAACAAT			Odmetylowane

3.5.3.2. Ilościowa analiza stopnia metylacji dla genu *IRF5*

Analiza metylacji promotora genu *IRF5* została oszacowana przy pomocy ilościowej metylacyjno-specyficznej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RQ-MSP, ang. *Quantitative real-time methylation-specific Polymerase Chain Reaction*). Reakcję przeprowadzono w całkowitej objętości 10 μ l, która zawierała 5 μ l miksu reakcyjnego ExiLent SYBR Green master mix (Exicon, Dania), 2 μ l DNA po metylacji, 300 nM końcowego stężenia starterów komplementarnych dla sekwencji zmetylowanych. Całość uzupełniono wodą molekularną wolną do DNaz i RNaz do objętości końcowej. Reakcję przeprowadzono na płytkach 96-dołkowych zgodnie z profilem termicznym załączonym w instrukcji do miksu reakcyjnego, z tym wyjątkiem, że przyłączenie starterów i elongacja odbyły się w temperaturze 62°C oraz w etapie krzywej topnienia wzrost temperatury wynosił 0,1 °C/sekundę; 6 pomiarów/1°C. Każda płytka reakcyjna zawierała kontrolę negatywną, którą stanowiła kontrola bez matrycy DNA (NTC, ang. *No Template Control*) oraz próbka kalibracyjna o znanym rozcieńczeniu DNA.

Bazując na publikacji Menigatti M. i współ. [67] jako gen normalizujący ilość użytego do reakcji DNA został wybrany rejon promotorowy genu beta-aktyny (*ACT-B*) wolny od miejsc wrażliwych na metylację. Sekwencja starterów z oryginalnej publikacji zostały przeprojektowane tak aby zmniejszyć prawdopodobieństwo tworzenia przez nie struktur II-rzędowych, zgodnie z opisem przedstawionym powyżej.

Ilościową ocenę stopnia metylacji DNA oszacowano na podstawie relatywnej zmiany w metylacji uwzględniając korektę w obliczeniach na wydajność amplifikacji [68,69]. Analizę uzyskanych danych przeprowadzono przy pomocy modułu Advanced Relative Quantification wybierając jako model obliczeniowy maksimum drugiej pochodnej. Wyniki wyrażano jako znormalizowany stosunek względem próbki kalibracyjnej. Każde oznaczenie wykonano w 3 powtórzeniach.

3.5.3.3. Jakościowa analiza metylacji dla genów *IL6R* oraz *SOCS3*

Jakościowa analiza metylacji rejonów promotorowych genów *IL6R* oraz *SOCS3* została oszacowana przy pomocy metylacyjno-specyficznej łańcuchowej reakcji polimerazy w czasie rzeczywistym (RT-MSP, ang. *real-time methylation-specific Polymerase Chain Reaction*), w warunkach termicznych i odczynnikowych jak opisano powyżej, z tym wyjątkiem, że dla genu *SOCS3* zastosowano 600 nM końcowego stężenia starterów i temperaturę annealingu 63°C. Dla *SOCS3* użyto 20 ng DNA, natomiast dla *IL6R* 15 ng.

Każda płytka reakcyjna zawierała NTC oraz kontrolę pozytywną, która zawierała 1% zmetylowanych sekwencji DNA (1% zmetylowanego allelu wśród 99% allelu odmetrylowanego). Kontrole DNA wykonano mieszając w odpowiednich proporcjach komercyjne przygotowane DNA (EpiTec PCR Control DNA Set, Qiagen, Niemcy), dodając je do reakcji w ilościach takich samych jak ilość dodawanego DNA dla badanych genów.

3.5.4. Oznaczenia polimorfizmów

Oznaczenia polimorfizmów wykonano przy pomocy gotowych zestawów starterów i sond typu TaqMan, gotowego miksu reakcyjnego TaqMan Genotyping Master Mix (ThermoFisher, USA). Reakcję przeprowadzono w profilu termicznym i proporcjach odczynników zgodnie z zaleceniami producenta. Każda płytka reakcyjna zawierała kontrolę NTC. Wyniki analizowano przy pomocy modułu Endpoint Genotyping. Zestawienie oznaczonych polimorfizmów przedstawia Tabela 4.

Tabela 4. Charakterystyka oznaczanych polimorfizmów.

Lp.	Gen	Oznaczany polimorfizm	ID testu	Numer rs w bazie dbSNP
1.	IRF5	T>C	C__2691242_10	rs10488631
2.		G>A	C__2691222_10	rs4728142
3.	SOCS3	A>G	C__1706397_20	rs4969168
4.		A>G	C__29949384_10	rs4969170
5.	IL6R	C>T	C__26292282_10	rs4129267
6.		A>C	C__16170664_10	rs2228145

Skróty: proszę odnieść się do Tabeli 1.

3.5.5. Oznaczenie ekspresji mikro-RNA

3.5.5.1. Izolacja mikro-RNA

Izolację miR przeprowadzono z osocza wyizolowanego z krwi pełnej pobranej na EDTA. Do czasu izolacji osocze przechowywano w temperaturze -80°C. Izolację

przeprowadzono zestawem miRCURY RNA Isolation Kit – Biofluids (EXICON, Dania) zgodnie z zaleceniami producenta, wykorzystując do izolacji 300µl osocza. Dodatkowo do buforu lizującego dodano 1,5 µg/próbkę nośnika RNA (*ang. carrier*) w postaci RNA bakteriofaga MS2 (Roche, Niemcy) oraz sztuczne cel-miR-39-3p tzw. spike-in, w ilości $5,6 \times 10^8$ kopii/próbkę (miRNeasy Serum/Plasma Spike-in Control, Qiagen, Niemcy). Materiał po izolacji natychmiast zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C.

3.5.5.2. Odwrotna transkrypcja

Odwrotną transkrypcję miR do cDNA przeprowadzono przy pomocy zestawu Universal cDNA Synthesis Kit II (EXICON, Dania) zgodnie z rekomendacjami producenta wykorzystując do reakcji 2 µl wyizolowanego wcześniej miR.

3.5.5.3. Oznaczenie ekspresji

Sekwencje starterów zostały zaprojektowane przy pomocy oprogramowania miRPrimer2 [70], biorąc pod uwagę zasady opisane przez innych autorów [71], uwzględniając jednocześnie doświadczenie własne oraz następujące kryteria: Tm starterów nie mogły być niższe niż 59°C, oraz różnica w Tm nie mogła być większa niż 1°C. W przypadku gdy zaszła konieczność zmniejszenia różnicy w Tm primerów dodawano lub odejmowano na końcu 5'wolne nukleotydy. Do oceny parametrów primerów zastosowano oprogramowanie Netprimer oraz Oligoanalyzer (<https://www.idtdna.com/calc/Analyzer>). Dla pierwszego oprogramowania zastosowano następujące parametry analizy: temperatura annealingu 60°C, końcowe stężenie primerów 300 nM, stężenie wolnych jonów Mg^{2+} 3mM, stężenie kationów jednowartościowych 50 mM. Dla Oligoanalyzera wybrano opcję analizy „qPCR”. Ze względu na fakt, że Tm dla obu zastosowanych algorytmów różniły się nawet o kilka °C zastały zamówione po 3 startery na badane miR, 2 startery forward i jeden reverse. W toku walidacji metody wybrano te, które generowały lepszą amplifikację.

Sekwencje użytych starterów oraz komplementarne do nich sekwencje miR przedstawia Tabela 6.

Oznaczenie ekspresji miR-22 oraz miR-221 wykonano w całkowitej objętości reakcji 10µl, na którą składało się: 5 µl gotowego mixu reakcyjnego PowerUp SYBR Green Master Mix (ThermoFisher, USA), po 0,45µl startera forward i reverse rozcieńczonych do stężenia 10µM, 3 µl cDNA rozcieńczonego przed reakcją 10 razy. Całość uzupełniono wodą molekularną do objętości końcowej. Reakcję przeprowadzono zgodnie z profilem termicznym załączonym w instrukcji do miksu reakcyjnego, stosując temperaturę annealingu/elongacji 60°C. W etapie

krzywej topnienia zastosowano wzrost temperatury o 0,1 °C/sekundę; 6 pomiarów/1°C. Podczas etapu walidacji metody sprawdzono wydajność amplifikacji dwóch potencjalnych genów referencyjnych: hsa-miR-425-5p oraz cel-miR-39-3p. Lepsze rezultaty uzyskano dla zastosowanego od etapu izolacji spike-in'a (cel-miR-39-3p), który został wybrany jako gen normalizujący. Próbkę została oznaczona w trzech powtórzeniach. Każda płytka reakcyjna zawierała kontrolę NTC oraz próbkę kalibracyjną.

Ocenę stopnia ekspresji miR oszacowano na podstawie relatywnej zmiany w ekspresji uwzględniając korektę w obliczeniach na wydajność amplifikacji [68, 69]. Analizę uzyskanych danych przeprowadzono przy pomocy modułu Advanced Relative Quantification wybierając jako model obliczeniowy maksimum drugiej pochodnej. Wyniki wyrażano jako znormalizowany stosunek względem próbki kalibracyjnej.

3.5.6. Wykaz odczynników nie ujętych we wcześniejszej części metodyki

Wykaz odczynników nie ujętych we wcześniejszej części metodyki przedstawia Tabela 5.

Tabela 5. Wykaz dodatkowych odczynników.

Nazwa odczynnika	Producent
Woda molekularna wolna od DNAaz i RNAaz	Sigma-Aldrich
Alkohol etylowy 98%	CHEMPUR
Izopropanol do zastosowań biologii molekularnej	Sigma-Aldrich
Agaroza	Sigma-Aldrich
Midori Green	Nippon Genetics
Marker wielkości 50-1500 bp	Nippon Genetics
Bufor TBE 10x	Sporządzony samodzielnie
Bufor TE do zastosowań biologii molekularnej	Sigma-Aldrich

3.5.7 Analiza statystyczna

W zależności od rozkładu danych, który został oszacowany testem W Shapiro-Wilka, dane ilościowe zostały przedstawione jako średnia±odchylenie standardowe, średnia±błąd standardowy średniej lub mediana [przedział międzykwartylowy]. Różnice pomiędzy dwoma

niezależnymi grupami zostały oszacowane przy pomocy testu t studenta lub testu U Manna-Whitney'a. ANOVA Kruskala-Wallisa oraz test wielokrotnych porównań zostały użyte do określenia istotności w różnicach pomiędzy grupą kontrolną a grupą pacjentów RZS podzielonych dodatkowo na podstawie aktywności na grupę o wysokiej aktywności oraz remisję. Związek pomiędzy dwoma ciągłymi zmiennymi został oszacowany za pomocą korelacji Spearmana. Zmienne jakościowe zostały wyrażone jako liczba z odsetkiem oraz zostały porównane za sobą pomocą tabel kontyngencji i testów χ^2 test z poprawką na ciągłość Yates's lub dokładnym testem Fisher'a (jednostronny). Regresja logistyczna została użyta do oszacowania ilorazu szans (OD, *ang. odds ratio*) wraz z 95% przedziałem ufności (CI, *ang. confidence interval*). Wartość P poniżej 0.05 została uznana za istotną statystycznie różnicę. Analizy przeprowadzono przy pomocy oprogramowania STATISTICA, wersja 13 (StatSoft Inc., USA). Do analizy częstości SNP wykorzystano także Bayesowskie tabele kontyngencji, a obliczenia przeprowadzono przy pomocy oprogramowania JASP , wersja 0.8.6 (dostępnego z <https://jasp-stats.org>) . Testowano hipotezę, w której RF negatywni pacjenci posiadają wyższą frekwencję allelu zmutowanego. Wartość BF_{10} powyżej 3.0 potwierdzała założoną hipotezę. Nierównowagę sprzężenia (*ang. linkage disequilibrium*, LD) pomiędzy badanymi polimorfizmami oszacowano przy pomocy internetowego narzędzia LDlink, wersja 3.6. [72]

Tabela 6. Informacje o użytych oligonukleotydach podczas badania ekspresji mikro-RNA.

Lp.	Nazwa mikro-RNA	Sekwencja startera forward 5'→3'	Sekwencja startera reverse 5'→3'	Sekwencja mikro-RNA 5'→3'	Nr wpisu w bazie miRBase
1	cel-miR-39-3p	GCAGTCACCGGGTGTAATCAG	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTCAAG	UCACCGGGUGUAAAUCAGCUUG	MIMAT0000010
2.	hsa-miR-22-3p	CGAGAAGCTGCCAGTTGAAGA	GGTCCAGTTTTTTTTTTTTTTACAGT	AAGCUGCCAGUUGAAGAACUGU	MIMAT0000077
3.	hsa-miR-221-3p	CGTGAGTGCTACATTGTCTGCTG	TCTTTTTTTTTTTTTTTGAAACCA	AGCUACAUUGUCUGCGGGUUC	MIMAT0000278

IV. WYNIKI

4.1. ANALIZA METYLACJI

Szczegółowa charakterystyka grupy pacjentów RZS oraz grupy kontrolnej włączonych do analizy metylacji została przedstawiona w Tabeli 7.

Tabela 7. Charakterystyka grupy badanej włączonej do analizy metylacji.

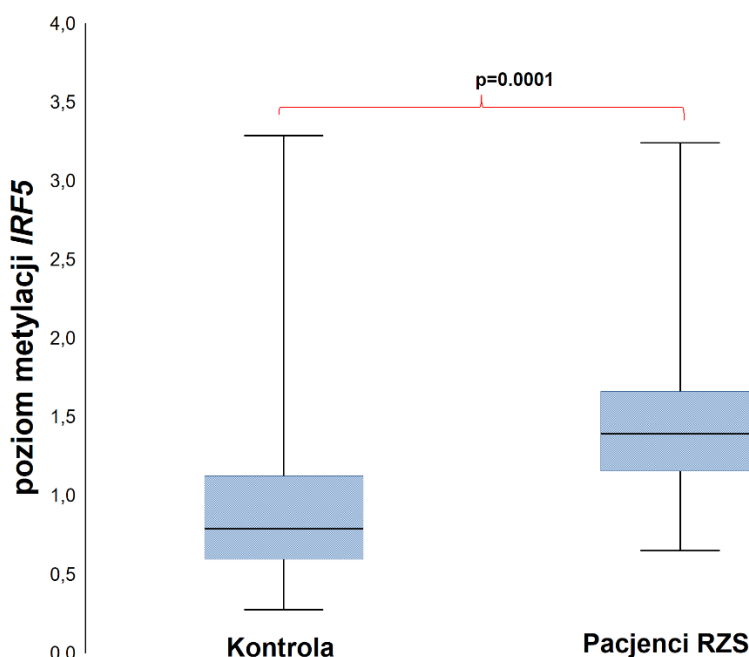
Analizowany parametr	Grupa pacjentów RZS o wysokiej aktywności choroby, n=30	Grupa pacjentów RZS w remisji n=22	Wartość p pomiędzy analizowanymi parametrami
Wiek (lata)	53.6±12.3	48.7±12.7	0.21
Kobiety; n (%)	22 (73.3)	21 (95.5)	0.09
Czas trwania choroby (lata)	10 [2-16]	9.5 [3.5-16]	0.96
RF pozytywni; n (%)	23 (76.7)	12 (54.5)	0.17
ACPA pozytywni; n (%)	29 (96.7)	20 (90.9)	0.78
OB (mm/h)	54 [28-67]	7 [2-11.5]	<0.0001
CRP (mg/dl)	15.72 [8.54-27.2]	0.45 [0.13-4.09]	<0.0001
VAS PGA	67.5 [52-73]	8 [3-9.5]	<0.0001
VAS PhGA	59 [49-70]	5 [1.5-7]	<0.0001
Leczenie:			
co najmniej Methotrexat, n (%)	23 (76.7)	15 (68.2)	0.72
co najmniej leczenie biologiczne, n (%)	7 (23.3)	11 (50)	0.09
Co najmniej sterydoterapia, n (%)	23 (76.7)	7 (31.8)	0.003
Pojedyncza linia leczenia, n (%)	4 (13.3)	7 (31.8)	0.2
Metotrexat, n (%)	2 (6.7)	3 (13.6)	0.71
Leczenie biologiczne, n (%)	0	1 (4.5)	0.88
Leczenie sterydami, n (%)	1 (3.3)	0	0.88
inne cDMARD, n (%)	1 (3.3)	3 (13.6)	0.39
Podwójna linia leczenia, n (%)	17 (56.7)	10 (45.5)	0.6
Methotrexat+Sterydy, n (%)	13 (43.3)	1 (4.5)	0.0051
Methotrexat+leczenie biologiczne, n (%)	2 (6.7)	4 (18.2)	0.4
Leczenie sterydami+leczenie biologiczne, n (%)	0	1 (4.5)	0.88
Inne, n (%)	2 (6.7)	4 (18.2)	0.4
Potrójna linia leczenia, n (%)	9 (30)	5 (22.7)	0.79

Dane zostały zaprezentowane jako: średnia±odchylenie standardowe, liczba (odsetek) lub mediana [przedział międzykwartyłowy]. Skróty: ACPA (ang. Anti-citrullinated protein antibodies), przeciwciała przeciwko cyklicznemu cytrulinowanemu peptydowi; CRP (ang. C Reactive Protein), białko C-reaktywne; cDMARD (ang. Classical Disease-Modifying Antirheumatic Drugs), klasyczne leki modyfikujące przebieg choroby; OB, Odczyn Biernackiego; RF (ang. Rheumatoid Factor), czynnik reumatoidalny; VAS PhGA, (ang. visual analog scale physician global assessments) wizualna skala analogowa wykonana przez lekarza; VAS PGA, (ang. visual analog scale patient global assessments), wizualna skala analogowa wykonana przez pacjenta.

4.1.1. IRF5

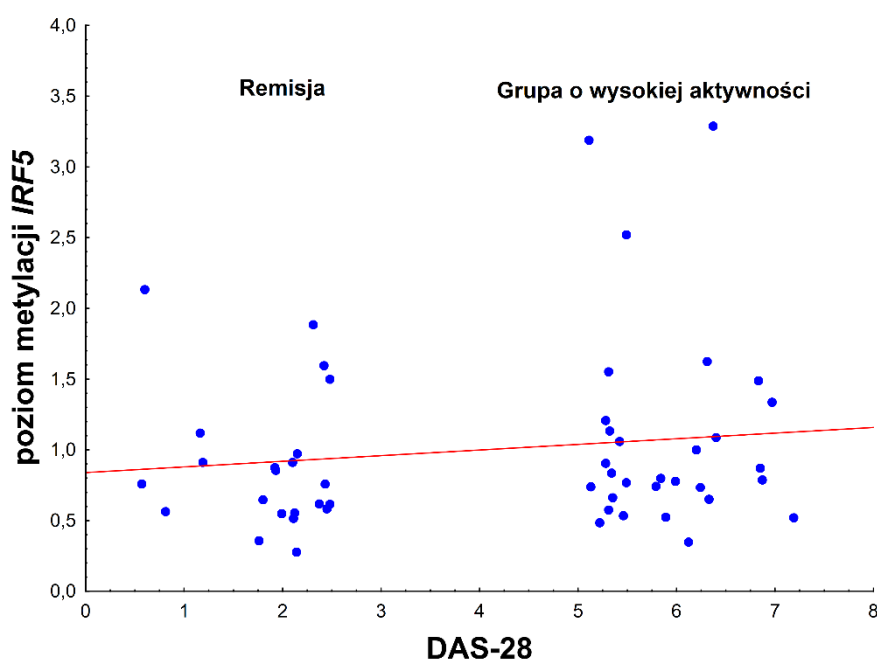
Pacjenci z grupy RZS wykazali o 43,6% niższy stopień metylacji wybranego rejonu promotorowego w stosunku do grupy kontrolnej (mediana, 0.79 [przedział międzykwartylowy 0.6-1.13] vs. 1.4 [1.16-1.66]. $P=0.0001$). Graficznie poziom metylacji między pacjentami a kontrolą przedstawia Rycina 4. Nie stwierdzono natomiast różnic pomiędzy poziomem metylacji między grupą o wysokiej aktywności a remisją (0.82 [0.66-1.21] vs. 0.76 [0.56-0.97], $P=1$), aczkolwiek wykazano różnicę w poziomie metylacji porównując ze sobą grupę o wysokiej aktywności i grupę kontrolną oraz remisję i grupę kontrolną ($P=0,005$ oraz $P=0,0005$, odpowiednio). Poziomy metylacji w grupie o wysokiej aktywności oraz remisji były odpowiednio o 41,4% oraz 45,7% niższe w porównaniu do grupy kontrolnej (Rycina 4) i były podobne dla metylacji obserwowanej dla całej grupy pacjentów RZS włączonych do tej części badań. Generalnie grupy nie różniły się sposobem leczenia, z tym wyjątkiem, że w grupie o wysokiej aktywności większa liczba pacjentów była leczona sterydami, co jest zgodne z obowiązującym podejściem do prowadzenia terapii. Co więcej, główny lek używany w terapii – metotrexat był stosowany u większości chorych w podobnych dawkach (20 [15-25] vs. 20 [12.5-25] mg/tydzień, $P=0.41$). Poziom metylacji nie korelował z wartościami OB ($r_s=0.16$), CRP ($r_s=0.06$) i DAS-28 ($r_s=0.08$). Graficznie brak korelacji pomiędzy poziomem metylacji, a aktywnością choroby został pokazany na Rycinie 5.

Rycina 4. Różnice w poziomie metylacji IRF5 pomiędzy kontrolą a pacjentami.



Wykres ramka-wąsy. Ramka reprezentuje medianę oraz przedział międzykwartylowy; wąsy-zakres.

Rycina 5. Wykres korelacji pomiędzy poziomem metylacji IRF5 a aktywnością choroby wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów.



4.1.2 SOCS3 oraz IL6R

Pacjenci RZS i zdrowa kontrola nie różnili się profilem metylacji wybranych rejonów promotorowych dla obu genów *SOCS3* oraz *IL6R*. Żaden z badanych pacjentów nie uzyskał wartości Ct (*ang. cycle threshold*) poniżej założonego w metodyce punktu odcięcia stanowiącego 1% zmetylowanych sekwencji DNA.

4.2. GENOTYPOWANIE

Spośród 122 pacjentów, 82 było RF pozytywnych, a 40 RF negatywnych. Oznaczanie polimorfizmów wykonano również dla grupy kontrolnej biorącej udział w analizie metylacji (n=24). Szczegółową charakterystykę pacjentów włączonych do genotypowania przedstawia Tabela 8.

Tabela 8. Charakterystyka pacjentów włączonych do analizy genetycznej.

Analizowany parametr	RZS RF-pozytywni, n=82	RZS RF-negatywni, n=40	P-value	RZS cała grupa n=122	Kontrola n=24	P-value RZS całość vs. HC
Wiek (lata)	53.9±12.4	48.7±11.5	0.02	52.2±2.3	52.9±8.6	0.99
Kobiety; n (%)	69 (84.1)	34 (85)	0.89	103 (84.4)	18 (75)	0.41
Czas trwania choroby (lata)	11 [4-19]	10 [4-16]	0.66	10 [3-16]	n/a	n/a
RF pozytywni; n (%),	82 (100)	0	n/a	82 (67.2)	brak	n/a
ACPA pozytywni; n (%)	78 (95.1)	26 (65)	<0.0001	104 (85.2)	brak	n/a
OB. (mm/h)	27 [13-51]	21 [10.5-35]	0.08	26 [8-57.5]	15 [7-19]	0.001
CRP (mg/dl)	4.1±1.5	3.7±1.7	0.22	3,9±1.6	n/a	n/a
DAS-28	8.2 [1.39-17.47]	3.41[0.47-15.72]	0.22	8.54 [0.53-19.12]	0.58 [0.19-1.97]	<0.0001
VAS PGA	28 [9-62]	27 [10.5-54]	0.94	27 [9-61]	n/a	n/a
VAS PhGA	20 [5-50]	20 [10.5-44.5]	0.62	20 [7-49]	n/a	n/a

Dane zostały zaprezentowane jako: średnia±odchylenie standardowe, liczba (odsetek) lub mediana [przedział międzykwartylowy]. Skróty: proszę odnieść się do Tabeli 7.

4.2.1. IRF5

Dokładny rozkład genotypów oraz frekwencję wariantu przedstawia Tabela 9. Rozkład genotypów dla *IRF5* z uwzględnieniem modeli genetycznych: kodominacji, dominacji, nad-dominacji oraz recesywnego został przedstawiony w Tabeli 10.

Frekwencja genotypów dla polimorfizmu *IRF5* rs4728142 były następujące GG= 32 (26.2%); GA= 57 (46.7%), AA=33 (27%), natomiast dla *IRF5* rs10488631: TT=82 (67.2%), TC=37 (30.3%), CC=3 (2.5%). Frekwencja wariantu dla pierwszego polimorfizmu (suma obu genotypów GA i AA, model genetyczny dominujący) była znacząco niższa ($BF_{10}=3,68$; $P=0.037$) w grupie RF pozytywnej (n=56, 68.3%) w porównaniu do grupy seronegatywnej pod względem RF (n=34, 85%).

Frekwencja wariantu (oba genotypy TC i TT, model genetyczny dominujący) dla *IRF5* rs10488631 była nieznacząco różna ($BF_{10}=1,949$; $P=0.08$) pomiędzy grupą RF pozytywnych (n=23, 28%) a RF negatywnych pacjentów (n=17, 43.5%). Rozkład obu genotypów był zgodny z prawem Hardy-Weinberg 'a ($P=0.47$ oraz $P=0.62$, odpowiednio). Analizowane SNP

pozostają w równowadze sprzężenia. Zależność, czy analizowane SNP pozostają w LD przedstawia Rycina 6.

Poziom metylacji w odniesieniu do rs10488631 wśród osób biorących udział w analizie metylacji (n=72) był różny w zależności do genotypu. Heterozygoty TC (n=22) miały o około 24% niższy poziom metylacji w porównaniu do homozygot TT (n=54) (0.82 [0.55-1.20] vs. 1.08 [0.74-1.60], $P=0.045$). W analizowanej grupie nie było homozygot CC. Pacjenci nie różnili się poziomem metylacji w zależności od genotypu w SNP rs4728142.

Rycina 6. Związek pomiędzy analizowanymi polimorfizmami w genie IRF5.

Query SNPs:

rs10488631 (chr7:128594183)

rs4728142 (chr7:128573967)

CEU Haplotypes:

rs4728142

A G

C | 18 | 4 | 22 (0.111)

rs10488631 -----

T | 60 | 116 | 176 (0.889)

78 120 198

(0.394) (0.606)

T_G: 116 (0.586)

T_A: 60 (0.303)

C_A: 18 (0.091)

C_G: 4 (0.02)

D': 0.7

R2: 0.0942

Chi-sq: 18.6577

p-value: <0.0001

rs10488631 and rs4728142 are in linkage equilibrium

Tabela 9. Rozkład genotypów i frekwencja wariantu dla badanych polimorfizmów w genie IRF5.

Polimorfizm <i>IRF5</i>		Ilość nosicieli, n (%)				
		RZS RF-pozytywni, n=82	RZS RF-negatywni, n=40	RZS całościowo, n=122	Kontrola, n=24	Pacjenci włączeni do analizy metylacji, n=76
rs4728142	Allel/Genotyp					
	MAF (allel A)	46.3%	58.8%	50.4%	45.8%	48%
	GG	26 (31.7)	6 (15)	32 (26.2)	7 (29.2)	24 (31.6)
	GA	36 (43.9)	21 (52.5)	57 (46.7)	12 (50)	31 (40.8)
	AA	20 (24.4)	13 (32.5)	33 (27)	5 (20.8)	21 (27.6)
rs10488631	Allel/Genotyp					
	MAF (allel C)	14.6%	23.4%	17.6%	12.5%	14.5%
	TT	59 (72)	23 (57.5)	82 (67.2)	18 (75)	54 (71.1)
	TC	22 (26.8)	15 (37.5)	37 (30.3)	6 (25)	22 (28.9)
	CC	1 (1.2)	2 (5)	3 (2.5%)	0	0

Skróty: MAF – frekwencja allelu drugorzędowego (ang. minor allele frequency).

Tabela 10. Rozkład genotypów dla polimorfizmów w genie IRF5 w zależności od modelu genetycznego.

Polimorfizm IRF5	Model	RF-pozytywni, n=82	RF-negatywni, n=40	OR (95% CI)	P value	Fisher's exact P value
rs4728142	Ko-dominacja 1GG vs.GA	26 (31.7) vs. 36 (43.9)	6 (15) vs. 21 (52.5)	2.53 (0.88-7.24)	0.068	0.06
	Ko-dominacja 2GG vs. AA	26 (31.7) vs. 20 (24.4)	6 (15) vs. 13 (32.5)	2.81 (0.89-8.91)	0.065	0.59
	Dominacja GA+AA vs. GG	56 (68.3) vs. 26 (31.7)	34 (85) vs. 6 (15)	0.38 (0.14-1.03)	0.0416	0.037
	Nad-dominacja GA vs. GG+AA	36 (43.9) vs. 46 (56.1)	21 (52.5) vs. 19 (47.5)	0.71 (0.33-1.52)	0.37	0.24
	Recesywny AA vs. GA+GG	20 (24.4) vs. 62 (75.6)	13 (32.5) vs. 27 (67.5)	0.67(0.29-1.55)	0.35	0.23
rs10488631						
	Ko-dominacja 1TT vs.TC	59 (72) vs. 22 (26.8)	23 (57.5) vs. 15 (37.5)	1.74 (0.77-3.98)	0.18	0.13
	Ko-dominacja 2TT vs. CC	59 (72) vs. 1 (1.2)	23 (57.5) vs. 2 (5)	5.13 (0.42-61.5)	0.17	0.21
	Dominacja TC+CC vs. TT	23 (28) vs. 59 (72)	17 (42.5) vs. 23 (57.5)	0.53 (0.24-1.17)	0.11	0.08
	Nad-dominacja TC vs. TT+CC	22 (26.8) vs. 60 (73.2)	15 (37.5) vs. 25 (62.5)	0.61 (0.27-1.38)	0.23	0.16
	Recesywny CC vs. TT+TC	1 (1.2) vs. 81 (98.8)	2 (5) vs. 38 (95)	0.23 (0.02-2.73)	0.22	0.25

Skróty: CI, confidence interval (przedział ufności); OR – odds ratio (przedział ufności). Wartości p istotne statystycznie zostały wytłuszczone.

4.2.2. *SOCS3*

Dokładny rozkład genotypów oraz frekwencję wariantu przedstawia Tabela 11. Rozkład genotypów dla *SOCS3* z uwzględnieniem modeli genetycznych: kodominacji, dominacji, nad-dominacji oraz recesywnego został przedstawiony w Tabeli 12.

Frekwencja genotypów dla polimorfizmu *SOCS3* rs4969168 G>A były następujące: GG= 95 (77.9%), GA=24 (19.7%); AA= 3 (2.5%), a dla polimorfizmu *SOCS3* rs4969170 G>A przedstawiały się następująco: GG= 58 (47.5%), GA=51 (41.8%); AA= 13 (10.7%). Częstość genotypu z wariantem (oba genotypy GA oraz AA, model dominujący, Tabela 12) dla *SOCS3* rs4969168 było nie znacząco niższe ($P=0.22$) w grupie RF pozytywnej ($n=15$, 18.3%) w porównaniu do grupy RF negatywnej ($n=12$, 30%). Frekwencja genotypu z wariantem dla *SOCS3* rs4969170 (oba genotypy TC i TT) była zbliżona w obu grupach ($P=0.56$). W RF pozytywnej grupie była na poziomie 50% ($n=41$), a w grupie RF negatywnej wyniosła 57.5% ($n=23$). W modelu nad-dominującym zaobserwowano znacząco wyższą frekwencję genotypu GA w grupie RF-negatywnej w porównaniu do grupy RF-pozytywnej, frekwencje te wyniosły odpowiednio: $n=12$ (30%) vs. $n=12$ (14.6%), $P=0.0412$.

Rozkład genotypów dla obu polimorfizmów w *SOCS3* był zgodny z prawem Hardy-Weinberg 'a ($P=0.33$ oraz $P=0.72$, odpowiednio). Analizowane SNP pozostają w korelacji ze sobą, zgodnie z wynikami analizy narzędziem LDlink (Rycina 7). Nie było zależności pomiędzy haplotypami w grupie RF-pozytywnej i RF-negatywnej.

Rycina 7. Związek pomiędzy badanymi polimorfizmami w genie *SOC3*

Query SNPs:
rs4969168 (chr17:76353793)
rs4969170 (chr17:76360538)
CEU Haplotypes:
rs4969170
A G

A 25 1 26 (0.131)
rs4969168 -----
G 43 129 172 (0.869)

68 130 198
(0.343) (0.657)
G_G: 129 (0.652)
G_A: 43 (0.217)
A_A: 25 (0.126)
A_G: 1 (0.005)
D': 0.9414
R2: 0.2561
Chi-sq: 50.7121
p-value: <0.0001
rs4969168(A) allele is correlated with rs4969170(A) allele
rs4969168(G) allele is correlated with rs4969170(G) allele

Tabela 11. Rozkład genotypów oraz frekwencję wariantu dla badanych polimorfizmów w genie SOCS3.

Polimorfizm <i>SOCS3</i>		Ilość nosicieli, n (%)				
		RZS RF- pozytywni, n=82	RZS RF-negatywni, n=40	RZS całościowo, n=122	Kontrola, n=24	Pacjenci włączeni do analizy metylacji, n=76
rs4969168	Allel/Genotyp					
	MAF (allel A)	11%	15%	12.3%	10.4%	6.6%
	GG	67 (81.7)	28 (70)	95 (77.9)	19 (79.2)	66 (86.8)
	GA	12 (14.6)	12 (30)	24 (19.7)	5 (20.8)	10 (13.2)
	AA	3 (3.7)	0	3 (2.5)	0	0
rs4969170	Allel/Genotyp					
	MAF (allel A)	29.9%	35%	31.6%	45.8%	30.9%
	GG	41 (50)	17 (42.5)	58 (47.5)	7 (29.2)	36 (47.4)
	GA	33 (40.2)	18 (45)	51 (41.8)	12 (50)	33 (43.4)
	AA	8 (9.8)	5 (12.5)	13 (10.7)	5 (20.8)	7 (9.2)

Skróty: proszę odnieść się do Tabeli 9

Tabela 12. Rozkład genotypów dla polimorfizmów w genie SOCS3 w zależności od modelu genetycznego.

Polimorfizm <i>SOCS3</i>	Model	RF-pozytywni, n=82	RF-negatywni, n=40	OR (95% CI)	P value	Fisher's exact P value
rs4969168	Ko-dominacja 1 GG vs. GA	67 (81.7) vs. 12 (14.6)	28 (70) vs. 12 (30)	2.39 (0.95-6.02)	0.06	0.0504
	Ko-dominacja 2 GG vs. AA	67 (81.7) vs. 3 (3.7)	28 (70) vs. 0	N/A		0.36
	Dominacja GA+AA vs. GG	15 (18.3) vs. 67 (81.7)	12 (30) vs. 28 (70)	0.52 (0.22-1.27)	0.15	0.11
	Nad-dominacja GA vs. GG+AA	12 (14.6) vs.70 (85.4)	12 (30) vs. 28 (70)	0.4 (0.16-1.00)	0.05014	0.0412
	Recesywny AA vs. GA+GG	3 (3.7) vs. 79 (96.3)	0 vs. 40 (100)	N/A		0.30
rs4969170						
	Ko-dominacja 1 GG vs. GA	41 (50) vs. 33 (40.2)	17 (42.5) vs. 18 (45)	1.32 (0.58-2.97)	0.50	0.32
	Ko-dominacja 2 GG vs. AA	41 (50) vs. 8 (9.8)	17 (42.5) vs. 5 (12.5)	1.51 (0.42-5.39)	0.53	0.37
	Dominacja GA+AA vs. GG	41 (50) vs. 41 (50)	23 (57.5) vs. 17 (42.5)	0.74 (0.34-1.6)	0.44	0.28
	Nad-dominacja GA vs. GG+AA	33 (40.2) vs. 49 (59.8)	18 (45) vs. 22 (55)	0.82 (0.38-1.78)	0.62	0.38
	Recesywny AA vs. GA+GG	8 (9.8) vs. 74 (90.2)	5 (12.5) vs. 35 (87.5)	0.76 (0.23-2.51)	0.65	0.43

Objaśnienia skrótów: proszę odnieść się do Tabeli 10.

4.2.3. *IL6R*

Dokładny rozkład genotypów oraz frekwencję wariantu przedstawia Tabela 13. Rozkład genotypów dla *IL6R* z uwzględnieniem modeli genetycznych: kodominacji, dominacji, nad-dominacji oraz recesywnego został przedstawiony w Tabeli 14.

Frekwencja genotypów dla polimorfizmu *IL6R* rs4129267 C>T były następujące: CC= 66 (54.1%), CT=44 (36.1%); TT= 12 (9.8%). Dla polimorfizmu *IL6R* rs2228145 frekwencje genotypów wyniosły: AA= 57 (46.7%), AC=51 (41.8%); CC= 14 (11.5%).

Częstość genotypu z wariantem rs4129267 (oba genotypy CT i TT, patrz również model dominujący) nieznaczaco wyższe ($P=0.74$) w grupie RF pozytywnej ($n=39$, 47.6%) w porównaniu do pacjentów seronegatywnych pod względem RF ($n=17$, 42.5%). Dla polimorfizmu rs2228145 frekwencja genotypu z wariantem (oba genotypy AC i CC, patrz również model dominujący) były podobne w obu badanych grupach ($P=0.94$), w grupie pacjentów RF pozytywnych frekwencja genotypu z wariantem wyniosła 47.6% ($n=39$) natomiast w grupie RF negatywnych pacjentów była 45% ($n=18$). Rozkład obu opisanych polimorfizmów były zgodne z prawem Hardy-Weinberg'a ($P=0.26$ and $P=0.62$, odpowiednio). Analizowane SNP pozostają w korelacji ze sobą, zgodnie z wynikami analizy narzędziem LDlink (Rycina 9) . Nie było zależności pomiędzy haplotypami w grupie RF-pozytywnej i RF-negatywnej.

Rycina 8. Związek między badanymi polimorfizmami w genie IL6R.

```

Query SNPs:
rs4129267 (chr1:154426264)
rs2228145 (chr1:154426970)

CEU Haplotypes:
      rs2228145
      A    C
      -----
      C | 129 | 0   | 129 (0.652)
rs4129267 -----
      T | 0   | 69  | 69  (0.348)
      -----
      129   69   198
      (0.652) (0.348)
C_A: 129 (0.652)
T_C: 69 (0.348)
C_C: 0 (0.0)
T_A: 0 (0.0)
D': 1.0
R2: 1.0
Chi-sq: 198.0
p-value: <0.0001
rs4129267(C) allele is correlated with rs2228145(A) allele
rs4129267(T) allele is correlated with rs2228145(C) allele

```

Tabela 13. Rozkład genotypów oraz frekwencję wariantu dla badanych polimorfizmów w genie IL6R.

Polimorfizm IL6R		Ilość nosicieli: n (%)				
		RZS RF-pozytywni, n=82	RZS RF- negatywni, n=40	RZS całościowo, n=122	Kontrola, n=24	Pacjenci włączeni do analizy metylacji, n=76
rs4129267	Allel/Genotyp					
	MAF (allel T)	29.9%	25%	28.3%	33.3%	30.9%
	CC	43 (52.4)	22 (55)	65 (53.3)	11 (45.8)	37 (48.7)
	CT	29 (35.4)	16 (40)	45 (36.9)	10 (41.7)	31 (40.8)
	TT	10 (12.2)	2 (5)	12 (9.8)	3 (12.5)	8 (10.5)
rs2228145	Allel/Genotyp					
	MAF (allel C)	30.5%	26.3%	29.1%	43.8%	39.5%
	AA	43 (52.4)	22 (55)	65 (53.3)	3 (12.5)	10 (13.2)
	AC	28 (34.1)	15 (37.5)	43 (35.2)	21 (87.5)	60 (78.9)
	CC	11 (13.4)	3 (7.5)	14 (11.5)	0	0

Skróty: proszę odnieść się do Tabeli 9.

Tabela 14. Rozkład genotypów dla polimorfizmów w genie IL6R w zależności od modelu genetycznego.

Polimorfizm <i>IL6R</i>	Model	RF-pozytywni, n=82	RF-negatywni, n=40	OR (95% CI)	P value	Fisher's exact P value
rs4129267	Ko-dominacja 1 CC vs. CT	43 (52.4) vs. 29 (35.4)	22 (55) vs. 16 (40)	1.08 (0.48-2.42)	0.85	0.51
	Ko-dominacja 2 CC vs. TT	43 (52.4) vs. 10 (12.2)	22 (55) vs. 2 (5)	0.39 (0.08-1.99)	0.22	0.20
	Dominacja CT+TT vs. CC	39 (47.6) vs. 43 (52.4)	18 (45) vs. 22 (55)	1.11 (0.51-2.39)	0.79	0.47
	Nad-dominacja CT vs. CC+TT	29 (35.4) vs. 53 (64.6)	16 (40) vs. 24 (60)	0.82 (0.37-1.8)	0.62	0.38
	Recesywny TT vs. CC+CT	10 (12.2) vs. 72 (87.8)	2 (5) vs. 38 (95)	2.64 (0.54-12.87)	0.19	0.18
rs2228145						
	Ko-dominacja 1 AA vs. AC	43 (52.4) vs. 28 (34.1)	22 (55) vs. 15 (37.5)	1.05 (0.46-2.38)	0.91	0.54
	Ko-dominacja 2 AA vs. CC	43 (52.4) vs. 11 (13.4)	22 (55) vs. 3 (7.5)	0.53 (0.13-2.16)	0.35	0.28
	Dominacja AC+CC vs. AA	39 (47.6) vs. 43 (52.4)	18 (45) vs. 22 (55)	1.11 (0.51-2.39)	0.79	0.47
	Nad-dominacja AC vs. AA+CC	28 (34.1) vs. 54 (65.9)	15 (37.5) vs. 25 (62.5)	0.86 (0.39-1.91)	0.72	0.43
	Recesywny CC vs. AA+AC	11 (13.4) vs. 71 (86.6)	3 (7.5) vs. 37 (92.5)	1.91 (0.5-7.38)	0.32	0.26

Objaśnienia skrótów: proszę odnieść się do Tabeli 10.

4.3. EKSPRESJA MIKRO-RNA

Poziomy ekspresji badanych miRów zostały przedstawione w Tabeli 15.

Tabela 15. Wyniki ekspresji mikro-RNA.

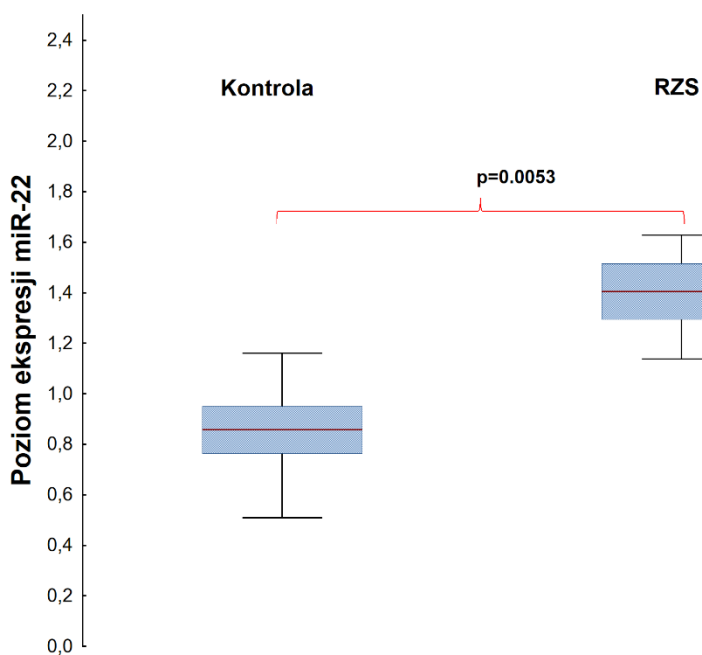
	miR-22	miR-221
Grupa o wysokiej aktywności choroby, n=29	1,59±0,12	1±0,31
Remisja, n=20	1,14±0,19	1,34±0,39
Pacjenci RZS całościowo, n=49	1,39±0,11	1,14±0,24
Zdrowa kontrola, n= 24	0,86±0,09	0,93±0,16

Ekspresja została przedstawiona jako średnia ± błąd standardowy średniej.

4.3.1. MiR-22

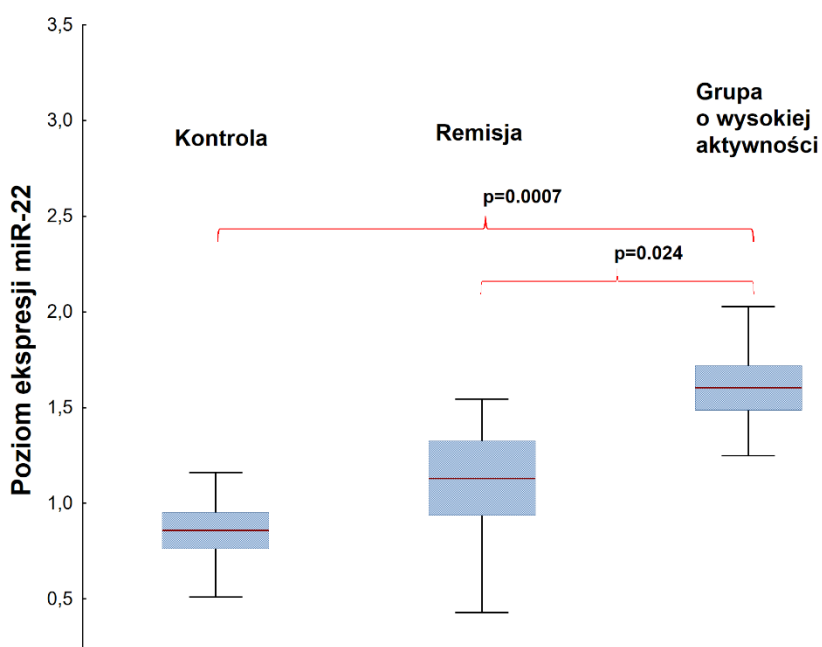
Pacjenci RZS wykazali istotnie wyższą średnią ekspresję miR-22 o około 62% w stosunku do zdrowej kontroli (1,39±0,11 vs. 0,86±0,09; P=0.0053, Rycina 9). Grupa o wysokiej aktywności choroby miała o około 85% wyższy poziom ekspresji niż kontrola (1,59±0,12 vs. 0,86±0,09; P=0.0007, Rycina 10), oraz o około 39% wyższą ekspresję niż remisja (1,59±0,12 vs. 1,14±0,19; P=0.024, Rycina 10). Remisja oraz zdrowa kontrola nie różniły się znacząco pod względem ekspresji miR-22.

Rycina 9. Poziom ekspresji mikro-RNA-22 w grupie kontrolnej oraz u pacjentów.



Wykres ranka-wąsy: ramka reprezentuje średnią $\pm$ błęd Std średniej; wąsy – zakres.

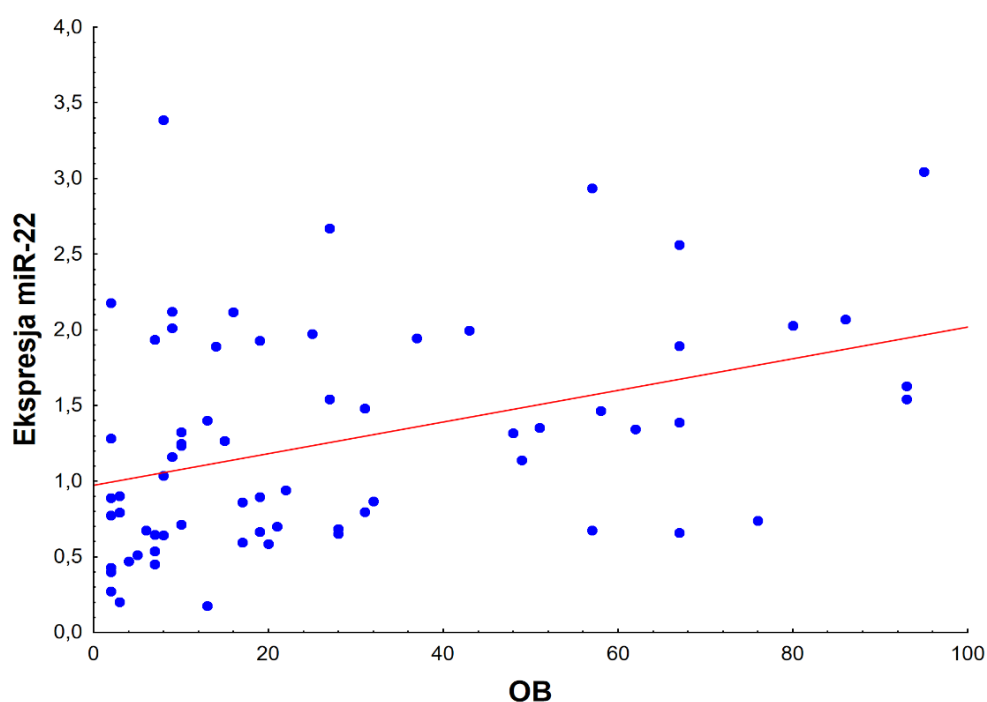
Rycina 10. Poziom ekspresji mikro-RNA-22 w kontroli oraz u pacjentów podzielonych wg aktywności choroby.



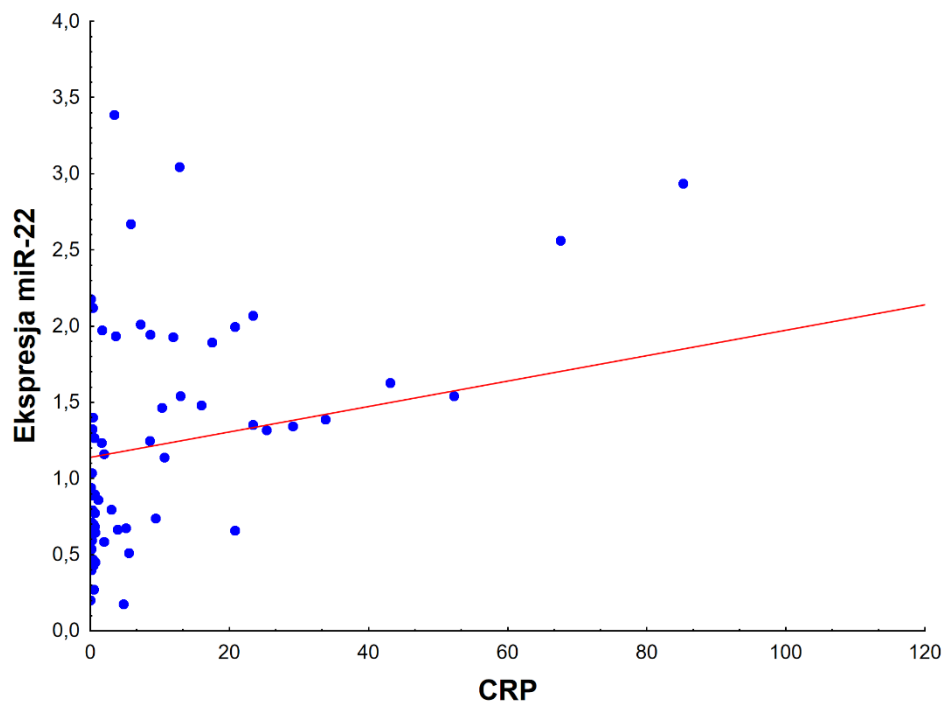
Objaśnienia wykresów: proszę odnieść się do Ryciny 10.

MiR-22 wykazało dodatnią korelację z OB ($r_s=0.42$; Rycina 11), CRP ($r_s=0.47$; Rycina 12) oraz DAS-28 ($r_s=0.32$, porównano tylko pacjentów RZS; Rycina 13). MiR-22 nie wykazało korelacji z poziomem metylacji *IRF5* ($r_s=0.02$) dla całej grupy biorącej udział w analizie metylacji. Porównując tylko pacjentów RZS uzyskano istotną korelację ($r_s=0.3$; Rycina 14) tych dwóch parametrów.

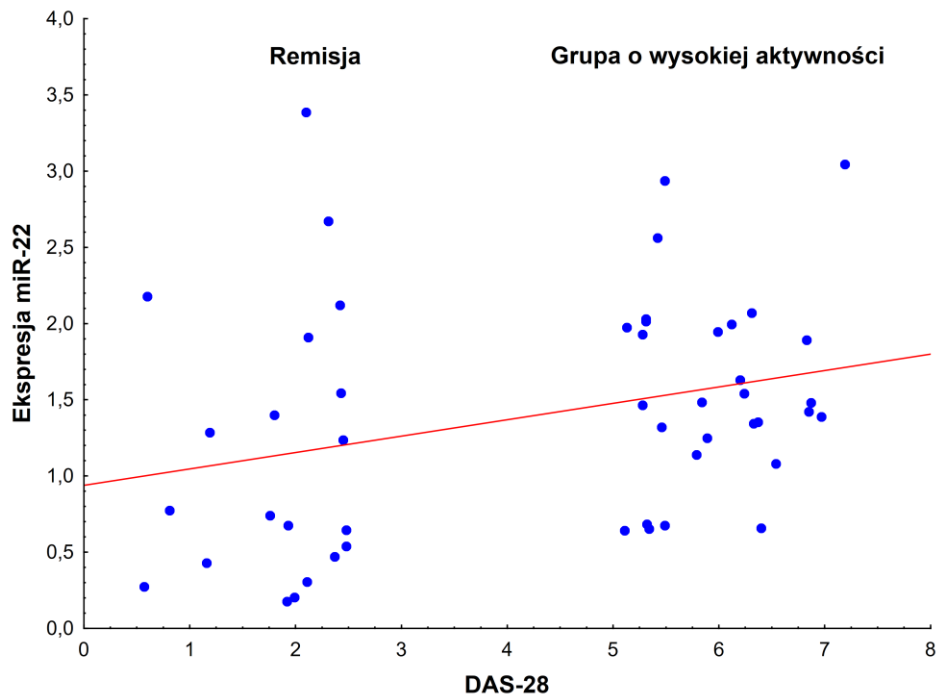
Rycina 11. Korelacja pomiędzy ekspresją mikro-RNA-22 oraz odczynem Biernackiego.



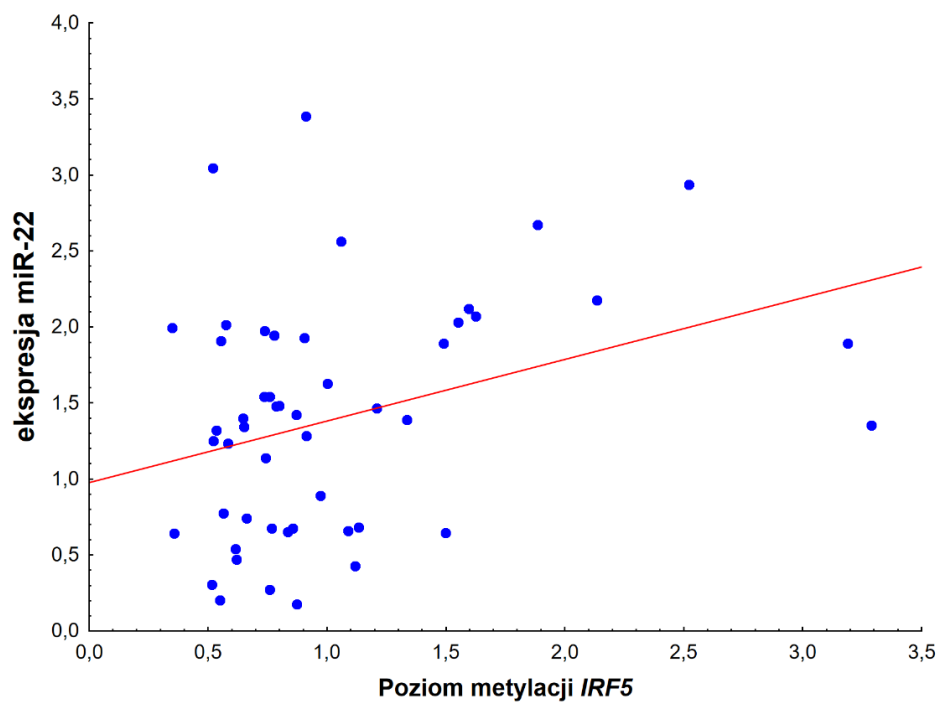
Rycina 12. Korelacja pomiędzy ekspresją mikro-RNA-22 a stężeniem białka C-reaktywnego.



Rycina 13. Korelacja ekspresji mikro-RNA-22 i aktywności choroby wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów.



Rycina 14. Korelacja pomiędzy poziomem ekspresji mikro-RNA-22 a poziomem metylacji IRF5 wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów.



4.3.2. MIR-221

Pacjenci RZS w stosunku do zdrowej kontroli nie różnili się pod względem ekspresji miR-221 ($P=0.22$), również podział pacjentów pod względem aktywności choroby nie uwidocznił różnic między pacjentami a kontrolą ($P=0.45$). MiR-221 nie wykazało korelacji z OB ($r_s = -0.02$), CRP ($r_s = -0.07$) oraz DAS28 ($r_s = 0.03$).

DYSKUSJA

IRF5

Niniejsza praca pokazuje, że poziom metylacji genów w RZSie jest różny i ten typ analizy jest wymagający pod względem zaplanowania doświadczenia jak i jego wykonania. W przebiegu pracy wykazano, po raz pierwszy, że metylacja w obrębie rejonu promotorowego genu *IRF5* odgrywa znaczącą rolę w zachorowalności na RZS oraz nie jest związana z rodzajem przyjmowanej terapii oraz nasileniem choroby.

Badania asocjacyjne w skali genomu (GWAS, *ang. a genome-wide association study*) w połączeniu z badaniami asocjacyjnymi w skali epigenomu (EWAS, *ang. an epigenome-wide association study*) przeprowadzone przez Liu i współ. [73] pokazały ważną rolę metylacji DNA, które może być rozpatrywane jako pośrednik genetycznego ryzyka RZSu. Różnice w poziomie metylacji, przedstawione jako pojedyncze pozycje nukleotydowe o odmiennym stopniu metylacji (DMPs, *ang. differentially methylated positions*) zostały zestawione z genomową mapą SNPs, które stanowiły genetyczne czynniki ryzyka związane z RZSem. Została w ten sposób wytworzona mapa zależności gęstość metylacji i genotypów. Takie pary DMPs-SNP znajdowały się głównie w regionie kodującym HLA. Jeśli chodzi o gen *IRF5* zostały znalezione trzy potencjalne DMPs związane z RZSem, aczkolwiek nie udało się do nich dopasować związanych z nimi polimorfizmów, tak więc metylacja w obrębie *IRF5* nie została zakwalifikowana jako mediator ryzyka genetycznego [73]. Analizując pozycję zaraportowanych DMPs z położeniem regionu, który został badany w tej pracy można dojść do wniosków, że poszukiwano zależności w tym bardzo podobnym rejonie promotora. Dwa spośród trzech zaraportowanych pozycji leżały odpowiednio 71 i 180 nukleotydów od naszego amplifikowanego fragmentu. Wnioski płynące z analizy GWAS-EWAS jasno potwierdzają słuszność wyboru analizowanej sekwencji jako potencjalnej związanej z RZSem. Dodatkowo należy podkreślić, że wybrany rejon jest potencjalnym miejscem przyłączania ważnego czynnika transkrypcyjnego CTCF. Bazując na poprzednich doniesieniach, że zmiany w poziomie metylacji DNA w rejonach odpowiadających za regulację genu tj.: sekwencje do których przyłączają się czynniki transkrypcyjne czy wzmacniacze transkrypcji [9,10] możemy przypuszczać, że badany w niniejszej pracy region może odgrywać ważną funkcję w regulacji *IRF5*. Konsekwencją zmniejszonej metylacji u pacjentów z RZSem może być nadekspresja *IRF5*, który jest odpowiedzialny za ostrą i przewlekłą odpowiedź immunologiczną [20,21]. W tej pracy nie wykazano różnic w poziomie

metylacji pomiędzy pacjentami z grupy o wysokiej aktywności choroby a remisją oraz nie było korelacji pomiędzy poziomem metylacji a markerami stanu zapalnego tj. OB czy CRP jak również z aktywnością choroby wyrażonej przez DAS-28. Projektując doświadczenie spodziewaliśmy się uzyskać wyraźną różnicę pomiędzy grupami o różnej aktywności choroby. Uważaliśmy, że grupa o wysokiej aktywności powinna mieć niski poziom metylacji, a więc potencjalnie wysoki poziom ekspresji *IRF5*. Formułując tą hipotezę badawczą opieraliśmy się na sposobie wyliczania wskaźnika DAS-28. Jednym z jego komponentów jest OB lub CRP (w naszej wartości DAS-28 były wyliczane z OB). Niezależnie od metody trzeba zwrócić uwagę, że CRP jest białkiem ostrej fazy (APP, *ang. an acute phase protein*), natomiast OB jest parametrem laboratoryjnym zależnym od APP. Większość z tych białek jest stymulowana przez IL-6 [74]. *IRF5* jest zaangażowany jako czynnik transkrypcyjny w stymulację produkcji takich cytokin jak IL-6, TNF- α , IL-12 jak również niektórych chemokin [75]. Mylnie założyliśmy, że niskie wartości DAS-28 w remisji mogą być związane z mniejszą produkcją pro-zapalnych molekuł, czyli potencjalnie wyższą metylacją omawianego genu. Niniejsza praca po raz pierwszy dowiodła, że aktywność epigenetyczna tej części promotora dla *IRF5* nie jest związana z aktywnością choroby. Kolejnym wnioskiem płynącym z naszego badania jest niezależność metylacji od leczenia pacjentów. Szeroko stosowane leki w RZSie tj.: metotrexat czy leczenie biologiczne mogą hamować syntezę cytokin, powodując zahamowanie wydzielania APP i mogą w ten sposób wpływać na DAS-28. [76, 77, 78]. Co więcej, nie specyficzne terapeutyki (np.: niesteroidowe leki przeciwzapalne czy sulfalazyna) oraz specyficzne przeciwciała monoklonalne (np. anty-TNF α) mogą również powodować zahamowanie sekrecji chemokin [77, 79]. Istnieje publikację, w których raportowano związek pomiędzy typem leczenia a zmianą w profilu metylacji genów. [30, 80]. Wan i współ. pokazali na grupie pacjentów z przewlekłą obturacyjną chorobą płuc następuje obniżenie poziomu metylacji podczas systemowego leczenia sterydami. Co ciekawe, jednym z raportowanych genów o obniżonej metylacji był inny członek rodziny IRFów – *IRF7*, który podobnie jak *IRF5* jest zaangażowany w ścieżkę sygnałową TLR [80]. Badanie to, jak i wcześniej przytoczony GWAS-EWAS mogą sugerować, że geny z rodziny *IRF* ulegają silnej regulacji epigenetycznej poprzez metylację. W przeciwieństwie do Wana i współ., publikacja Imgenberg-Kreuzer i współ. [30] nie wykazała związku pomiędzy metylacją miejsc CpG a leczeniem glikokortykoidami u pacjentów SLE. W naszej grupie badanej pacjenci o wysokiej aktywności byli leczeni sterydami w przeciwieństwie do tych w remisji (Tabela 7). Poziom metylacji jak wcześniej wspomniano był porównywalny w obu grupach, co sugeruje brak wpływu leczenia sterydami na poziom metylacji w przypadku badanego genu. Dodatkowo

uważamy, że żadna z grup używanych leków nie wpływa na metylację badanego regionu. W naszym badaniu obie grupy pacjentów były ogólnie leczone w podobny sposób (za wyjątkiem sterydów), aczkolwiek żadna z nich nie osiągnęła poziomu metylacji kontroli. Brak różnic w metylacji pomiędzy grupami o wysokiej aktywności choroby i remisją sugeruje, że *IRF5* może być aktywny transkrypcyjnie i może stwarzać szansę do zaostrzenia choroby, dotyczy to głównie przejścia remisji w aktywną fazę choroby. W tym kontekście leki mające za cel *IRF5* mogłyby znaleźć miejsce w leczeniu RZSu. *IRF5* mógłby być hamowany na kilka sposobów np. poprzez genetyczny knock-out lub poprzez post-translacyjną modyfikację przy użyciu kinaz tyrozynowych. Pomimo tego, że tego typu terapie zostały już przetestowane na modelach zwierzęcych lub komórkowych dalsze badania laboratoryjne i testy kliniczne są potrzebne [20, 81, 82, 83]. Można wnioskować, że gen *IRF5* nie uczestniczy tylko w rozwoju RZSu, ale jest kluczowy w innych przewlekłych chorobach autoimmunologicznych, ponieważ podobne wnioski zostały opublikowane dla pacjentów z SLE czy SS [8, 30, 84].

Polimorfizmy w *IRF5* były raportowane głównie w odniesieniu do seronegatywnych pacjentów w różnych europejskich populacjach [25, 85, 86]. W rs10488631 allel ryzyka C był raportowany jako zwiększający poziom ekspresji omawianego genu, indukował w ten sposób stan zapalny u seronegatywnych pacjentów [25]. W przeciwieństwie do tych doniesień Vernerova i współ. [26] wykazali, że ten polimorfizm jest związany z seropozytywnymi pacjentami. W niniejszej pracy nie znaleźliśmy zależności w występowaniu wariantu w tym polimorfizmie ani z grupą RF-pozytywnych ani z RF-negatywnych pacjentów. W odniesieniu do drugiego badanego polimorfizmu, rs4728142 w publikacjach jest raportowany w związku z pacjentami z pozytywnym mianem przeciwciał [31]. Stahl i współ. badali oba omawiane SNP (rs4728142 oraz rs10488631) i wykazali, że ich efekty są niezależne. Z kolei Wang i współ. [25] uważają, że SNP leżące na końcach 5' oraz 3' genów mają jednakowy wpływ na rozwój RZSu. Zgodnie z naszą najlepszą wiedzą, niniejsza praca po raz pierwszy pokazuje związek polimorfizmu rs4728142 z pacjentami RZS RF-ujemnymi, co było by w zgodzie ze wcześniejszymi doniesieniami, że większości polimorfizmów związanych z pacjentami seronegatywnymi leży po stronie 5' genu *IRF5* [25]. Co więcej, nasze obserwacje wspierają hipotezę, że większość genetycznych czynników ryzyka leży po stronie 5' genu i kolejne badania interakcji pomiędzy tymi SNP a zmianami epigenetycznymi w regionie promotora (metylacja) mogą być bardzo cenne z punktu widzenia pozyskania nowych informacji dotyczących zachorowalności i rozwoju RZSu. Oczywiście należy podkreślić, że uzyskane w tej pracy dane z zakresu genotypowania są ograniczone ze względu na małą liczebność próby.

Jak wspomniano wyżej są badania (GWAS-EWAS) poszukujące zależności SNP i poziomu metylacji [73,84]. Imgenberg-Kreuze i współ. [84] pokazali na grupie pacjentów SS związek pomiędzy poziomem metylacji oraz trzema SNP w locus *IRF5-TNPO*, z pośród których jeden stanowił omawiany rs4728142. W niniejszej pracy nie znaleźliśmy co prawda związku pomiędzy metylacją a rs4728142, aczkolwiek drugi z badanych przez nas SNP wykazał związek z poziomem metylacji. Nosiciele genotypów TC w rs10488631 posiadali niższy poziom metylacji. Limitacją tej analizy jest mała liczebność próby badanej, ale dane przedstawione w tej części jak również ze wcześniejszych publikacjach [73,84], mogą sugerować, że metylacja jest może być związana z genotypem i może być rozpatrywana jako mediator ryzyka genetycznego, jak wcześniej zasugerowali Liu i współ [73].

SOCS3* oraz *IL6R

SOCS3 oraz *IL6R* są genami powiązanymi bezpośrednio ze sobą w szlaku sygnałowym IL-6. Praca ta pokazuje, że zachorowalność oraz nasilenie choroby nie zależy od metylacji rejonów regulatorowych badanych w ramach doświadczenia zarówno w rejonie promotorowym *SOCS3* jak i *IL6R*. Praca pokazała, że poziom metylacji u pacjentów z RZSem nie jest inny niż u zdrowej kontroli (wszyscy badani mieli w pełni odmetylowane DNA lub poniżej czułości metody), co może sugerować, że szlak sygnałowy IL-6 we krwi obwodowej jest regulowany poprzez inne mechanizmy. Z analizy literatury wynika, że przeprowadzono tylko jedno badanie, które objęło zakresem analizy jednocześnie oba geny [73]. Liu i współ. W swoim badaniu GWAS-EWAS zaraportowali tylko jedną DMP dla genu *SOCS3* oraz cztery DMP dla *IL6R*. Podobnie jak dla *IRF5* pozycje miejsc metylacji były związane z fenotypem RZSu, aczkolwiek nie udało się dla nich znaleźć związku z SNP będącymi czynnikami ryzyka, tak więc epigenetyczne zmiany w ich obrębie nie zostały zakwalifikowane jako pośrednicy ryzyka genetycznego.

SOCS3 ujemnie wpływa na proces zapalny poprzez czynnik transkrypcyjny STAT3, szczególnie jeśli wpływa dodatkowo na cytokiny posiadające receptor gp130, takie jak: IL-6, IL-11 oraz IL-27 [45]. Liu i współ. [73] zaraportowali jedno miejsce CpG związane z RZSem, które leżało 83 nukleotydy powyżej regionu zbadanego w niniejszej pracy. Nasz badany amplikon leżał w pozycji od -961 do -835 w odniesieniu do TSS i obejmował, podobnie jak w przypadku *IRF5* miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego CTCF, który jest wielofunkcyjną molekułą zaangażowaną w proces transkrypcji, imprintingu oraz długo dystansowej interakcji w obrębie chromatyny. Ujemna korelacja pomiędzy wiązaniem CTCF oraz metylacją DNA została pokazana przez Wanga i współ. [87], tak więc wybór tego regionu

do badań nie był przypadkowy. Co więcej, opisany został mechanizm [88], w którym IL-6 powoduje zwiększenie aktywności DNMT1, który z kolei prowadzi do hipermetylacji promotora *SOCS3*. Tak więc, obie molekuly pozostają w interakcji epigenetycznej. Ponieważ, ze względów metodycznych nie udało się zaprojektować satysfakcjonujących starterów dla promotora IL-6, jako obiekt badań został wybrany receptor dla tej cytokiny. Z przedstawionych powyżej publikacji może wynikać, że *SOCS3* może być regulowany epigenetycznie na drodze metylacji, aczkolwiek krytyczne wydają się aby znaleźć odpowiedni rejon odpowiedzialny za regulację ekspresji genu. Yoshikawa i współ. [89] opisali rejon leżący od -556 do -335 bp w odniesieniu do TSS gdzie wykryli hipermetylację oraz pokazali, że jest to potencjalne miejsce przyłączania miR-122, które może prowadzić do zmniejszenia ekspresji *SOCS3*. Co ciekawe, w obrębie wiązania miR-122 znajduje się również miejsce wiązania czynnika transkrypcyjnego STAT3, tak więc przyłączenie miRa do sekwencji DNA może skutecznie blokować wiązanie STAT3, co może potwierdzać ważną rolę tej części promotora na regulację genu. Z drugiej jednak strony Yoshikawa i współ. pokazali tylko jeden sposób na regulację *SOCS3*. Pracowali na materiale tkankowym pochodzącym z wątroby, a należy zwrócić uwagę, że miR-122 jest specyficzną molekułą dla tej tkanki. W odniesieniu do tej pracy można wnioskować, że użycie bardziej tkankowo specyficznego materiału dla RZSu, jak np. tkanka maziowa dostarczyło by dodatkowych informacji o badanych genach. Dodatkowe badania metylacji DNA są potrzebne, ale wydaje się, że dobrym rozwiązaniem jest poszukiwanie wzajemnych interakcji DNA-miRy. Analizując dane o ekspresji genów w obrębie rodziny *SOCS*, które przedstawili Isomäki i współ. [90] okazuje się że ich ekspresja jest zmieniona u pacjentów z RZSem, aczkolwiek ich ekspresja zależy od populacji komórek. W odniesieniu do *SOCS3* wykazano jego podwyższoną ekspresję głównie w monocytach pochodzących z krwi obwodowej w porównaniu do grupy kontrolnej. Jeśli porównać to badanie do niniejszej pracy (ekspresja vs. metylacja), to Isomäki i współ. używali monojądrzastych komórek krwi obwodowej, natomiast w niniejszej pracy była to krew pełna mrożona. Pomimo tego, że udało się w naszym badaniu osiągnąć limit detekcji 1%, to nie byliśmy w stanie wykryć potencjalnych zmian na poziomie metylacji pomiędzy pacjentami a kontrolą.

Niniejsza praca wskazała, po raz pierwszy, że polimorfizm rs4969168 w *SOCS3* może być związany z RF-negatywnymi pacjentami RZS jeśli przyjmie się nad-dominujący model genetyczny. Modele genetyczne są używane do lepszego zrozumienia interakcji pomiędzy genotypem a określonym fenotypem, głównie w odniesieniu do układu doświadczenia

chorzy-kontrola, aczkolwiek ze względu na brak dostatecznej grupy kontrolnej zostały one zaadoptowane do szukania zależności pacjenci RF-pozytywni RF-negatywni [91,92]. Oba SNP nie były jednocześnie badane w rasie kaukaskiej w odniesie do RZSu. Z analizy literatury wynika, że najprawdopodobniej jest tylko jedna publikacja poszukująca związku między nimi, a RZSem [53], w której jednak badany związek nie został znaleziony. Ciekawe wnioski dotyczące tego polimorfizmu sformułowali Fang i współ. [93], badając częstości występowania genotypów w odniesieniu do zwiększania podatności na astmę u dzieci w populacji chińskiej. Zauważyli oni, że grupa pacjentów z astmą oraz grupa kontrolna różnią się częstościom występowania genotypu AG (model nad-dominujący w tej pracy). Genotyp AG występował częściej u pacjentów z astmą w porównaniu do zdrowej kontroli (60,5% vs. 50,3%). Publikacja ta może potwierdzić, że omawiany polimorfizm może być związany z określonym fenotypem tylko u układzie heterozygotycznym, tak jak to zostało pokazane w niniejszej pracy.

Podsumowując niniejsza część pokazuje, że SNP w obrębie genu *SOCS3* może mieć wpływ na rozwój RZSu. Do potwierdzenia tych wniosków wymagana jest dużo większa grupa pacjentów, gdyż limitacją tej części badań jest ograniczona moc statystyczna testu spowodowana małą grupą badaną. Inne badania z zakresu epigenetyki jak np.: ekspresja miRów skierowanych przeciwko temu genowi, czy badanie modyfikacji histonów mogą dostarczyć cennych informacji na temat omawianego genu.

Gen *IL6R* jest od dawna obiektem zainteresowania wśród badaczy, szczególnie w odniesieniu do potencjalnych korzyści z użycia przeciwciał przeciwko temu receptorowi. [94]. Dla *IL6R* analizowany był rejon promotora do którego może przyłączyć się czynnik transkrypcyjny IRF5. Jak wspomniano wcześniej jest on ważną molekułą odpowiedzialną za proces transkrypcji [95] oraz jest związany z ostrą i przewlekłą odpowiedzią immunologiczną [21]. W niniejszej publikacji nie znaleźliśmy różnic w poziome metylacji pomiędzy pacjentami a kontrolą, natomiast de la Rica i współ. [94] wskazali różnicę w obrębie *IL6R* pomiędzy fibroblastami pacjentów z RZSem (RASFs) a fibroblastami pochodzącymi od pacjentów z zapaleniem kości (OASF). DNA pochodzące z RASF wykazało hypometylację w stosunku do tych z OASF. *IL6R* oraz jego ligand pełnią ważną funkcję w patogenezie RZSu, odpowiadając m.in. za degradację stawów, tak więc być może poszukiwanie zmian metylacji w obrębie np. tkanki maziowej dostarczyło by bardziej cennych informacji niż badanie DNA pochodzącego z krwi pełniej. Co więcej, brak wykrytej metylacji w krwi obwodowej można tłumaczyć szerokościom rozpowszechniania tego receptora na powierzchni dużej liczby

komórek. Dodatkowo poprzez proces ograniczonej proteolizy IL6R lub poprzez alternatywny splicing mRNA może zostać wytworzona rozpuszczalna forma receptora, która może uczestniczyć w procesie trans-sygnałowym [36, 37]. Należy zwrócić uwagę, że przytoczone wcześniej badanie asocjacyjne GWAS-EWAS [73] wskazało cztery potencjalne DMP związane z fenotypem RZSu, co może sugerować potencjalną zmianę metylacji w obrębie omawianego genu. W badaniu asocjacyjnym poszukiwano różnic w metylacji analizując pojedyncze pozycje CpG, natomiast w tej pracy metodyka opierała się w większym stopniu na analizie rejonu regulatorowego np. miejsca wiązania czynnika transkrypcyjnego. Pomimo tego, iż niniejsze badanie oraz to prowadzone przez Liu i współ. były przeprowadzone na krwi obwodowej nie udało nam się znaleźć żadnych różnic pomiędzy pacjentami a kontrolą.

Nie udało się również wykazać różnic we frekwencji badanych SNP zarówno u pacjentów RF-pozytywnych jak i RF-negatywnych. Poprzednie publikacje [40, 96] pokazały możliwy związek polimorfizmów w *IL6R* ze skłonnością do zachorowania na RZS jak również degradacją stawów u pacjentów. Według naszej wiedzy brak jest wcześniejszych prób zbadania związku tych polimorfizmów z seropozytywnymi/seronegatywnymi pacjentami RZS.

Ograniczeniem pracy dotyczącej metylacji DNA jest testowany materiał. Została zbadana zamrożona krew pełną, która zawierała DNA pochodzące ze wszystkich komórek jądrowych, podczas gdy analiza DNA pochodzącego w subpopulacji komórkowych tj. limfocyty T, B, monocyty, neutrofile mogła by być bardziej pomocna w głębszym poznaniu roli badanych genów w RZS. Co prawda istnieją modele estymacji proporcji komórek, aczkolwiek w naszym przypadku były one niedostępne. Wśród nich można wyróżnić dwa podejścia: bezpośrednie i pośrednie. Bezpośrednie podejście polega na przeliczeniu proporcji uzyskanego poziomu metylacji na populację komórek z morfologii krwi. Podejście pośrednie obejmuje głównie predykcje odsetków subpopulacji w oparciu o analizę ekspresji wybranych genów lub metylacji dla subpopulacji wysortowanych komórek. W naszym przypadku nie dysponowaliśmy świeżym materiałem, ani reprezentatywną populacją z której można by było wyizolować poszczególne subpopulacje.[97]. Z drugiej strony krew pełna jest najłatwiejszym do pobrania oraz przechowywania materiałem. Oznacza to, że uzyskane wyniki metylacji *IRF5* mogą być użyte w przyszłości jako nowy molekularny marker. Tak więc, pomimo tego, iż większość badań nad metylacją odbywa się z korektą na subpopulację komórek, to badanie krwi pełniej również może być źródłem wartościowych informacji [98].

Ekspresja miR-22 oraz miR-221

Niniejsza praca pokazuje jako pierwsza związek pomiędzy ekspresją miR-22 a aktywnością RZS mierzonej w osoczu. W toku tej pracy wykazano, również po raz pierwszy, że może istnieć interakcja pomiędzy poziomem miR-22 oraz poziomem metylacji genu *IRF5*, która może popierać wcześniejszy wniosek dotyczący *IRF5* jako by był ważnym elementem związanym z RZSem.

Wcześniejsze badania pokazywały związek miR-22 z takimi jednostkami chorobowymi jak SLE, RZS, choroby psychiczne czy kardiologiczne [14, 54, 55, 56, 57]. W badaniu przedstawionym przez Zhanga i współ. [56] zostali zestawieni ze sobą pacjenci chorzy na SLE, RZS oraz zdrowa kontrola, których osocze zostało profilowane pod kątem ekspresji kilku miRów, w tym miR-22. W odniesieniu do tego miRa wykazano, że występuje on w niższej ekspresji u pacjentów z SLE w porównaniu do zdrowej kontroli (n=20). Również pacjenci z RZSem (n=16) wykazali niższy poziom ekspresji tego miRa. Co prawda nie wykazano związku omawianego miRa z aktywnością SLE, aczkolwiek udowodniono jego potencjalną wartość jako molekularnego markera pozwalającego odróżnić pacjentów SLE od tych z powikłaniem nefropatii toczniowej. Badanie przeprowadzone przez Ouboussada i współ. [57] wykazało istotny związek pomiędzy miR-22 w surowicy a możliwą progresją ze stanu układowej autoimmunizacji do wczesnej fazy RZSu. Wykazali oni, że miR-22 ulega nadekspresji w grupie pacjentów ACPA pozytywnych (bez rozpoznania RZSu) oraz we wczesnej fazie RZSu. Dodatkowo wykazali, że jego poziom ulega silniejszej nadekspresji u pacjentów którzy ulegli progresowi z fazy układowej immunizacji do wczesnego RZSu, co pokazuje jego potencjalną rolę jako markera molekularnego przyczyniającego się do wczesnego rozpoznania choroby. Wyniki przedstawione w tej pracy pokazują dodatkowo, że poziom tego miRa jest zróżnicowany w zależności od aktywności choroby u pacjentów z wieloletnim rozpoznaniem RZSu (średni czas trwania choroby to około 10 lat wśród badanych pacjentów). Aspektem, który jest warty podkreślenia, że w obydwu pracach poziom ekspresji został zbadany w materiale pochodzącym z krwi (surowica/osocze) co znacząco ułatwia jego potencjalne wykorzystanie jako markera. Badania przedstawione przez Perez-Sanchez i współ. [99] wśród pacjentów cierpiących na zeszytniające zapalenie kręgosłupa potwierdzają rolę miR-22 jako markera aktywności przewlekłych chorób zapalnych. W publikacji wykazano, że w osoczu występuje nadekspresja miR-22 u pacjentów w porównaniu do grupy kontrolnej. Co ciekawe, w badaniu zbadano również korelację pomiędzy ekspresją miRów, a parametrami zapalnymi. Wykazano, że miR-22

koreluje z osoczymowym poziomem CRP, TNF α , IL-1 β oraz IL-5. Doniesienie to potwierdza korelację otrzymaną w tej pracy pomiędzy miR-22 a OB czy CRP. Dodatkowo Perez-Sanchez dokonali transfekcji limfocytów (n=3) m.in. sztucznymi transkryptem miR-22. Zmierzono poziome ekspresji w odniesieniu do trzech molekuł: TNF α , IL-1 β oraz IL-5. Okazało się, że poziom ekspresji IL-1 β oraz IL-5 znacząco się obniżył, co udowadnia rolę omawianego miRa w odprowadzi immunologicznej. Kolejną rzeczą, którą wykazano w stosunku do miR-22 był jego związek z aktywnością choroby. Pacjenci zostali podzieleni na dwie grupy: w fazie aktywnej i nieaktywnej na podstawie uszkodzeń strukturalnych mierzonych obecnością lub brakiem syndesmofitów. Obie grupy, podobnie jak w niniejszej pracy nie różniły się czasem trwania choroby. Wykazano, że miR-22 wykazuje wyższą ekspresję u pacjentów z aktywną postacią choroby w stosunku do tych w fazie nieaktywnej, potwierdzając dane uzyskane w tej pracy, iż poziome ekspresji tego miRa wzrasta wraz z aktywnością choroby. Sam miR-22 jako ważny element w autoimmunologicznych zapaleniach stawów został zbadany również na modelach zwierzęcych [100]. Posługując się adjuwantowym modelem zapalenia stawów u szczurów wykazano ważną rolę 8 miRów, w tym omawianego, jako elementów związanych z zapaleniem stawów, wskazując ich rolę w patogenezie oraz ewentualnej odpowiedzi na leczenie celastolem. Sam związek miRów oraz leczenia biologicznego u pacjentów RZS został przedawniony przez Krinstela i współ. [101]. Wykazali oni, na grupie pacjentów ze wczesnym rozpoznaniem RZSu, że niski poziom ekspresji miR-22 w kombinacji z wysoką ekspresją miR-886-3p jest dobrym wskaźnikiem na leczenie adalimumabem. Jak podają Krinstel i współ. około 30% pacjentów z RZSem nie odpowiada na leczenie biologiczne i wymagają oni dobrego markera molekularnego zanim terapia celowana zostanie zastosowana. MiR-22 wydaje się bardzo cenną molekułą z tego punktu widzenia. Po pierwsze ulega ono dobrej ekspresji w osoczu/surowicy, co powoduje że pobranie materiału klinicznego nie jest procedurą inwazyjną. Po drugie ulega on ekspresji zarówno u pacjentów w fazie autoimmunizacji układowej, fazie wczesnego RSZu oraz , co pokazała ta praca u pacjentów z wieloletnim rozpoznaniem, dodatkowo rozdzielając ich na aktywność choroby. Szeroka ekspresja miR-22 w różnych stanach choroby sprawia, że może on spełnić się jako długofalowy marker nasilania choroby.

W odniesieniu do miR-221/222 w tej pracy nie wykazano różnic pomiędzy kontrolą a RZSem. MiR-221. W literaturze mało jest informacji dotyczących związku pomiędzy miR-221 a RZSem [11, 14]. Większość informacji opiera się na publikacji Yanga i współ. [61], którzy wykazali, że poziome ekspresji omawianego miRa jest wyższy w tkance maziowej

oraz w surowicy u pacjentów RZS w porównaniu do kontroli. Wykazali, że nad-ekspresja miR-221 wzmaga produkcję cytokin tj. IL-1 β , IL-6, TNF α czy chemokiny CXCL16, zwiększa proliferację fibroblastów oraz hamuje apoptozę. Dodatkowo wykazano, że miR-221 wpływa na migrację komórek poprzez stymulację ekspresji MMP-3, MMP-9 oraz VEGF. ElAtta i współ. [102] wykazali, że poziom ekspresji miR-221 jest podwyższony w komórkach monojądrzastych pacjentów z RZSem. Wydaje się, że jest to jedyna do tej pory publikacja szukająca również związku pomiędzy nasileniem RZSu a poziomem ekspresji. Należy jednak zwrócić uwagę na liczebności grup badanych. Pacjenci RZS (n=30) zostali podzieleni ze względu na DAS-28 na 3 grupy: niska (n=4), średnia (n=20) i wysoka (n=6). Autorom nie udało się wykazać zależności pomiędzy poziomem ekspresji a aktywnością choroby, jak również pomiędzy poziomem ekspresji a zastosowanym leczeniem. Brak potwierdzenia wyników podanych przez Yanga i współ. oraz ElAtta i współ. dla miR-221 może wynikać z tego że ekspresja jest bardziej ukierunkowana populacyjnie, aczkolwiek miR-221 wydaje się ciekawą molekułą pod kątem jej roli w procesach immunologicznych i dalsze badania nad jej ekspresją są konieczne.

WNIOSKI

1. Profil metylacji genu *IRF5* może być użyty jako nowy molekularny marker RZSu, który jest niezależny od aktywności choroby, leczenia czy markerów zapalnych , tj. OB czy CRP, aczkolwiek może być zależny od genotypu.
2. Ekspresja miR-22 w osoczu może służyć jako molekularny marker aktywności choroby.
3. Włączenie w szerszym zakresie markerów epigenetycznych i genetycznych do diagnostyki/ kryteriów klasyfikacji może pomóc we wcześniejszym rozpoznaniu zaburzeń o charakterze autoimmunologicznym np. w fazie przed-chorobowej.
4. Poszukiwanie związku pomiędzy kilkoma czynnikami molekularnymi tj. metylacja-ekspresja mikro-RNA czy metylacja-polimorfizmy wraz z użyciem narzędzi predykcyjnych może być źródłem cennych informacji dotyczących regulacji ekspresji genów.

SPIS TABEL

Tabela 1. Wyniki analizy predykcji in-silico interakcji gen-mikro-RNA.	22
Tabela 2. Startery oligonukleotydowe użyte do oceny stopnia metylacji oraz walidacji metody dla genów beta aktyny oraz czynnika V regulowanego interferonem.	27
Tabela 3. Startery oligonukleotydowe użyte do oceny stopnia metylacji oraz walidacji metody dla genów supresora III sygnalizacji cytokin oraz receptora dla interleukiny-6.....	28
Tabela 4. Charakterystyka oznaczanych polimorfizmów.	30
Tabela 5. Wykaz dodatkowych odczynników.....	32
Tabela 6. Informacje o użytych oligonukleotydach podczas badania ekspresji mikro-RNA.	34
Tabela 7. Charakterystyka grupy badanej włączonej do analizy metylacji.....	35
Tabela 8. Charakterystyka pacjentów włączonych do analizy genetycznej.....	38
Tabela 9. Rozkład genotypów i frekwencja wariantu dla badanych polimorfizmów w genie IRF5.....	40
Tabela 10. Rozkład genotypów dla polimorfizmów w genie IRF5 w zależności od modelu genetycznego.....	41
Tabela 11. Rozkład genotypów oraz frekwencję wariantu dla badanych polimorfizmów w genie SOCS3.	44
Tabela 12. Rozkład genotypów dla polimorfizmów w genie SOCS3 w zależności od modelu genetycznego.....	45
Tabela 13. Rozkład genotypów oraz frekwencję wariantu dla badanych polimorfizmów w genie IL6R.....	48
Tabela 14. Rozkład genotypów dla polimorfizmów w genie IL6R w zależności od modelu genetycznego.....	49
Tabela 15. Wyniki ekspresji mikro-RNA.....	50

SPIS RYCIN

Rycina 1. Schematyczny proces syntezy miRów i ich oddziaływania na transkrypty. Rycina pochodzi z publikacji Churov i współ. [14]	12
Rycina 2. Oddziaływanie SOCS3 na IL6 poprzez blokowanie szlaku sygnałowego JAK-STAT. Rycina pochodzi z publikacji Carow i współ.. [42]	17
Rycina 3. Obraz przykładowej elektroforezy z etapu walidacji metody.	26
Rycina 4. Różnice w poziomie metylacji IRF5 pomiędzy kontrolą a pacjentami.....	36
Rycina 5. Wykres korelacji pomiędzy poziomem metylacji IRF5 a aktywnością choroby wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów.	37
Rycina 6. Związek pomiędzy analizowanymi polimorfizmami w genie IRF5.	39
Rycina 7. Związek pomiędzy badanymi polimorfizmami w genie SOCS3	43
Rycina 8. Związek między badanymi polimorfizmami w genie IL6R.....	47
Rycina 9. Poziom ekspresji mikro-RNA-22 w grupie kontrolnej oraz u pacjentów.....	51
Rycina 10. Poziom ekspresji mikro-RNA-22 w kontroli oraz u pacjentów podzielonych wg aktywności choroby.....	51
Rycina 11. Korelacja pomiędzy ekspresją mikro-RNA-22 oraz odczynem Biernackiego.	52
Rycina 12. Korelacja pomiędzy ekspresją mikro-RNA-22 a stężeniem białka C-reaktywnego.	53
Rycina 13. Korelacja ekspresji mikro-RNA-22 i aktywności choroby wśród pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów.	53
Rycina 14. Korelacja pomiędzy poziomem ekspresji mikro-RNA-22 a poziomem metylacji IRF5 wśród pacjentów z reumatoidalny zapaleniem stawów.	54

PIŚMIENNICTWO

1. Aletaha, D. *et al.* 2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: An American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative. *Arthritis Rheum.* **62**, 2569–2581 (2010).
2. Yinshi Yue, Y. Y. Microbial Infection and Rheumatoid Arthritis. *J. Clin. Cell. Immunol.* **04**, (2014).
3. McInnes, I. B. & Schett, G. Cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Immunol.* **7**, 429–442 (2007).
4. Bryl, E. & Witkowski, J. M. Układ odpornościowy a reumatoidalne zapalenie stawów. *Forum Med. Rodz.* **2**, 196–207 (2007).
5. McInnes, I. B. & Schett, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. *N Engl J Med* **365**, 2205–2219 (2011).
6. Bal, J. (red. . Gentyka Medyczna i Molekularna. *Warszawa Wydaw. PWN* (2017).
7. Pastinen, T., Ge, B. & Hudson, T. J. Influence of human genome polymorphism on gene expression. *Hum. Mol. Genet.* **15 Spec No**, 9–16 (2006).
8. Miceli-Richard, C. *et al.* Overlap between differentially methylated DNA regions in blood B lymphocytes and genetic at-risk loci in primary Sjögren's syndrome. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 933–940 (2016).
9. Luo, C., Hajkova, P. & Ecker, J. R. Dynamic DNA methylation: In the right place at the right time. *Science* **361**, 1336–1340 (2018).
10. Domcke, S. *et al.* Competition between DNA methylation and transcription factors determines binding of NRF1. *Nature* **528**, 575–579 (2015).
11. Moran-Moguel, M. C., Rio, S. P. Del, Mayorquin-Galvan, E. E. & Zavala-Cerna, M. G. Rheumatoid arthritis and miRNAs: A critical review through a functional view. *J. Immunol. Res.* **2018**, (2018).
12. Lu, J. & Clark, A. G. Impact of microRNA regulation on variation in human gene expression. *Genome Res.* **22**, 1243–1254 (2012).
13. Derghal, A., Djelloul, M., Trouslard, J. & Mounien, L. An emerging role of micro-

- RNA in the effect of the endocrine disruptors. *Front. Neurosci.* **10**, (2016).
14. Churov, A. V, Oleinik, E. K. & Knip, M. Autoimmunity Reviews MicroRNAs in rheumatoid arthritis : Altered expression and diagnostic potential. *Autoimmun. Rev.* **14**, 1029–1037 (2015).
 15. Wiederhold, K. & Passmore, L. A. Europe PMC Funders Group Cytoplasmic deadenylation : Regulation of mRNA fate. **38**, 1531–1536 (2014).
 16. Zerbino, D. R. *et al.* Ensembl 2018. *Nucleic Acids Res.* **46**, D754–D761 (2018).
 17. ENSEMBL genome browser, release 96. Kwiecień 2019. Dostępna z: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000128604;r=7:128937457-128950038.
 18. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Kwiecień 2019. Dostępna z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3663>.
 19. UNIPROT. Kwiecień 2019. Dostępna z: <https://www.uniprot.org/uniprot/Q13568>.
 20. Almuttaqi, H. & Udalova, I. A. Advances and challenges in targeting IRF5, a key regulator of inflammation. *FEBS J.* 1–14 (2018). doi:10.1111/febs.14654
 21. Weiss, M. *et al.* IRF5 controls both acute and chronic inflammation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 11001–11006 (2015).
 22. KEGG database. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. Kwiecień 2019. Dostępna z: https://www.genome.jp/kegg-bin/show_pathway?hsa04620.
 23. Kanehisa, M., Sato, Y., Furumichi, M., Morishima, K. & Tanabe, M. New approach for understanding genome variations in KEGG. *Nucleic Acids Res.* **47**, D590–D595 (2019).
 24. NCBI. National Center for Biotechnology Information. BAZA dbSNP. Kwiecień 2019. Dostępna z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs10488631.
 25. Wang, C. *et al.* Preferential association of interferon regulatory factor 5 gene variants with seronegative rheumatoid arthritis in 2 Swedish case-control studies. *J. Rheumatol.* **38**, 2130–2132 (2011).

26. Vernerova, L. *et al.* A Combination of CD28 (rs1980422) and IRF5 (rs10488631) polymorphisms is associated with seropositivity in rheumatoid arthritis: A case control study. *PLoS One* **11**, 1–15 (2016).
27. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Baza dbSNP. Kwiecień 2019. Dostępna z: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs4728142.
28. D., P., Brown, M., Postlethwaite, B. & Postlethwaite, A. Pathogenesis of Systemic Sclerosis. *Front. Immunol.* **272** (2015).
29. Lindén, M. *et al.* Sex influences eQTL effects of SLE and Sjögren's syndrome-associated genetic polymorphisms. *Biol. Sex Differ.* **8**, 1–12 (2017).
30. Imgenberg-Kreuz, J. *et al.* DNA methylation mapping identifies gene regulatory effects in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **77**, 736–743 (2018).
31. Stahl, E. *et al.* Genome-wide association study meta-analysis identifies seven new rheumatoid arthritis risk loci. *Nat Genet* **42**, 508–514 (2010).
32. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Kwiecień 2019. Dostępna z: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/3570>.
33. ENSEMBL genome browser, release 96. Kwiecień 2019. Dostępna z: https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000160712;r=1:154405193-154469450.
34. UNIPROT. Kwiecień 2019. Dostępna z: <https://www.uniprot.org/uniprot/P08887>.
35. Wielińska, J. *et al.* Interleukin 6 gene polymorphism is associated with protein serum level and disease activity in Polish patients with rheumatoid arthritis. *HLA* **92**, 38–41 (2018).
36. Babon, J. J., Varghese, L. N. & Nicola, N. A. Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Semin. Immunol.* **26**, 13–19 (2014).
37. Dayer, J. M. & Choy, E. Therapeutic targets in rheumatoid arthritis: the interleukin-6 receptor. *Rheumatology (Oxford)*. **49**, 15–24 (2010).
38. NCBI. Natinal Center for biotechnology Information. Baza dbSNP. Kwiecień 2019.

- Dostępna z:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs2228145.
39. Garbers, C. *et al.* The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1842**, 1485–1494 (2014).
 40. van Dongen, J. *et al.* The contribution of the functional IL6R polymorphism rs2228145, eQTLs and other genome-wide SNPs to the heritability of plasma sIL-6R levels. *Behav. Genet.* **44**, 368–382 (2014).
 41. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Baza dbSNP. Kwiecień 2019. Dostępna z:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs4129267.
 42. Hawkins, G. A. *et al.* IL6R Variation Asp358 Ala Is a Potential Modifier of Lung Function in Asthma. **130**, 510–515 (2012).
 43. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Kwiecień 2019. Dostępna z:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/9021>.
 44. ENSEMBL genome browser, release 96. Kwiecień 2019. Dostępna z:
https://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Summary?db=core;g=ENSG00000184557;r=17:78356778-78360077.
 45. Carow, B. & Rottenberg, M. E. SOCS3, a major regulator of infection and inflammation. *Front. Immunol.* **5**, 1–13 (2014).
 46. UNIPROT. Kwiecień 2019. Dostępna z: <https://www.uniprot.org/uniprot/O14543>.
 47. Carow, B. & Rottenberg, M. E. SOCS3, a Major Regulator of Infection and Inflammation. *Front. Immunol.* **5**, 58 (2014).
 48. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Baza dbSNP. Kwiecień 2019. Dostępna z:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs4969168.

49. NCBI. National Center for Biotechnology Information. Baza dbSNP. Kwiecień 2019.
Dostępna z:
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?do_not_redirect&rs=rs4969170.
50. Ekelund, E. *et al.* Elevated expression and genetic association links the SOCS3 gene to atopic dermatitis. *Am. J. Hum. Genet.* **78**, 1060–1065 (2006).
51. Vidal, F. *et al.* Pharmacogenetics of Efficacy and Safety of HCV Treatment in HCV-HIV Coinfected Patients: Significant Associations with IL28B and SOCS3 Gene Variants. *PLoS One* **7**, e47725 (2012).
52. Zheng, Y. Y. *et al.* Association of suppressor of cytokine signalling 3 polymorphisms with insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* **20**, 273–280 (2013).
53. Sun, L. P., Ma, X. L., Liu, H. X., Wang, Y. S. & Li, X. F. No association of polymorphisms in the suppressor of cytokine signaling (SOCS)-3 with rheumatoid arthritis in the Chinese Han population. *Genet. Mol. Res.* **9**, 1518–1524 (2010).
54. Xiong, J. Emerging roles of microRNA-22 in human disease and normal physiology. *Curr. Mol. Med.* **12**, 247–258 (2012).
55. Chen, B. *et al.* miR-22 contributes to the pathogenesis of patients with coronary artery disease by targeting MCP-1.
56. Zhang, H. *et al.* B Cell-Related Circulating MicroRNAs With the Potential Value of Biomarkers in the Differential Diagnosis, and Distinguishment Between the Disease Activity and Lupus Nephritis for Systemic Lupus Erythematosus. *Front. Immunol.* **9**, 1473 (2018).
57. Ouboussad, L. *et al.* Profiling microRNAs in individuals at risk of progression to rheumatoid arthritis. 1–9 (2017). doi:10.1186/s13075-017-1492-9
58. Lin, J. *et al.* A novel p53/microRNA-22/Cyr61 axis in synovial cells regulates inflammation in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheumatol. (Hoboken, N.J.)* **66**, 49–59 (2014).
59. Song, J. *et al.* Potential Value of miR-221/222 as Diagnostic, Prognostic, and Therapeutic Biomarkers for Diseases. *Front. Immunol.* **8**, 56 (2017).

60. He, S. *et al.* Downregulation of miR-221 Inhibits Cell Migration and Invasion through Targeting Methyl-CpG Binding Domain Protein 2 in Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cells. *Biomed Res. Int.* **2015**, 751672 (2015).
61. Yang, S. & Yang, Y. Downregulation of microRNA221 decreases migration and invasion in fibroblastlike synoviocytes in rheumatoid arthritis. *Mol. Med. Rep.* **12**, 2395–2401 (2015).
62. Dreos, R., Ambrosini, G., Perier, R. C. & Bucher, P. The Eukaryotic Promoter Database: expansion of EPDnew and new promoter analysis tools. *Nucleic Acids Res.* **43**, D92-6 (2015).
63. Li, L. & Dahiya, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* **18**, 1427–1431 (2002).
64. Davidović, R. S., Božović, A. M., Mandušić, V. L. & Krajnović, M. M. Methylation-specific PCR: Four steps in primer design. *Cent. Eur. J. Biol.* **9**, 1127–1139 (2014).
65. Thornton, B. & Basu, C. Real-time PCR (qPCR) primer design using free online software. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **39**, 145–154 (2011).
66. Tusnady, G. E., Simon, I., Varadi, A. & Aranyi, T. BiSearch: primer-design and search tool for PCR on bisulfite-treated genomes. *Nucleic Acids Res.* **33**, e9 (2005).
67. Menigatti, M. *et al.* Normal colorectal mucosa exhibits sex- and segment-specific susceptibility to DNA methylation at the hMLH1 and MGMT promoters. *Oncogene* **28**, 899–909 (2009).
68. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
69. Pfaffl, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**, e45 (2001).
70. Busk, P. K. A tool for design of primers for microRNA-specific quantitative RT-qPCR. *BMC Bioinformatics* **15**, 1–9 (2014).
71. Balcells, I., Cirera, S. & Busk, P. K. Specific and sensitive quantitative RT-PCR of miRNAs with DNA primers. *BMC Biotechnol.* **11**, 70 (2011).
72. Machiela, M. J. & Chanock, S. J. LDlink: a web-based application for exploring

- population-specific haplotype structure and linking correlated alleles of possible functional variants. *Bioinformatics* **31**, 3555–3557 (2015).
73. Liu, Y. *et al.* Epigenome-wide association data implicate DNA methylation as an intermediary of genetic risk in rheumatoid arthritis. *Nat. Biotechnol.* **31**, 142–147 (2013).
 74. Charles, P. *et al.* Regulation of cytokines, cytokine inhibitors, and acute-phase proteins following anti-TNF- α therapy in rheumatoid arthritis. *J. Immunol.* **163**, 1521–8 (1999).
 75. Sweeney, S. E. Targeting interferon regulatory factors to inhibit activation of the type I IFN response: implications for treatment of autoimmune disorders. *Cell. Immunol.* **271**, 342–349 (2011).
 76. Hausmann, J. S. Targeting cytokines to treat autoinflammatory diseases. *Clin. Immunol.* (2018). doi:10.1016/j.clim.2018.10.016
 77. Szekanecz, Z., Vegvari, A., Szabo, Z. & Koch, A. E. Chemokines and chemokine receptors in arthritis. *Front. Biosci. (Schol. Ed.)* **2**, 153–167 (2010).
 78. Friedman, B. & Cronstein, B. Methotrexate mechanism in treatment of rheumatoid arthritis. *Jt. Bone Spine* (2018). doi:10.1016/j.jbspin.2018.07.004
 79. Reynolds, G., Cooles, F. A. H., Isaacs, J. D. & Hilkens, C. M. U. Emerging immunotherapies for rheumatoid arthritis. *Hum. Vaccin. Immunother.* **10**, 822–837 (2014).
 80. Wan, E. S. *et al.* Systemic steroid exposure is associated with differential methylation in chronic obstructive pulmonary disease. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **186**, 1248–1255 (2012).
 81. Ban, T. *et al.* Lyn Kinase Suppresses the Transcriptional Activity of IRF5 in the TLR-MyD88 Pathway to Restrain the Development of Autoimmunity. *Immunity* **45**, 319–332 (2016).
 82. Cushing, L. *et al.* IRAK4 kinase activity controls Toll-like receptor-induced inflammation through the transcription factor IRF5 in primary human monocytes. *J. Biol. Chem.* **292**, 18689–18698 (2017).

83. Bussel, J. *et al.* Fostamatinib for the treatment of adult persistent and chronic immune thrombocytopenia: Results of two phase 3, randomized, placebo-controlled trials. *Am. J. Hematol.* **93**, 921–930 (2018).
84. Imgenberg-Kreuz, J. *et al.* Genome-wide DNA methylation analysis in multiple tissues in primary Sjogren's syndrome reveals regulatory effects at interferon-induced genes. *Ann. Rheum. Dis.* **75**, 2029–2036 (2016).
85. Dieguez-Gonzalez, R. *et al.* Association of interferon regulatory factor 5 haplotypes, similar to that found in systemic lupus erythematosus, in a large subgroup of patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **58**, 1264–1274 (2008).
86. Sigurdsson, S. *et al.* Association of a haplotype in the promoter region of the interferon regulatory factor 5 gene with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* **56**, 2202–2210 (2007).
87. Wang, H. *et al.* Widespread plasticity in CTCF occupancy linked to DNA methylation. *Genome Res.* **22**, 1680–1688 (2012).
88. Li, Y. *et al.* IL-6-induced DNMT1 activity mediates SOCS3 promoter hypermethylation in ulcerative colitis-related colorectal cancer. *Carcinogenesis* **33**, 1889–1896 (2012).
89. Yoshikawa, T. *et al.* Silencing of microRNA-122 enhances interferon- α signaling in the liver through regulating SOCS3 promoter methylation. *Sci. Rep.* **2**, 1–10 (2012).
90. Isomaki, P. *et al.* The expression of SOCS is altered in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford)*. **46**, 1538–1546 (2007).
91. Horita, N. & Kaneko, T. Genetic model selection for a case-control study and a meta-analysis. *Meta gene* **5**, 1–8 (2015).
92. Han, S.-A. *et al.* A genetic association analysis of polymorphisms, rs2282695 and rs12373539, in the FOSB gene and papillary thyroid cancer. *Exp. Ther. Med.* **4**, 519–523 (2012).
93. Fang, Y., Ren, X. & Feng, Z. Genetic correlation of SOCS3 polymorphisms with infantile asthma: an evidence based on a case-control study. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 9586–9591 (2015).

94. de la Rica, L. *et al.* Identification of novel markers in rheumatoid arthritis through integrated analysis of DNA methylation and microRNA expression. *J. Autoimmun.* **41**, 6–16 (2013).
95. Smale, S. T. Transcriptional regulation in the immune system: a status report. *Trends in immunology* **35**, 190–194 (2014).
96. Lopez-Lasanta, M. *et al.* Variation at interleukin-6 receptor gene is associated to joint damage in rheumatoid arthritis. *Arthritis Res. Ther.* **17**, 1–8 (2015).
97. Waite, L. L. *et al.* Estimation of Cell-Type Composition Including T and B Cell Subtypes for Whole Blood Methylation Microarray Data. *Front. Genet.* **7**, 23 (2016).
98. Potaczek, D. P. *et al.* Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics* **9**, 539–571 (2017).
99. Perez-Sanchez, C. *et al.* Circulating microRNAs as potential biomarkers of disease activity and structural damage in ankylosing spondylitis patients. *Hum. Mol. Genet.* **27**, 875–890 (2018).
100. Dudics, S., Venkatesha, S. H. & Moudgil, K. D. The Micro-RNA Expression Profiles of Autoimmune Arthritis Reveal Novel Biomarkers of the Disease and Therapeutic Response. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
101. Krintel, S. B. *et al.* Prediction of treatment response to adalimumab: a double-blind placebo-controlled study of circulating microRNA in patients with early rheumatoid arthritis. *Pharmacogenomics J.* **16**, 141–146 (2016).
102. Abo ElAtta, A. S., Ali, Y. B. M., Bassyouni, I. H. & Talaat, R. M. Upregulation of miR-221/222 expression in rheumatoid arthritis (RA) patients: correlation with disease activity. *Clin. Exp. Med.* **19**, 47–53 (2019).

STRESZCZENIE

WSTĘP:

Reumatoidalne zapalenie stawów (RZS) jest chorobą o podłożu autoimmunologicznym, które dotyka około 1% populacji globalnej, w przebiegu której dochodzi głównie do degradacji stawów. Współistnienie genetycznych i środowiskowych czynników ryzyka zwiększa prawdopodobieństwo rozwoju choroby. Do genetycznych czynników zalicza się głównie nosicielstwo alleli ryzyka w układzie HLA. Pomimo dużej wiedzy na temat czynników ryzyka molekularny mechanizm choroby nie został do końca wyjaśniony.

Czynnik V regulowany interferonem (IRF5) jest czynnikiem transkrypcyjnym, który bierze udział w ostrych i przewlekłych odpowiedziach immunologicznych i jest zaangażowany w ścieżkę sygnałową receptorów Toll podobnych, która odgrywa ważną rolę w RZS. Supresor III sygnalizacji cytokin (SOCS3) oraz receptor dla interleukiny 6 (IL6R) są zaangażowane w szlak sygnałowy interleukiny 6 (IL-6), która odgrywa ważną rolę w patogenezie RZS.

CEL:

Głównym celem pracy było oznaczanie markerów molekularnych dla RZS i ich związku z nasileniem choroby, które obejmowały analizę metylacji DNA wybranych genów oraz ekspresję wyselekcjonowanych mikro-RNA (miR). Celem podrzędnym była analiza wybranych polimorfizmów pomiędzy pacjentami RZS pozytywnymi i negatywnymi pod względem czynnika reumatoidalnego (RF).

MATERIAŁY I METODY:

Do badania włączono 122 pacjentów z RZS, z których 82 było RF-pozytywnych, a 40 RF negatywnych oraz 24 zdrowe kontrole. Wśród pacjentów z RZS wybrano 32 o wysokiej aktywności choroby oraz 22 w remisji jak również zdrową kontrolę, którzy zostali włączeni do analizy metylacji DNA i ekspresji miR. Metylacja DNA została oszacowana przy pomocy metylacyjno-specyficznej reakcji łańcuchowej polimerazy (MSP), analiza polimorfizmów oraz ekspresja przy pomocy łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR) w czasie rzeczywistym (Real-time PCR).

WYNIKI:

Dla genu *IRF5* pacjenci RZS wykazali o 43,6% niższy stopień metylacji w stosunku do grupy kontrolnej, aczkolwiek poziom metylacji nie zależał od aktywności choroby. Nie wykazano różnic w metylacji dla genów *SOCS3* oraz *IL6R*. Pacjenci RF-ujemni wykazali wyższą frekwencję w polimorfizmach *IRF5* rs4728142 oraz *SOCS3* rs4969168, aczkolwiek zależało to od zastosowanego modelu genetycznego. Ekspresja miR-22 była wyższa o około 62% w grupie pacjentów z RZSem w stosunku do grupy kontrolnej i była zależna od aktywności choroby.

WNIOSKI:

Zmiany w metylacji *IRF5* we krwi obwodowej mogą być użyte jak nowy molekularny marker RZSu, który nie jest związany z aktywnością choroby. Ekspresja miR-22 stanowi również potencjalny osoczowy marker RZSu, którego ekspresja zależy od nasilenia choroby.

SUMMARY

BACKGROUND:

Rheumatoid arthritis (RA) is an autoimmune disease affecting about 1% of global population, and mainly leads to the joints destruction. Coexistence of the genetic and environmental risk factors increase the probability of disease development. A genetics risk involves mainly HLA risk alleles carriers. Despite of the great knowledge about risk factors the molecular mechanism of disease still remains unclear.

The interferon regulatory factor V (IRF5) is the transcription factor responsible for chronic and acute inflammation, and was involved in Toll-like receptor pathway which plays an important role in RA development. The suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) and interleukin 6 receptor (IL6R) are involved in interleukin 6 signaling pathway, which plays a significant function in pathogenesis of RA.

AIMS:

The main aim of this study was to evaluate the molecular markers of RA and relationship between them and disease severity. Markers analysis involved DNA methylation of selected genes as well as micro-RNA (miR) expression. Secondary challenge was to evaluate the frequency of the single nucleotide polymorphisms (SNPs) between rheumatoid factor (RF) positive and RF-negative RA patients.

MATERIALS AND METHODS:

A total of 122 RA patients, 82 RF-positive and 40 RF-negative as well as 24 healthy controls were enrolled to the study. From RA patients, 32 in high disease activity and 22 in remission were selected. These patients and controls were included in DNA methylation and miR expression assessments. DNA methylation was evaluated by methylation-specific polymerase chain reaction (MSP), real-time polymerase chain reactions were used for SNPs genotyping and miRs expression analysis.

RESULTS:

In *IRF5* gene the methylation level was 43.6% lower in RA patients than in the healthy controls and methylation level was not associated with the disease activity. In *SOCS3* and *IL6R* no differences in methylation states were found. RF-negative patients have had a higher *IRF5* rs4728142 and *SOCS3* rs4969168 SNPs frequency, but it was associated with the used

genetic model. MiR-22 expression was higher about 62% in RA patients than in healthy controls and was associated with disease activity.

CONCLUSIONS:

DNA methylation changes in *IRF5* may be used as a new potential marker of RA in a whole blood which is independent of disease activity. MiR-22 expression may be considered as plasma marker of RA which expression is associated with disease activity.