

Mgr Małgorzata Chmielewska

Rozprawa doktorska: „*Ocena związku globalnej metylacji gDNA oraz lokalnej metylacji wysp CpG genów receptorów estrogenowych z predyspozycją do występowania skoliozy idiopatycznej i jej postaci klinicznej*”,

promotor: prof. dr hab. Małgorzata Kotwicka,

promotor pomocniczy: dr hab. Piotr Janusz.

Streszczenie

Skolioza idiopatyczna (SI) jest to trójpłaszczyznowa, rozwojowa deformacja, która jest najczęściej pojawiającym się schorzeniem kręgosłupa u dzieci oraz młodzieży. Pomimo wielu przeprowadzonych badań, etiopatogeneza skolioz idiopatycznych jest ciągle słabo poznana. Przyjmuje się, iż SI jest schorzeniem o złożonej etiologii warunkowanym między innymi przez czynniki hormonalne, biomechaniczne, o podłożu neuronalnym, czy genetyczne. W ostatnich latach coraz częściej wskazuje się na rolę czynników epigenetycznych w etiopatogenezie SI. Postuluje się, że zależność progresji SI od płci oraz okresu dojrzewania może mieć związek z wpływem estrogenów na rozwój skoliozy idiopatycznej. Ponieważ nie udało się jednoznacznie określić roli estrogenów z występowaniem SI zasugerowano, że może dochodzić do zaburzeń transdukcji sygnału w komórkach docelowych. Estrogeny działają na komórki docelowe przez dwa typy receptorów: receptor estrogenowy 1 (ESR1) oraz receptor estrogenowy 2 (ESR2). W dostępnym piśmiennictwie wskazywany jest również wpływ estrogenów na mięśnie szkieletowe, w których wykazano obecność obu typów receptorów estrogenowych zarówno na poziomie mRNA, jak i na poziomie białka.

Założenia i cele pracy

Wskazuje się, że do elementów modyfikujących przebieg SI mogą należeć również czynniki epigenetyczne. W niewielu publikacjach postuluje się, że badania epigenetyczne są nową perspektywą analizy etiologii i progresji SI. Analizując mechanizmy epigenetyczne w skoliozie idiopatycznej należy pamiętać również o tym, że czynniki oddziałujące na organizm mogą działać lokalnie (na konkretną tkankę) oraz globalnie (na cały organizm).

Celem pracy była ocena poziomu metylacji globalnej genomowego DNA oraz lokalnej w obrębie wybranych regionów regulatorowych genów ESR1 oraz ESR2 w mięśniach grzbietu u chorych ze skoliozą idiopatyczną.

Materiał i metody

Badania zostały podzielone na etapy mające na celu analizę metylacji globalnej, poziomu ekspresji mRNA genów ESR1 oraz ESR2, lokalnej metylacji wysp CpG genów receptorów

estrogenowych oraz powiązania poziomu metylacji lokalnej wysp CpG genów ESR1 i ESR2 z poziomem ekspresji.

Badanie metylacji globalnej zostało przeprowadzone na DNA wyizolowanym z krwi obwodowej pacjentek ze stwierdzoną skoliozą idiopatyczną oraz od zdrowych kobiet z ujemnym wywiadem rodzinnym w kierunku skoliozy. W przypadku analizy poziomu metylacji wysp CpG genów receptorów estrogenowych oraz oceny poziomu ekspresji mRNA genów ESR1 i ESR2 do badań zakwalifikowano pacjentki leczone operacyjnie ze wskazań wynikających z przebiegu SI. Od pacjentek tej grupy, które spełniały kryteria włączenia do badań pobrano próbki krwi obwodowej i tkanek mięśni grzbietu (mięśnie powierzchniowe oraz głębokie ze strony wypukłej i wklęsłej skrzywienia).

Pacjentki zostały poddane badaniu klinicznemu, radiologicznemu i genetycznemu, a z grupy kontrolnej tylko badaniu klinicznemu i genetycznemu. Na podstawie analizy danych klinicznych wyróżniono jednolite podgrupy. W grupie pacjentek ze skoliozą idiopatyczną występowały przypadki ze stwierdzoną niepostępującą oraz postępującą postacią skoliozy idiopatycznej. Ze względu na wiek w momencie rozpoznania skoliozy idiopatycznej wyodrębniono dwie grupy: dziecięcą oraz młodzieńczą. Kolejne podziały oparte były o klasyfikację wg Lenke, w której wyróżniono skoliozy o lokalizacji piersiowej i lędźwiowej głównego skrzywienia oraz skoliozy jednołukowe i dwułukowe. Ze względu na wielkość skrzywienia wyodrębniono dwie grupy (kąt Cobba $\leq 75^\circ$ oraz $> 75^\circ$). Analiza statystyczna przeprowadzona została z użyciem programu Statistica oraz arkusza kalkulacyjnego Excel.

Wyniki

Badanie metylacji globalnej wykazało niższą zawartość metylowanych cytozyn w grupie pacjentek ze skoliozą idiopatyczną, w porównaniu do grupy kontrolnej. Różnica ta nie była istotna statystycznie. Nie wykazano również różnic w poziomie metylacji globalnej między grupami klinicznymi.

Poziom metylacji dwóch dinukleotydów CpG regionu T-DMR1 genu ESR1 różnił się istotnie statystycznie pomiędzy mięśniem powierzchniowym a mięśniami głębokimi grzbietu. W przypadku pięciu CpG regionu T-DMR2 genu ESR1 zaobserwowano różnicę między poziomem metylacji w mięśniu powierzchniowym a mięśniem głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. W obu regionach CpG najwyższy poziom metylacji był obserwowany w mięśniu powierzchniowym. Dodatkowo, w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej poziom metylacji był niższy niż po stronie wypukłej skrzywienia. Różnica była nieistotna statystycznie.

Poziom metylacji regionów T-DMR1 i T-DMR2 genu ESR1 nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy pacjentkami z dziecięcą i młodzieńczą skoliozą idiopatyczną.

Biorąc pod uwagę podział pacjentek na grupy kliniczne stwierdzono brak istotnych różnic w poziomie metylacji T-DMR1 w zależności od wielkości skrzywienia. Poziom metylacji w regionie T-DMR2 różnił się istotnie w przypadku czterech dinukleotydów CpG w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Poziom metylacji był wyższy u pacjentek z kątem

skrzywienia $>75^\circ$. W przypadku mięśni po stronie wypukłej skrzywienia mimo podobnego trendu, różnica nie była istotna statystycznie.

Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie w poziomie metylacji regionów T-DMR1 i T-DMR2 u pacjentek w zależności od lokalizacji oraz liczby łuków skrzywienia.

Na podstawie wyznaczonych wartości kwartyli dla procentowego poziomu metylacji utworzono przedziały obejmujące hipometylację, metylację średnią oraz hipermetylację. W przypadku jednego dinukleotydu regionu T-DMR1 oraz dwóch CpG regionu T-DMR2 wykazano istotną różnicę w przedziałowych wartościach metylacji. Niezależnie od lokalizacji mięśnia dominowała metylacja na poziomie średnim. W mięśniach głębokich grzbietu analizując przedziałowy poziom metylacji nie zaobserwowano istotnych różnic (dla obu badanych regionów) w wyodrębnionych grupach klinicznych. W mięśniu powierzchniowym w regionie T-DMR1 dominował średni poziom metylacji dinukleotydu CpG1 w grupie pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$. W pozostałych przypadkach nie stwierdzono istotnych różnic.

Poziom metylacji dinukleotydów CpG w obu badanych regionach T-DMR genu ESR1 był średnio, silnie lub bardzo silnie skorelowany ze sobą. Analizując korelację pomiędzy poziomem metylacji a ekspresją genu ESR1 wykazano istotną korelację w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia dla jednego dinukleotydu T-DMR1 oraz sześciu CpG T-DMR2. Biorąc pod uwagę podział pacjentek na podgrupy kliniczne zaobserwowano, że poziom metylacji CpG1 regionu T-DMR1 istotnie koreluje z ekspresją ESR1 w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej, zarówno w grupie z dziecięcą i młodzieńczą skoliozą idiopatyczną. W regionie T-DMR2 w tej samej lokalizacji mięśniowej występowała istotna korelacja pomiędzy poziomem metylacji a ekspresją ESR1 większości dinukleotydów CpG w grupie z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną. W grupie pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$ korelacja dotyczyła dwóch dinukleotydów regionu T-DMR1 w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. W drugim badanym regionie, zarówno po stronie wypukłej jak i wklęsłej skrzywienia wykazano istotne korelacje dla większości CpG u pacjentek z kątem Cobba $\leq 75^\circ$. W zależności od

lokalizacji głównego skrzywienia w regionie T-DMR1 zaobserwowano korelację poziomu metylacji z ekspresją w przypadku dwóch dinukleotydów, odpowiednio w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej w lokalizacji piersiowej oraz w mięśniu powierzchniowym pobranym od pacjentek wykazujących lokalizację lędźwiową skrzywienia. Z kolei w regionie T-DMR2 korelacja występowała głównie w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej w lokalizacji lędźwiowej. Niezależnie od liczby łuków skrzywienia, nie wykazano korelacji między poziomem metylacji T-DMR1 a ekspresją ESR1. W regionie T-DMR2 stwierdzono korelację w skrzywieniu dwułukowym dla czterech CpG oraz w jednołukowym dla dwóch dinukleotydów w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej. Istotne statystycznie korelacje pomiędzy poziomem metylacji regionów T-DMR1 i T-DMR2 a ekspresją genu ESR1 były wprost proporcjonalne.

Analiza grupowania aglomeracyjnego, niezależnie od badanej tkanki, pozwoliła na wyodrębnienie dwóch skupień o zróżnicowanym poziomie metylacji. Grupa charakteryzująca się wyższym poziomem metylacji w regionie T-DMR2 wykazywała istotnie

wyższy poziom ekspresji genu ESR1. Dla regionu T-DMR1 nie wykazano różnicy w poziomie ekspresji między wyodrębnionymi skupieniami. Biorąc pod uwagę lokalizację mięśnia analiza aglomeracji wykazała istotną różnicę w poziomie ekspresji między skupieniami regionu T-DMR2 w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Różnic tych nie stwierdzono dla skupień wyznaczonych dla regionu T-DMR1, niezależnie od badanej tkanki.

Poziom metylacji promotora 0N oraz eksonu 0N genu ESR2 nie różnił się istotnie statystycznie między badanymi grupami mięśni.

Biorąc pod uwagę grupy pacjentek z dziecięcą oraz młodzieńczą skoliozą idiopatyczną wykazano różnicę w poziomie metylacji dwóch dinukleotydów CpG promotora 0N. W obu przypadkach poziom metylacji CpG był wyższy u pacjentek z dziecięcą skoliozą idiopatyczną i dotyczył odpowiednio mięśnia głębokiego po stronie wypukłej skrzywienia (CpG15) oraz mięśnia powierzchniowego (CpG16). Poziom metylacji czterech dinukleotydów CpG eksonu 0N różnił się istotnie statystycznie pomiędzy wyróżnionymi grupami w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Wyższy poziom metylacji występował w grupie pacjentek z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną.

Poziom metylacji w promotorze 0N nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy pacjentkami w zależności od kąta Cobba. W eksonie 0N zaobserwowano różnicę w dinukleotydzie CpG16 w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Poziom metylacji był istotnie wyższy u pacjentek z kątem Cobba $\leq 75^\circ$. Zaobserwowano, że

poziom metylacji wszystkich dinukleotydów promotora 0N genu ESR2 nie różnił się istotnie statystycznie pomiędzy grupami w zależności od lokalizacji głównego skrzywienia. Poziom metylacji ośmiu dinukleotydów CpG eksonu 0N głównie w mięśniu głębokim po stronie wypukłej skrzywienia był istotnie wyższy w przypadku pacjentek wykazujących lokalizację piersiową głównego skrzywienia. Dodatkowo w dwóch dinukleotydach zaobserwowano wyższy poziom metylacji w grupie charakteryzującej się lokalizacją piersiową skrzywienia w mięśniu powierzchniowym.

Zaobserwowano istotnie wyższy poziom metylacji CpG14 promotora 0N u pacjentek ze skrzywieniem dwułukowym w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Analizując ekson 0N genu ESR2 wykazano istotnie wyższy poziom metylacji u pacjentek ze skrzywieniem dwułukowym. W przypadku pięciu CpG różnica dotyczyła mięśnia głębokiego po stronie wklęsłej skrzywienia, w dwóch pozostałych mięśnia powierzchniowego.

Na podstawie wyznaczonych wartości kwartyli dla procentowego poziomu metylacji utworzono przedziały obejmujące hipometylację, metylację średnią oraz hipermetylację. W przypadku przedziałów metylacji wyznaczonych na podstawie kwartyli dla promotora 0N genu ESR2 w badanych tkankach dla żadnej z analizowanych 16 dinukleotydów CpG nie uzyskano istotnych różnic w przedziałowym poziomie metylacji.

Analiza przedziałów metylacji dla promotora 0N u pacjentek w zależności od wieku rozpoznania skoliozy idiopatycznej wykazała istotną różnicę w przypadku dwóch dinukleotydów dla mięśni powierzchniowych oraz jednego CpG w mięśniach głębokich po stronie wypukłej skrzywienia. Pacjentki z młodzieńczą skoliozą idiopatyczną w przypadku mięśnia powierzchniowego charakteryzowały się w większości obniżoną metylacją w stosunku do grupy z dziecięcą skoliozą idiopatyczną. W mięśniu głębokim po stronie wypukłej skrzywienia w obu grupach dominowała metylacja na poziomie średnim.

Analizując przedziały metylacji dla promotora 0N u pacjentek z kątem Cobba w przedziałach $\leq 75^\circ$ oraz $>75^\circ$, nie uzyskano istotnej różnicy w żadnej z analizowanych dinukleotydów CpG w badanych tkankach. Również w przypadku grup z piersiową lub lędźwiową lokalizacją głównego skrzywienia, nie uzyskano istotnych różnic w żadnym z analizowanych dinukleotydów CpG, niezależnie od badanej tkanki.

W zależności od liczby łuków skrzywienia wykazano istotną różnicę w przypadku dwóch dinukleotydów promotora 0N. Zarówno w skrzywieniu jednołukowym jak i dwułukowym w przypadku CpG11 dominowała hipometylacja, a w CpG15 metylacja na poziomie średnim.

W przypadku przedziałów metylacji wyznaczonych na podstawie rozstępu kwartyłowego dla eksonu 0N genu ESR2 w badanych tkankach uzyskano istotną różnicę tylko dla jednego dinukleotydu. Niezależnie od lokalizacji mięśnia dominowała hipometylacja. Analizując przedziały metylacji dla eksonu 0N, w zależności od wieku w momencie rozpoznania skoliozy, uzyskano istotną różnicę w przypadku dinukleotydu CpG12 w mięśniu po stronie wklęsłej skrzywienia. Zarówno w grupie z dziecięcą jak i młodzieńczą skoliozą idiopatyczną dominowały przypadki z metylacją średnią.

Analizując przedziały metylacji dla eksonu 0N w zależności od wielkości skrzywienia stwierdzono, że w sześciu dinukleotydach CpG u pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$ dominuje metylacja na poziomie średnim. U pacjentek z kątem Cobba wynoszącym $\leq 75^\circ$ w porównaniu do drugiej grupy było więcej przypadków z hipermetylacją.

Na podstawie przedziałów metylacji dla eksonu 0N stwierdzono różnicę dla dwóch dinukleotydów w zależności od lokalizacji anatomicznej głównego skrzywienia. U pacjentek charakteryzujących się piersiową lokalizacją skrzywienia dominował średni poziom metylacji w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej. Natomiast w drugiej grupie nieznacznie przeważał odsetek przypadków z hipometylacją.

Biorąc pod uwagę przedziały kwartyłowe poziomu metylacji eksonu 0N genu ESR2 stwierdzono różnicę dla dinukleotydów CpG13 i CpG19 w zależności od liczby łuków skrzywienia. W przypadku pierwszego z wymienionych dominowała metylacja średnia u pacjentek ze skrzywieniem dwułukowym (w mięśniu głębokim po stronie wklęsłej). W CpG19 odsetek przypadków z hipometylacją i metylacją średnią był taki sam w skrzywieniu dwułukowym.

Poziom metylacji dinukleotydów CpG w obu badanych regionach genu ESR2 był średnio, silnie lub bardzo silnie skorelowany ze sobą. Obserwowano istotną statystycznie korelację

poziomu metylacji promotora 0N z ekspresją ESR2 po stronie wklęsłej skrzywienia (dziewięć dinukleotydów na szesnastu). Z kolei, po stronie wypukłej korelacja była istotna tylko w przypadku czterech CpG. Analiza korelacji wykazała, że po stronie wypukłej skrzywienia u pacjentek z AIS poziom metylacji siedmiu z szesnastu CpG promotora 0N był odwrotnie proporcjonalnie i istotnie statystycznie skorelowany z ekspresją ESR2. Dodatkowo wykazano istotną, odwrotnie proporcjonalną korelację między poziomem metylacji czterech (z szesnastu) CpG w mięśni głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia u pacjentek z EOIS. Analiza korelacji wykazała z kolei, że wraz ze

wzrostem poziomu metylacji w eksonie 0N stwierdzono zwiększoną ilość mRNA genu ESR2 u pacjentów z AIS w mięśni głębokim po stronie wypukłej skrzywienia.

U pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$ nie zaobserwowano istotnych korelacji między poziomem metylacji promotora 0N a ekspresją genu ESR2. Z kolei w drugiej grupie w większości dinukleotydów poziom metylacji promotora 0N był odwrotnie proporcjonalnie skorelowany z ekspresją ESR2 zarówno w mięśni powierzchniowym, jak i w mięśniach głębokich. Takiego wzoru nie zaobserwowano dla eksonu 0N. W mięśni powierzchniowym u pacjentek z kątem Cobba $>75^\circ$ poziom metylacji kilku dinukleotydów był odwrotnie proporcjonalnie skorelowany z ekspresją ESR2. Korelacja poziomu metylacji promotora 0N z ekspresją ESR2 wykazała istotną statystycznie, średnią odwrotnie proporcjonalną zależność dla czterech dinukleotydów CpG po stronie wklęsłej skrzywienia w lokalizacji piersiowej. Z kolei w lokalizacji lędźwiowej, zarówno w mięśniach powierzchniowych, jak i głębokich zaobserwowano silną oraz bardzo silną odwrotnie proporcjonalną korelację w przypadku dwóch dinukleotydów CpG.

Wykazano również istotną statystycznie, odwrotnie proporcjonalną, średnią i silną korelację między poziomem metylacji sześciu dinukleotydów CpG promotora 0N a ekspresją genu ESR2 w mięśni głębokim po stronie wypukłej skrzywienia jednołukowego. Analiza korelacji poziomu metylacji eksonu 0N z ekspresją ESR2 nie wykazała jednoznacznych zależności.

Analiza grupowania aglomeracyjnego, niezależnie od badanej tkanki, pozwoliła na wyodrębnienie dwóch skupień o zróżnicowanym poziomie metylacji. W przypadku promotora 0N w grupie o niższym poziomie metylacji ekspresja ESR2 była istotnie wyższa. Wyznaczając skupienia w grupach mięśniowych, uzyskano zróżnicowany poziom ekspresji tylko w mięśni głębokim po stronie wklęsłej skrzywienia. Zwiększony poziom metylacji promotora 0N w sposób istotny hamował transkrypcję genu ESR2.

Wnioski

1. poziom metylacji globalnej genomowego DNA pacjentek ze skoliozą idiopatyczną nie różni się istotnie od jego poziomu w zdrowej populacji,
2. pacjentki z różnym obrazem klinicznym SI nie różnią się znamiennej poziomem metylacji globalnej genomowego DNA, co nie stwarza możliwości wykorzystania tej analizy do prognozowania przebiegu tej patologii,

3. wzór metylacji siedmiu badanych dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych T-DMR1 i T-DMR2 genu ESR1 pacjentek ze skoliozą idiopatyczną różni się zmiennie pomiędzy mięśniami powierzchniowymi

a głębokimi grzbietu, różnicy takiej nie wykazuje poziom metylacji promotora 0N i eksonu 0N genu ESR2,

4. pacjentki operowane z powodu skoliozy idiopatycznej wykazują wyższy poziom metylacji dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych genów ESR1 i ESR2 w mięśniach głębokich grzbietu po stronie wypukłej skrzywienia, w porównaniu do strony wklęsłej, co może się wiązać z etiopatogenezą SI,

5. analiza wzoru metylacji dinukleotydów CpG gDNA w obrębie regionów regulatorowych genów ESR1 i ESR2 wykonana w mięśniach grzbietu pacjentek ze skoliozą idiopatyczną wskazuje na obecność dinukleotydów CpG, których poziom metylacji wiąże się z fenotypem klinicznym skoliozy,

6. zaobserwowane w mięśniach grzbietu pacjentek operowanych z powodu skoliozy idiopatycznej zależności pomiędzy poziomem metylacji w obrębie regionów regulatorowych genów ESR1 i ESR2, a ekspresją tych genów wskazują, że ten rodzaj modyfikacji genomu jest istotnym czynnikiem mogącym wpływać na odpowiedzi badanych tkanek na estrogeny.