

Badania epigenomu

w chorobach alergicznych

Epigenome-wide association studies in allergic diseases

SUMMARY

In the pathogenesis of allergic diseases the crucial factors are genetic predisposition and environmental influences. Epigenetic modifications are the molecular mechanisms that mediate these gene-environment interactions. Epigenetic alterations include DNA methylation and histone modifications. This paper reviews the most recent epigenome-wide association studies (EWAS) in allergies. The results suggest the role of epigenetic alterations in the susceptibility to allergic diseases. The epigenetic mechanisms also explain findings from genome studies. These results may be potentially applied in practice e.g. to use epigenetic signatures as diagnostic tools that could improve prediction and therapeutic algorithms in allergic diseases.

W patogenezie chorób alergicznych istotną jest indywidualna predyspozycja genetyczna oraz wpływ czynników środowiskowych. Mechanizmy molekularne pośredniczące w oddziaływaniach genów ze środowiskiem to modyfikacje epigenetyczne. Obejmują one metylację DNA oraz modyfikacje białek histonowych. Niniejsza praca stanowi przegląd najważniejszych badań w skali epigenomu (EWAS) przeprowadzonych w chorobach alergicznych w ciągu ostatnich kilku lat. Wyniki wskazują na istotny udział modyfikacji epigenetycznych w podatności na choroby alergiczne. Znajomość mechanizmów epigenetycznych pozwala również uzupełnić wiedzę na temat zależności obserwowanych w badaniach genetycznych. Odkrycia epigenetyczne w alergiach mogą znaleźć potencjalne zastosowania praktyczne np. zastosowanie profilu zmian epigenetycznych jako narzędzi diagnostycznych, które mogłyby poprawić algorytmy predykcyjne i terapeutyczne chorób alergicznych.

Szczepankiewicz A.: Badania epigenomu w chorobach alergicznych. *Alergia*, 2017,2; 32-35

W rozwoju chorób alergicznych kluczową rolę odgrywa predyspozycja genetyczna. Do tej pory przeprowadzono wiele badań nad genetycznym podłożem alergii/atopii, które wskazały na dziedziczenie wielogenowe chorób alergicznych. Jednakże badania genetyczne nie wyjaśniły przyczyny istotnego wzrostu zachorowań na choroby atopowe w ostatnich 50 latach. Hipoteza wyjaśniająca ten wzrost (higieniczna) wskazuje, że oprócz czynników genetycznych, niezbędnych do rozwoju chorób alergicznych, istotny jest wpływ czynników środowiskowych, zwłaszcza zachodni styl życia, który może prowadzić do dominacji fenotypu Th2 u osób podatnych genetycznie (1-5). Mechanizmy molekularne pośredniczące w oddziaływaniach genów ze środowiskiem to modyfikacje epigenetyczne.

Modyfikacje epigenetyczne

Modyfikacje epigenetyczne polegają na biochemicznej zmianie w obrębie chromatyny, prowadząc do zmiany aktywności transkrypcyjnej genów w regionie podlegającym modyfikacji, bez zmiany sekwencji nukleotydowej w genomie. Zmiany te dotyczą zarówno DNA jak i białek histonowych i wykazano, że mogą być dziedziczone.

W DNA najczęściej obserwuje się metylację cytozyny w obrębie tzw. wysp CpG (dwunukleotydy CpG) zlokalizowa-

nych głównie w regionach regulatorowych genów (promotory, wzmacniacze), co wpływa na ich aktywność transkrypcyjną (niska metylacja – większa aktywność transkrypcyjna). Najlepiej opisane modyfikacje histonów obejmują fosforylację, ubikwitynację, acetylację i metylację (6, 7) np. zwiększona acetylacja lizyny w histonach prowadzi do rozluźnienia chromatyny i większej aktywności transkrypcyjnej regionu.

Epigenetyka jako mediator podatności genetycznej

Znajomość mechanizmów epigenetycznych pozwala uzupełnić wiedzę na temat zależności obserwowanych w badaniach genetycznych. Przykładem może być potwierdzona w kilku badaniach typu GWAS rola locus 17q21 w patogenezie astmy dziecięcej (8, 9). Zaobserwowano, że asocjacja tego regionu chromosomowego jest silniejsza u chłopców, co potwierdziła analiza epigenetyczna, która wykazała niższą metylację DNA w promotorze genu ZPBP2, która zmniejszała się z wiekiem, wyjaśniając asocjację genetyczną zależną od płci i wieku (10).

Innym przykładem może być analiza metylacji DNA przeprowadzona w celu wyjaśnienia asocjacji między stężeniem IgE a polimorfizmem genu RAD50, kodującego cząsteczkę istotną w naprawie DNA (11). Kolejne analizy epigenetyczne w kontekście uwarunkowania alergii dotyczyły genów NPSR1 (12), ALOX12 (13) i ADCYAP1R1 (14). W jednym z najnowszych badań rodzin w skali całego genomu (GWAS) oraz epigenomu (EWAS) zidentyfikowano polimorfizm zlokalizowa-



Dr hab. n. med.
**Aleksandra
Szczepankiewicz**

Pracownia Badań
Komórkowych
i Molekularnych Kliniki
Pneumonologii, Alergologii
Dziecięcej i Immunologii
Klinicznej UM
w Poznaniu

Kierownik Pracowni:
Dr hab. n. med.
Aleksandra
Szczepankiewicz

Kierownik Kliniki:
Prof. dr hab. n. med.
Anna Bręborowicz

Słowa kluczowe:

alergia, badania asocjacyjne w skali epigenomu (EWAS), metylacja DNA, modyfikacje histonów

Key words:

allergy, epigenetic-wide association studies (EWAS), DNA methylation, histone modifications

wany w pobliżu genu MTRN1A istotnie związane z astmą ze współwystępującym alergicznym nieżytem nosa i ten efekt był modyfikowany przez różną metylację intronowej wyspy CpG tego genu (15). W innym dużym badaniu typu GWAS dotyczącym alergii pokarmowej (na białko mleka, jajka i orzeszki ziemne) wykazano, że warianty genetyczne głównych genów ryzyka (HLA-DBR1 i HLA-DQB1) korelowały z różną metylacją DNA, a zmiany epigenetyczne tych genów modyfikowały ryzyko alergii na orzeszki ziemne (16).

Badania EWAS w alergii

Do chwili obecnej przeprowadzono kilka badań typu EWAS (badania asocjacyjne w skali epigenomu, ang. epigenome wide-association studies) w chorobach alergicznych, przy czym większość z nich dotyczyła niewielkich grup badanych, w związku z tym nie wszystkie obserwacje udało się potwierdzić w późniejszych analizach. Znakomita większość tych badań dotyczyła metylacji DNA, a tylko nieliczne przeprowadziły analizy dotyczące modyfikacji histonów.

Zmiany metylacji DNA

Pierwszym badaniem EWAS była praca Somineni i wsp. (17), w której wykazano związaną z astmą utratę metylacji pojedynczej wyspy CpG w obrębie promotora genu TET1 w różnych tkankach (krew obwodowa, ślina, komórki nabłonka oskrzeli).

Badania te wskazały odmienny profil metylacji DNA między chorymi na alergię a osobami zdrowymi i wykazały lepszy potencjał dyskryminacji w porównaniu do badań dotyczących ekspresji genów (18).

Badania EWAS wykazały również, że zmiany w metylacji autosomalnego DNA różnią się istotnie w zależności od płci, porównując do osób zdrowych (19). Wyniki te mogą wskazywać, że zmiany w metylacji DNA mogą być przyczyną obserwowanych różnic w zachorowalności na alergię w zależności od wieku i płci (20-22).

Kwestią otwartą pozostaje wybór właściwej tkanki do badania zmian w metylacji. W badaniach dotyczących atopowego zapalenia skóry (AZS) wykazano, że jedynie próbki skóry wykazały istotne zmiany w metylacji między pacjentami a grupą kontrolną, natomiast różnic tych nie obserwowano we krwi obwodowej (23). Podobną zależność zaobserwowano w astmie, wzór metylacji specyficzny dla astmy wykazano jedynie w komórkach nabłonka oddechowego (24). W najnowszym badaniu dotyczącym analizy metylomu w nabłonku oddechowym nosa w astmie atopowej wykazano, że zmiany epigenetyczne związane z astmą odpowiadają za regulację ekspresji genów związanych z macierzą zewnątrzkomórkową, odpornością, adhezją komórek oraz obturacją niezależnie od wieku, płci rasy i ekspozycji środowiskowej (25). Natomiast analiza epigenetyczna nabłonka oskrzelowego w astmie wykazała istotne zmiany w metylacji genów związanych z homeostazą nabłonka (hypometylacja KRT5 i hypermetylacja STAT5A), nadreaktywnością oskrzeli (hypermetylacja ADAM33) i regulacją FeNO (hypermetylacja ARG2, hypometylacja IL-6 i iNOS) (24, 26-28).

W badaniu EWAS dotyczącym fenotypu związanego z atopią tj. stężenia IgE zaobserwowano związek 36 loci (w 34 genach związanych głównie z regulacją eozynofiliów), których metylacja DNA korelowała ze stężeniem IgE m.in. IL4, IL5RA, LPCAT2, ZNF22, SLC25A33 (29). Ponadto, badanie to wykazało, że zmiany w epigenomie 10-krotnie lepiej wyjaśniają obserwowaną zmienność stężenia IgE w porównaniu do polimorfizmów badanych w analizach GWAS. Najnowsze badanie EWAS dotyczące IgE wykazało, że dla uzyskania wiarygodnych wyników konieczna jest analiza w zależności od typu leukocytów, oraz że najwięcej zmian w metylacji DNA (w genach ZFPM1, ACOT7, MND1) wpływających na stężenie IgE dotyczy eozynofiliów (30).

W najnowszym badaniu dotyczącym astmy dziecięcej wykazano, że jej rozwój rozpoczyna się już w okresie okołourodzeniowym i obejmuje modyfikacje epigenetyczne szlaków zapalnych i immunomodulujących. Szczególnie istotna dla ryzyka astmy była zwiększona metylacja genu SMAD3 u dzieci z astmą i ich matek chorujących na astmę, która korelowała ze zwiększoną produkcją IL1B u noworodków matek chorujących na astmę (31).

Natomiast w pracy analizującej metylację nabłonka oskrzeli w kontekście zmian polimorficznych w różnych endotypach astmy wykazano odmienny profil metylacji między chorymi na astmę a grupą kontrolną oraz że polimorfizm genetyczny korelował ze zmianami metylacji w astmie (32). Ponadto, w pracy wykazano, że zmiany epigenetyczne mogą określać różne endotypy astmy, u podłoża których leżą odmiennie szlaki biologiczne.

W badaniach EWAS w alergii pokarmowej zaobserwowano, że zmiany epigenetyczne obserwowane po urodzeniu oraz po 1 roku życia pozwalają przewidzieć wystąpienie alergii pokarmowej w późniejszym wieku (33), a metylacja DNA może być lepszym testem diagnostycznym niż stężenie IgE lub wynik punktowych testów skórnych dla testu prowokacji pokarmowej (34).

W innych badaniach w alergii pokarmowej (na białko mleka) wykazano hypermetylację (19) oraz 5 wysp CpG o zmienionym wzorze metylacji m.in. w genach NDFIP2, EVL, TRAPPC9 i RPS6K2 (w regionach regulatorowych takich jak miejsca CTCF) (16).

W badaniach dotyczących sezonowego alergicznego nieżytu nosa (ANN) zaobserwowano inny wzór metylacji między grupą pacjentów a kontrolną, jednak w badaniu uwzględniono zbyt małą grupę badaną, by wyciągnąć jednoznaczne wnioski (18). W innym badaniu analizującym astmę atopową zaobserwowano odmienny wzór metylacji (hypometylacja) w 52 genach w porównaniu do astmy nieatopowej (35).

Przeprowadzono również liczne badania EWAS uwzględniające wpływ ekspozycji na dym papierosowy w okresie prenatalnym (36-40) oraz ekspozycji na zanieczyszczenia powietrza (17, 41-43) na zmiany epigenetyczne.



Modyfikacje histonów

Zdecydowanie mniej badań przeprowadzono w alergiach w kontekście zmian w białkach histonowych. W badaniu analizującym modyfikacje białek histonowych w nabłonku oddechowym wykazano zwiększoną acetylację histonu H3 w pozycji 18 lizyny (H3K18) oraz metylację histonu H3 w pozycji 9 lizyny (H3K9me3) u pacjentów z astmą w porównaniu do grupy kontrolnej co prowadziło do zwiększonej ekspresji genów Δ Np63, EGFR, i STAT6 (44). W innym badaniu dotyczącym modyfikacji histonów zaobserwowano różnice w acetylacji histonu H3 i H4 dla kilku genów związanych z odpowiedzią Th2 między pacjentami z astmą atopową a osobami zdrowymi (45).

Perspektywy

Odkrycia epigenetyczne w alergiach mogą znaleźć potencjalne zastosowania praktyczne. Jedną z możliwości byłoby zastosowanie profilu zmian epigenetycznych jako narzędzi diagnostycznych, które mogłyby poprawić algorytmy predykcyjne i terapeutyczne chorób alergicznych. Z uwagi na utrzoną dostępność tkanek bezpośrednio dotkniętych przez

daną chorobę alergiczną, istotnych informacji może również dostarczyć krew obwodowa (46), krew pępowinowa (45, 47) lub łożysko (48), które nie wiążą się z inwazyjnym pobraniem materiału. Odkrycia epigenetyczne, zwłaszcza zmiany w genach kodujących enzymy zaangażowane w metylację takie jak deacetylaza histonu (HDAC) czy dimetylotransferaza (DNMT), mogą być również wykorzystane do opracowania nowych metod terapii np. inhibitorów HDAC lub DNMT (49).

Jednym z najnowszych osiągnięć ostatnich kilku lat jest edycja epigenetyczna. W najnowszym badaniu Song i wsp. (50) za pomocą platform stosujących tzw. palce cynkowe i technologię CRISPR Cas wyciszono (zablokowano ekspresję genu i białka) gen SPDEF, kodującego czynnik transkrypcyjny odpowiedzialny za produkcję śluzu w nabłonku oddechowym, co zmniejszyło ekspresję genów związanych z produkcją śluzu (m.in. AGR2 i MUC5AC). Co więcej, wyciszenie było stabilne i dziedziczone po podziałach mitotycznych w komórkach potomnych, co stwarza szansę na opracowanie nowych strategii terapii poprzez długotrwałe wyciszenie wybranych genów za pomocą edycji epigenetycznej.

Prace nadesłano

30.05.2017

Zaakceptowano do druku 31.05.2017

Konflikt interesów nie występuje. Treści przedstawione w artykule są zgodne z zasadami Deklaracji Helsińskiej, dyrektywami EU oraz ujednoliconymi wymaganiami dla czasopism biomedycznych.

Piśmiennictwo: 1. Holgate ST, Wenzel S, Postma DS, Weiss ST, Renz H, Sly PD. Asthma. Nature reviews Disease primers 2015;1:15025. 2. Lambrecht BN, Hammad H. The immunology of asthma. Nature immunology 2015;16:45-56. 3. Gandhi NA, Bennett BL, Graham NM, Pirozzi G, Stahl N, Yancopoulos GD. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. Nature reviews Drug discovery 2016;15:35-50. 4. Kabesch M, Michel S, Tost J. Epigenetic mechanisms and the relationship to childhood asthma. The European respiratory journal 2010;36:950-961. 5. Harb H, Alshakar Alhamwe B, Garn H, Renz H, Potaczek DP Recent developments in epigenetics of pediatric asthma. Current opinion in pediatrics 2016;28:754-763. 6. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. Cell 2007;128:693-705. 7. Rothbarth SB, Strahl BD. Interpreting the language of histone and DNA modifications. Biochimica et biophysica acta 2014;1839:627-643. 8. March ME, Sleiman PM, Hakonarson H. The genetics of asthma and allergic disorders. Discovery medicine 2011;11:35-45. 9. Toncheva AA, Potaczek DP, Schedel M, Gersting SW, Michel S, Krajnov N, et al. Childhood asthma is associated with mutations and gene expression differences of ORMDL genes that can interact. Allergy 2015;70:1288-1299. 10. Naumova AK, Al Tuwaiji A, Morin A, Vaillancourt VT, Madore AM, Berliet S, et al. Sex- and age-dependent DNA methylation at the 17q12-q21 locus associated with childhood asthma. Human genetics 2013;132:811-822. 11. Schieck M, Sharma V, Michel S, Toncheva AA, Worth L, Potaczek DP, et al. A polymorphism in the TH2 locus control region is associated with changes in DNA methylation and gene expression. Allergy 2014;69:1171-1180. 12. Reinius LE, Gref A, Saaf A, Acevedo N, Joerink M, Kupczyk M, et al. DNA methylation in the Neuropeptide S Receptor 1 (NPSR1) promoter in relation to asthma and environmental factors. PloS one 2013;8:e53877. 13. Morales E, Bustamante M, Vilahur N, Escaramis G, Montfort M, de Cid R, et al. DNA hypomethylation at ALOX12 is associated with persistent wheezing in childhood. American journal of respiratory and critical care medicine 2013;187:584-588. 14. Chen W, Boutaoui N, Brehm JM, Han YY, Schmitz C, Cressley A, et al. ADCYAP1R1 and asthma in Puerto Rican children. American journal of respiratory and critical care medicine 2013;187:584-588. 15. Sarnowski C, Laprise C, Malerba G, Moffatt MF, Dizier MH, Morin A, et al. DNA methylation within melatonin receptor 1A (MTNR1A) mediates paternally transmitted genetic variant effect on asthma plus rhinitis. The Journal of allergy and clinical immunology 2016;138:748-753. 16. Hong X, Hao K, Ladd-Acosta C, Hansen KD, Tsai HJ, Liu X, et al. Genome-wide association study identifies peanut allergy-specific loci and evidence of epigenetic mediation in US children. Nature communications 2015;6:6304. 17. Sominen HK, Zhang X, Biagini Myers JM, Kovacic MB, Ullm A, Jurcak N, et al. Ten-eleven translocation 1 (TET1) methylation is associated with childhood asthma and traffic-related air pollution. The Journal of allergy and clinical immunology 2016;137:797-805 e795. 18. Nestor CE, Barrenas F, Wang H, Lentini A, Zhang H, Bruhn S, et al. DNA methylation changes separate allergic patients from healthy controls and may reflect altered CD4+ T-cell population structure. PLoS genetics 2014;10:e1004059. 19. Petrus NC, Henneman P, Venema A, Mul A, van Sinderen F, Haagmans M, et al. Cow's milk allergy in Dutch children: an epigenetic pilot survey. Clinical and translational allergy 2016;6:16. 20. Chen W, Mempel M, Schober W, Behrendt H, Ring J. Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. Allergy 2008;63:1418-1427. 21. Kotz D, Simpson CR, Sheikh A. Incidence, prevalence, and trends of general practitioner-recorded diagnosis of peanut allergy in England, 2001 to 2005. The Journal of allergy and clinical immunology 2011;127:623-630 e621. 22. Nwaru BI, Hickstein L, Panesar SS, Muraro A, Werfel T, Cardona V, et al. The epidemiology of food allergy in Europe: a systematic review and meta-analysis. Allergy 2014;69:62-75. 23. Rodriguez E, Baurecht H, Wahn AF, Kretschmer A, Holze M, Zeilinger S, et al. An integrated epigenetic and transcriptomic analysis reveals distinct tissue-specific patterns of DNA methylation associated with atopic dermatitis. The Journal of investigative dermatology 2014;134:1873-1883. 24. Stefanowicz D, Hackett TL, Garmarouli FS, Gunther OP, Neumann S, Sutanto EN, et al. DNA methylation profiles of airway epithelial cells and PBMCs from healthy, atopic and asthmatic children. PloS one 2012;7:e44213. 25. Yang IV, Pedersen BS, Liu AH, O'Connor GT, Pillai D, Kattan M, et al. The nasal methylome and childhood atopic asthma. The Journal of allergy and clinical immunology 2017;139:1478-1488. 26. Baccarelli A, Rusconi F, Bollati V, Cateilan D, Accetta G, Hou L, et al. Nasal cell DNA methylation, inflammation, lung function and wheezing in children with asthma. Epigenomics 2012;4:91-100. 27. Breton CV, Byun HM, Wang X, Salam MT, Siegmund K, Gilliland FD. DNA methylation in the arginase-nitric oxide synthase pathway is associated with exhaled nitric oxide in children with asthma. American journal of respiratory and critical care medicine 2011;184:191-197. 28. Yang Y, Haitchi HM, Cakebread J, Sammut D, Harvey A, Powell RM, et al. Epigenetic mechanisms silence a disintegrin and metalloprotease 33 expression in bronchial epithelial cells. The Journal of allergy and clinical immunology 2008;121:1393-1399. 1399 e1391-1314. 29. Liang L, Willis-Owen SA, Laprise C, Wong KC, Davies GA, Hudson SJ, et al. An epigenome-wide association study of total serum immunoglobulin E concentration. Nature 2015;520:670-674. 30. Chen W, Wang T, Pino-Yanes M, Forno E, Liang L, Yan Q, et al. An epigenome-wide association study of total serum IgE in Hispanic children. The Journal of allergy and clinical immunology 2017. 31. DeVries A, Vercelli D. The neonatal methylome as a gatekeeper in the trajectory to childhood asthma. Epigenomics 2017;9:585-593. 32. Nicodemus-Johnson J, Myers RA, Sakabe NJ, Sobreira DR, Hogarth DK, Naureckas ET, et al. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. JCI insight 2016;1:e90151. 33. Martino D, Joo JE, Sexton-Oates A, Dang T, Allen K, Saffery R, et al. Epigenome-wide association study reveals longitudinally stable DNA methylation differences in CD4+ T cells from children with IgE-mediated food allergy. Epigenetics 2014;9:998-1006. 34. Martino D, Dang T, Sexton-Oates A, Prescott S, Tang ML, Dharmage S, et al. Blood DNA methylation biomarkers predict clinical reactivity in food-sensitized infants. The Journal of allergy and clinical immunology 2015;135:1319-1328 e1311-1312. 35. Kim YJ, Park SW, Kim TH, Park JS, Cheong HS, Shin HD, et al. Genome-wide methylation profiling of the bronchial mucosa of asthmatics: relationship to atopy. BMC medical genetics 2013;14:39. 36. Breton CV, Siegmund KD, Joubert BR, Wang X, Qui W, Carey V, et al. Prenatal tobacco smoke exposure is associated with childhood DNA CpG methylation. PloS one 2014;9:e99716. 37. Joubert BR, Haberg SE, Nilsen RM, Wang X, Vollset SE, Murphy SK, et al. 450K epigenome-wide scan identifies differential DNA methylation in newborns related to maternal smoking during pregnancy. Environmental health perspectives 2012;120:1425-1431. 38. Markunas CA, Xu Z, Harlid S, Wade PA, Lie RT, Taylor JA, et al. Identification of DNA methylation changes in newborns related to maternal smoking during pregnancy. Environmental health perspectives 2014;122:1147-1153. 39. Richmond RC, Simpkin AJ, Woodward G, Gaunt TR, Lytleton O, McArdle WL, et al. Prenatal exposure to maternal smoking and offspring DNA methylation across the life-course: findings from the Avon Longitudinal Study of Parents and Children (ALSPAC). Human molecular genetics 2015;24:2201-2217. 40. Joubert BR, Felix JF, Yousefi P, Bakulski KM, Just AC, Breton C, et al. DNA Methylation in Newborns and Maternal Smoking in Pregnancy: Genome-wide Consortium Meta-analysis. American journal of human genetics 2016;98:680-696. 41. Rossnerova A, Tulupova E, Tabashidze N, Schumacherova J, Dostal M, Rossner P, Jr., et al. Factors affecting the 27K DNA methylation pattern in asthmatic and healthy children from locations with various environments. Mutation research 2013;741-742:18-26. 42. Jiang R, Jones MJ, Sava F, Kobor MS, Carlsten C. Short-term diesel exhaust inhalation in a controlled human crossover study is associated with changes in DNA methylation of circulating mononuclear cells in asthmatics. Particle and fibre toxicology 2014;11:71. 43. Clifford RL, Jones MJ, Maelsaen JL, McEwen LM, Goodman SJ, Mostafavi S, et al. Inhalation of diesel exhaust and allergen alters human bronchial epithelium DNA methylation. The Journal of allergy and clinical immunology 2017;139:112-121. 44. Stefanowicz D, Lee JY, Lee K, Shaheen F, Koo HK, Booth S, et al. Elevated H3K18 acetylation in airway epithelial cells of asthmatic subjects. Respiratory research 2015;16:95. 45. Harb H, Renz H. Update on epigenetics in allergic disease. The Journal of allergy and clinical immunology 2015;135:15-24. 46. Vercelli D. Does epigenetics play a role in human asthma? Allergology international : official journal of the Japanese Society of Allergology 2016;65:123-126. 47. Amarasekera M, Martino D, Ashley S, Harb H, Kesper D, Strickland D, et al. Genome-wide DNA methylation profiling identifies a folate-sensitive region of differential methylation upstream of ZFP57 imprinting regulator in humans. FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology 2014;28:4068-4076. 48. Slaats GG, Reinius LE, Alm J, Kere J, Scheynius A, Joerink M. DNA methylation levels within the CD14 promoter region are lower in placentas of mothers living on a farm. Allergy 2012;67:895-903. 49. Brand S, Kesper DA, Teich R, Kilic-Niebergall E, Pinkenburg O, Bothur E, et al. DNA methylation of TH1/TH2 cytokine genes affects sensitization and progress of experimental asthma. The Journal of allergy and clinical immunology 2012;129:1602-1610 e1606. 50. Song J, Cano-Rodriguez D, Winkle M, Gjaltema RA, Goubert D, Jurkowski TP, et al. Targeted epigenetic editing of SPDEF reduces mucus production in lung epithelial cells. American journal of physiology Lung cellular and molecular physiology 2017;312:L334-L347.