

Edycja genów

- zastosowanie metody CRISPR/Cas9 w badaniach nad chorobami alergicznymi

Gene Editing: the application of CRISPR-Cas9 method in research of allergic diseases



Dr n. med.
Beata Narożna

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

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

Kierownik Kliniki:
Dr hab. n. med.
Irena Wojsyk-Banaszak

S U M M A R Y

CRISPR-Cas is a primitive prokaryotic defensive system against exogenous DNA elements. Further understanding of this mechanism allowed for its modification and use in genetic engineering. CRISPR-Cas9 method is commonly named as „genetic scissors”, as a defective gene can be deleted and then a new, correct gene will take its place. The relative simplicity of the method, low cost, precision and effectiveness have made the CRISPR-Cas9 the most commonly used technique for gene expression manipulation. This work aims to describe the working principle of this method and its potential use for research in allergic diseases.

CRISPR/Cas jest prymitywnym systemem obronnym bakterii i archeonów przeciwko elementom genetycznym pochodzenia egzogenego. Dokładniejsze poznanie mechanizmu tego zjawiska pozwoliło na jego modyfikację i wykorzystanie w inżynierii genetycznej. Powstały system CRISPR/Cas9 został nazywany „nożyczkami do genów”, gdyż pozwala na wycięcie nieprawidłowego genu i wklejenie nowej, prawidłowej sekwencji w jego miejsce. Prostota metody, cena, precyzja i skuteczność sprawiły, iż stała się ona najczęściej używaną metodą do manipulacji ekspresji genów. Poniższa praca skupia się na opisie działania metody i jej potencjalne zastosowanie w badaniach chorób alergicznych.

Narożna B.: Edycja genów - zastosowanie metody CRISPR/Cas9 w badaniach nad chorobami alergicznymi. *Alergia*, 2020, 4; 36-38

CRISPR (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats) to obecne w organizmie bakterie krótkie, regularnie rozmieszczone, powtarzające się sekwencje palindromowe DNA, poprzedzone lub oflankowane genami białek Cas. Chociaż zostały zidentyfikowane po raz pierwszy w 1987 roku [1], to dopiero w 2005 odkryto ich dokładną funkcję [2-4]. Sekwencje te okazały się być częścią systemu obrony organizmów prokariotycznych (bakterii i archeonów) przed elementami genetycznymi pochodzenia egzogenego.

Insercja sekwencji bakteriofagów (wirusów atakujących bakterie) do locus CRISPR bakterii powoduje odporność na infekcję danym fagiem. System CRISPR/Cas stanowi więc prymitywny odpowiednik ludzkiego mechanizmu odporności swoistej.

W 2012 roku, Jennifer Doudna i Emmanuelle Charpentier odkryły, iż system CRISPR/Cas9 można odpowiednio zaprogramować, aby modyfikował DNA u każdego innego organizmu [5]. Metoda ta jest tania, szybka i łatwa w użyciu, co teoretycznie daje nieograniczone możliwości terapii genowej. Stworzenie precyzyjnych „nożyczek od genów” spowodowało, iż odkrywczyńce otrzymały Nagrodę Nobla w dziedzinie chemii w 2020 roku.

Mechanizm działania systemu CRISPR/Cas

System CRISPR/Cas składa się z trzech etapów: adaptacji, ekspresji i interferencji [5, 6]. Podczas pierwszego etapu, wirusowy lub plazmidowy fragment sekwencji DNA o długości od 21-72 nukleotydów zostaje włączony do locus CRISPR. Procesowi temu towarzyszy duplikacja końcowej sekwencji celem zachowania architektury prostych powtórzeń w geno-

mie. Dokładny mechanizm integracji nie jest znany; sugeruje się jednak, iż kluczową rolę pełnią tutaj endonukleazy Cas1 i Cas2.

Po włączeniu sekwencji do locus powstaje pierwotny transkrypt, który po katalizie przez endorybonukleazy (m.in. Cas6 lub Cas9) staje się dojrzałym CRISPR RNA (crRNA), częściowo komplementarnym do egzogenego materiału genetycznego. Proces dojrzewania może natomiast kontrolować niewielka cząsteczka RNA, częściowo komplementarna do pre-crRNA, nazwanego tracrRNA (ang. trans-activating crRNA), również kodowana przez locus CRISPR. Białka Cas oraz crRNA tworzą kompleks rybonukleoproteinowy, który po rozpoznaniu swoich sekwencji prowadzi do hydrolizy wiązań fosfodiesterowych, w rezultacie powodując degradację faga lub plazmidu.

Edytowanie genomu za pomocą CRISPR/Cas9

W metodzie tej nie ma etapu adaptacji – niezbędne elementy systemu muszą zostać dostarczone z zewnątrz [5, 6]. W tym celu projektuje się plazmid, w którego skład wchodzi geny kodujące białko Cas9 oraz odcinek sgRNA (ang. single guide RNA), będący połączeniem tracrRNA oraz crRNA. Powstały w strąfkowanej komórce kompleks Cas9-sgRNA poszukuje komplementarnej sekwencji, a następnie endonukleaza Cas przecina obydwie nici DNA. Te z kolei są naprawiane przez naturalne systemy naprawcze. Pierwszy z systemów, mechanizm rekombinacji homologicznej, pozwala na wprowadzenie innej wersji tego samego genu. Wystarczy, że do jądra komórki zostanie dostarczona prawidłowa sekwencja DNA – wbuduje się ona w miejsce wyciętego fragmentu. Można dzięki temu korygować mutacje punktowe, insercje czy delekcje w obrębie danego genu. Drugi mechanizm to rekombinacja

Słowa kluczowe:
CRISPR/Cas9, alergia,
edycja genów

Key words:
CRISPR-Cas9, allergy,
gene editing



niehomologiczna; w tym wypadku uszkodzenie naprawiane jest przez ligazy (enzymy „sklejające” dwa końce nici kwasu nukleinowego). Efektem tego systemu jest zmiana pierwotnej sekwencji nukleotydów lub przesunięta ramka odczytu spowodowana insercją lub delecją. Kodowane białko zazwyczaj jest niefunkcjonalne z powodu przedwczesnego kodonu STOP.

Co ciekawe, plazmid CRISPR/Cas9 może zawierać sgRNA przeciwko wielu różnym sekwencjom, pozwalając na jednoczesne zmiany w wielu genach, a wielokrotne próby dopracowania systemu pozwoliły na jego bezpieczniejsze czy bardziej precyzyjne stosowanie. Dotychczasowe badania z wykorzystaniem tej technologii skupiają się głównie na edytowaniu genów *in vitro* lub w zwierzęcych modelach chorób, np. w dystrofii mięśniowej Duchenne'a [7], mukowiscydozie [8] czy beta-talazemii [9].

Badania patogenezy chorób alergicznych

Choć metoda ma wysoki potencjał terapeutyczny, to ze względu na złożoną patogenezę chorób alergicznych, a w szczególności niewielki udział pojedynczych wariantów genetycznych, to w badaniach nad alergią jest ona głównie wykorzystywana do identyfikacji funkcji poszczególnych genów [10].

Chu i wsp. wykorzystali metodę CRISPR/Cas9 do wyłączenia genu MUC18 (CD146) w hodowli pierwotnej komórek nabłonka dróg oddechowych [11]. Zweryfikowali wydajność transfekcji i skuteczność u niemalże wszystkich subpopulacji komórek. Dodatkowo odkryli, iż stymulacja agonistami receptorów toll-podobnych spowodowała znacznie słabszą indukcję pro-zapalnej interleukiny 8. Ich badania udowadniają więc przede wszystkim, iż możliwe jest poddanie edycji genowej komórek nabłonka dróg oddechowych; jest to o tyle istotne, iż w przypadku tych komórek, inne metody transfekcji są mało skuteczne. Ponadto, zmieniona ekspresja IL-8 udowadnia, iż gen MUC18 może być związany z patogenezą astmy.

Alergeny roztocza kurzu domowego (HDM) są jedną z najczęstszych przyczyn nadwrażliwości alergicznej. Nie jest znany dokładny mechanizmu regulacji odpowiedzi immunologicznej na ten alergen [12]. W badaniach naukowych nad modelem zwierzęcym atopowego zapalenia skóry wykorzystuje się myszy NC/Nga, powstałe w wyniku chowu wsobnego, charakteryzujące się nadprodukcją przeciwciał IgE.

Kanemaru i wsp. poddali sekwencjonowaniu genom tych myszy, identyfikując mutację w genie Clec10a, kodującym receptor lektynowy typu C. Następnie za pomocą systemu CRISPR/Cas9 naprawili zmutowany gen, w wyniku czego u myszy NC/Nga zniknęła nadwrażliwość na HDM, udowadniający tym samym kluczową rolę tego genu w odpowiedzi na alergen.

Clec10a ulega ekspresji w makrofagach występujących w skórze, gdzie zmniejsza reakcję prozapalną organizmu po indukcji receptorów toll-podobnych. Naukowcy zidentyfikowali homologiczne do Clec10a białko u człowieka – jest to Asgr1 (ang. asialoglycoprotein receptor 1). Aplikacja tego białka u myszy również spowodowała indukcję receptorów toll-podobnych, w rezultacie prowadząc do atopowego zapalenia skóry.

Metoda CRISPR/Cas9 została również wykorzystana do oceny wpływu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) na ekspresję sąsiadujących z nimi genów, które

w badaniach GWAS wykazały związek z patogenezą chorób układu oddechowego, w tym m.in. astmą [13]. Polimorfizmy te zlokalizowane są w regionach chromosomowych kodujących takie białka jak TGFB1, B9D2, TMEM91, GSDMB, ORMDL3, MUC5AC oraz MUC5B. Większość z tych SNP dotyczyła sekwencji niekodujących. Okazało się, iż SNP rs1800469 reguluje jedynie ekspresję białek B9D2 i TMEM91, nie odpowiada zaś za modyfikację poziomu transkrypcji genu TGFB1, znajdującego się w tym samym regionie. Co ciekawe, badania ChIP-seq wykazywały, iż polimorfizm rs35705950 kontroluje jedynie ekspresję MUC5B, nie ma zaś wpływu na MUC5AC, podczas gdy badania funkcjonalne z wykorzystaniem CRISPR/Cas9 udowodniły, iż reguluje on ekspresję obydwu tych genów, wykazując tym samym konieczność weryfikacji wyników sekwencjonowania innym modelem badawczym.

Modyfikacje alergenów za pomocą CRISPR/Cas9

Ponieważ każda metoda edycji genów niesie ze sobą pewne ryzyko, dużo bezpieczniejszym rozwiązaniem wydają się modyfikacje genów białek wywołujących alergię u człowieka, szczególnie jeśli modyfikacje dotyczą produktów spożywczych.

Jednymi z najczęściej spożywanymi, a jednocześnie najłatwiej dostępnymi pokarmami są produkty pszenne. Białka pszenicy, grupa inhibitorów α -amylazy/trypsyny (ATI), to najczęstsza przyczyna alergii na białko pszenicy, dotycząca około 10% populacji [14]. Szczególnie istotne wydają się być podjednostki białkowe WTA1-CM3 i WTA1-CM16. Metoda CRISPR/Cas9 została wykorzystana do edycji tych podjednostek w ziarnach pszenicy celem produkcji odmiany hipoalergicznej. Badaczom udało się uzyskać trzy stabilne odmiany pszenicy, które przekazują delecję kolejnym pokoleniom. Powstałe odmiany należy jednak dokładnie przebadać funkcjonalnie, gdyż geny ATI są odpowiedzialne za ochronę rośliny przed α -amylazami owadów i ssaków, co może utrudniać kielkowanie roślin.

Jednakże, w przypadku genetycznie modyfikowanej żywności, zawsze pozostaje wątpliwość czy sama metoda wprowadzająca modyfikacje nie spowoduje reakcji nadwrażliwości. Nakajima i wsp. poddali więc białko Cas9 symulowanemu trawieniu jelitowemu *in vitro*, które wykazało iż białko podlega dość szybkiej i całkowitej degradacji [15]. Ponadto badacze zbadali podobieństwo peptydów potencjalnie kodowanych przez gen Cas9 do alergenów pokarmowych i wykryli homologię tylko u jednego z peptydów, a więc modyfikowana w ten sposób żywność z wielkim prawdopodobieństwem nie będzie powodować rozwoju alergii pokarmowej.

W białku jaja kurzego występują dwa silne alergeny: owalbumina i owomukoid. Edycja tych genów mogłaby więc pozwolić na produkcję jaj bezpiecznych dla alergików. Oishi i wsp. udało się zaprojektować wysoce skuteczną modyfikację systemu CRISPR/Cas9, która pozwoliła na transfekcję kurzych zygot i stworzenie kur, których jaja nie zawierają owomukoidu. Spożycie takich jaj prawdopodobnie spowoduje zmniejszenie ryzyka wystąpienia reakcji alergicznej; potrzebne są jednak dalsze badania.

Szacuje się, iż ponad 10% populacji ma alergię na sierść kota [16]. Szczególnie interesujące wydają się więc badania Brackett i wsp., którzy zsekwencjonowali u ponad 20

kotów gen *Feld1*, kodujący białko będące najczęstszym i najsilniejszym wytwarzanym przez nie alergenem dla człowieka. Następnie zaprojektowali plazmid zawierający konserwatywne regiony genu i transfekowali kocie hodowlę komórkową in vitro, powodując delecję tego genu. Oczywiście potrzebne są dalsze badania, ale jeśli usunięcie genu nie spowodowałoby skutków ubocznych u zwierzęcia, to możliwe byłoby stworzenie idealnej dla alergików rasy kotów, która nie powodowałaby u nich rozwoju objawów choroby alergicznej.

Podsumowanie

Metoda CRISPR/Cas9 ma ogromny potencjał: jest precyzyjna, łatwo dostępna i niedroga. Edytowanie genów wydaje się mieć największe zastosowanie w terapii chorób genetycznych jednogennych, ale wykorzystanie metody do identyfikacji funkcji genów odpowiedzialnych za patogenezę chorób alergicznych sprawia, iż jesteśmy bliżej rozwikłania ich złożonego podłoża genetycznego. Należy bowiem pamiętać,

iż znając dokładną rolę poszczególnych genów i ich wpływ na rozwój choroby, metoda CRISPR/Cas9 może być potencjalnie wykorzystana w edycji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) predysponujących do rozwoju alergii i mających wpływ na jej przebieg. W szczególności istotną będzie tutaj możliwość modyfikacji wielu genów za pomocą jednego plazmidu. Dodatkowo, metoda ma szerokie zastosowanie w edytowaniu genomów roślin i zwierząt, celem usunięcia z nich białek będących powodem wystąpienia reakcji alergicznej u człowieka. System CRISPR/Cas9 może jednak sprawiać problemy natury zarówno etycznej, jak i prawnej, niezależnie od tego czy genom jest edytowany. I choć jest to metoda dość precyzyjna, to jak każda terapia genowa niesie ze sobą pewne ryzyko powstania przypadkowych mutacji, których efekt może być ciężki do przewidzenia. Niewątpliwie jednak wydaje się to być, na ten moment, jedna z najbardziej skutecznych i bezpiecznych metod edycji genów o dużym spektrum zastosowania. ■

Prace nadesłano
10.12.2020
Zaakceptowano do
druku 14.12.2020

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

Piśmiennictwo: 1. Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product. *J Bacteriol.* 1987;169(12):5429-33. 2. Mojica FJ, Diez-Villasenor C, Garcia-Martinez J, Soria E. Intervening sequences of regularly spaced prokaryotic repeats derive from foreign genetic elements. *J Mol Evol.* 2005;60(2):174-82. 3. Pourcel C, Salgnon G, Vergnaud G. CRISPR elements in *Yersinia pestis* acquire new repeats by preferential uptake of bacteriophage DNA, and provide additional tools for evolutionary studies. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 3):653-63. 4. Bolotin A, Quinquis B, Sorokin A, Ehrlich SD. Clustered regularly interspaced short palindromic repeats (CRISPRs) have spacers of extrachromosomal origin. *Microbiology (Reading).* 2005;151(Pt 8):2551-61. 5. Doudna JA, Charpentier E. Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science.* 2014;346(6213):1258096. 6. Czarnek M., J. B. System CRISPR-Cas – od odmności bakterii do inżynierii genomowej. *Postępy Hig Med Dosw* 2016(70):901-16. 7. Ousterout DG, Kabadi AM, Thakore PI, Majoros WH, Reddy TE, Gersbach CA. Multiplex CRISPR/Cas9-based genome editing for correction of dystrophin mutations that cause Duchenne muscular dystrophy. *Nat Commun.* 2015;6:6244. 8. Schwank G, Koo BK, Sasselli V, Dekkers JF, Heo I, Demircan T, et al. Functional repair of CFTR by CRISPR/Cas9 in intestinal stem cell organoids of cystic fibrosis patients. *Cell Stem Cell.* 2013;13(6):653-8. 9. Xie F, Ye L, Chang JC, Beyer AI, Wang J, Muench MO, et al. Seamless gene correction of beta-thalassemia mutations in patient-specific iPSCs using CRISPR/Cas9 and piggyBac. *Genome Res.* 2014;24(9):1526-33. 10. Goodman MA, Moradi Manesh D, Malik P, Rothenberg ME. CRISPR/Cas9 in allergic and immunologic diseases. *Expert Rev Clin Immunol.* 2017;13(1):5-9. 11. Chu HW, Rios C, Huang C, Wesolowska-Andersen A, Burchard EG, O'Connor BP, et al. CRISPR-Cas9-mediated gene knock-out in primary human airway epithelial cells reveals a proinflammatory role for MUC18. *Gene Ther.* 2015;22(10):822-9. 12. Kanemaru K, Noguchi E, Tahara-Hanaoka S, Mizuno S, Tateno H, Denda-Nagai K, et al. Clec10a regulates mite-induced dermatitis. *Sci Immunol.* 2019;4(42). 13. Stuart WD, Guo M, Fink-Balduf IM, Coleman AM, Clancy JP, Mall MA, et al. CRISPR-mediated functional analysis of lung disease-associated loci at non-coding regions. *NAR Genom Bioinform.* 2020;2(2):lqaa036. 14. Camerlengo F, Frittelli A, Sparks C, Doherty A, Martignago D, Larre C, et al. CRISPR-Cas9 Multiplex Editing of the alpha-Amylase/Trypsin Inhibitor Genes to Reduce Allergen Proteins in Durum Wheat. *Front Sustain Food S.* 2020;4. 15. Nakajima O, Nishimaki-Mogami T, Kondo K. Cas9 in Genetically Modified Food Is Unlikely to Cause Food Allergy. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(11):1876-80. 16. Brakett N, Riedy J, Adli M, Pomes A, Chapman M. Gene Editing the Major Cat Allergen, Fel d 1, Using CRISPR-Cas9. *J Allergy Clin Immunol.* 2020;145(2):Ab156-Ab.

Piśmiennictwo ze str. 35: 1. Gatti D, Idolazzi L, Fassio A. Vitamin D: not just bone, but also immunity. *Minerva Med.* 2016;107:452-460. 2. Lin YC, Wu TC, Chen PY. Comparison of plasma and intake levels of antioxidant nutrients in patients with chronic obstructive pulmonary disease and healthy people in Taiwan: a case-control study. *Asia Pac J Clin Nutr.* 2010;19:393-401. 3. Chaabouni M, Feki W, Chaabouni K, et al. Vitamin D supplementation to prevent COVID-19 in patients with COPD: a research perspective. *Adv Respir Med.* 2020;88:364-365. 4. Zhu M, Wang T, Wang C, et al. The association between vitamin D and COPD risk, severity, and exacerbation: an updated systematic review and meta-analysis. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2016;11:2597-2607. 5. Palermo A, Tuccinardi D, D'Onofrio L, et al. Vitamin K and osteoporosis: Myth or reality? *Metabolism* 2017;70:57-71. 6. Hanson C, Lyden E, Furtado J, et al. Serum tocopherol levels and vitamin E intake are associated with lung function in the normative aging study. *Clin Nutr* 2016 ;35:169-74. 7. Solidoro P, Bellocchia M, Facchini F. The immunobiological and clinical role of vitamin D in obstructive lung diseases. *Minerva Med.* 2016;107(3 Suppl 1):12-9. 8. Global Initiative for Chronic Obstructive Lung Disease. Global Strategy for the diagnosis management and prevention of chronic obstructive pulmonary disease. 2020. www.goldcopd.org. 9. Dobek R. Synergia pomiędzy witaminą D a GKS w astmie i chorobach alergicznych – czy ma rzeczywiste znaczenie kliniczne. *Alergia* 2014;2:48-51. 10. Jolliffe DA, Stefanidis C, Wang Z, et al. Vitamin D Metabolism Is Dysregulated in Asthma and Chronic Obstructive Pulmonary Disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 2020;202:371-382. 11. Quesada-Gomez JM, Entrenas-Castillo M, Bouillon R. Vitamin D receptor stimulation to reduce acute respiratory distress syndrome (ARDS) in patients with coronavirus SARS-CoV-2 infections. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2020 ;202:166. 12. Malaguarrera L. Vitamin D3 as Potential Treatment Adjuncts for COVID-19 Nutrients. 2020;12:E3512. 13. Olędzka R. Substancje wspomagające organizm chorych na astmę. *Alergia* 2012;2:3-7. 14. Laaksi I et al. Vitamin D and respiratory infection in adults. *Proc Nutr Soc* 2012; 71 90-7. 15. de Sa Del Fiol F, Barberato-Filho S., Lopes L.C, et al. Vitamin D and respiratory infections. *J Infect Dev Ctries* 2015;9:355-61. 16. Gombart, A.F. The vitamin D-antimicrobial peptide pathway and its role in protection against infection. *Future Microbiol.* 2009, 4, 1151–1165. 17. Ali AM, Selim S, Abbassi MM, et al. Effect of atfacalcidol on the pulmonary function of adult asthmatic patients: A randomized trial. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 2017 ;118:557-563. 18. Jolliffe DA, James WY, Hooper RL, et al. Prevalence, determinants and clinical correlates of vitamin D deficiency in patients with Chronic Obstructive Pulmonary Disease in London, UK. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2017. doi: 10.1016/j.jsmb.2017.01.019. 19. Esfandiari N, Alaei F, Fallah S, et al. Vitamin D deficiency and its impact on asthma severity in asthmatic children. *Ital J Pediatr.* 2016;42:108. 20. Beyhan-Sagmen S, Baykan O, Balcan B, Association Between Severe Vitamin D Deficiency, Lung Function and Asthma Control. *Arch Bronconeumol.* 2017;53:186-191. 21. Mehta AA, Agrawal AD, Appanna V et al. Vitamin D improves corticosteroid efficacy and attenuates its side-effects in an animal model of asthma. *Can J Physiol Pharmacol.* 2015 ;93:53-61. 22. Panaszek B. Fenotypy i endotypy astmy oskrzelowej - implikacje diagnostyczne i terapeutyczne. *Int.Rev.Allergol.Clin.Immunol.Fam.Med.* 2013 ;19 :187-193. 23. Zuo L, Lucas K, Fortuna CA, et al. Molecular Regulation of Toll-like Receptors in Asthma and COPD. *Front Physiol.* 2015 Nov 9;6:312. doi: 10.3389/fphys.2015.00312. 24. Hall SC, Agrawal DK. Vitamin D and Bronchial Asthma: An Overview of Data From the Past 5 Years. *Clin Ther.* 2017;39:917-929. 25. de Groot JC, van Roon EN, Storm H, et al. Vitamin D reduces eosinophilic airway inflammation in nonatopic asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2015 ;135:670-5.e3. 26. Rennard S. Inflammation in COPD: a link to systemic comorbidities. *Eur Respir Rev.* 2007; 16: 91-97. 27. Curtis JL, Freeman CM, Hogg JC. The immunopathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease: insights from recent research. *Proc Am Thorac Soc.* 2007;4:512-21. 28. Haruna A, Oga T, Muro S, et al. Relationship between peripheral airway function and patient-reported outcomes in COPD: a cross-sectional study. *BMC Pulm Med.* 2010;10:10. 29. Krieger BP. Hyperinflation and intrinsic positive end-expiratory pressure: less room to breathe. *Respiration.* 2009;77:344-50. 30. Mekov E, Slavova Y, Tsakova A, et al. Vitamin D Deficiency and Insufficiency in Hospitalized COPD Patients. *PLoS One.* 2015;10(6):e0129080. 31. Miraglia Del Giudice M, Allegorico A. The Role of Vitamin D in Allergic Diseases in Children. *J Clin Gastroenterol.* 2016 Nov/Dec;50 Suppl 2. 32. Kavitha TK, Gupta N, Kabra SK, et al. Association of Serum Vitamin D Levels with Level of Control of Childhood Asthma. *Indian Pediatr.* 2017;54:29-32. 33. Kielek T, Chmielowiec B, Jabłoński K, i wsp. Znaczenie małego stopnia systemowego zapalenia w przewlekłej obturacyjnej chorobie płuc. *Współcz Alergol Info* 2010;5:12-19. 34. Hendryx M, Luo J. A test of vitamin D benefits on respiratory health mediated through inflammatory markers. *Chron Respir Dis.* 2015;12:24-30. 35. Meems LM, de Borst MH, Postma DS, et al. Low levels of vitamin D are associated with multimorbidity: results from the LifeLines Cohort Study. *Ann Med.* 2015;47:474-81. 36. Bjerk SM, Edgington BD, Rector TS, et al. Supplemental vitamin D and physical performance in COPD: a pilot randomized trial. *Int J Chron Obstruct Pulmon Dis.* 2013;8:97-104. 37. van de Boel C, Rutten EPA, van Helvoort A, et al. A randomized clinical trial investigating the efficacy of targeted nutrition as adjunct to exercise training in COPD. *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2017 Jun 12. doi: 10.1002/jcsm.12219. 38. Sarkar M, Bhardwaj R, Madabhavi I, et al. Osteoporosis in chronic obstructive pulmonary disease. *Clin Med Insights Circ Respir Pulm Med.* 2015;9:5-21.