



Dr n. med.
Beata Narożna

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

Kierownik Pracowni:
Prof. dr hab. n. med.
Aleksandra
Szczepankiewicz

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

Badania epigenetyczne w alergicznym nieżycie nosa

Epigenetic studies in allergic rhinitis

S U M M A R Y

Allergic rhinitis is a complex disease, whose pathogenesis is dependent on genetic, environmental and epigenetic factors. GWAS studies have mainly explained the role of genetic factors. However, little is known about the exact role of epigenetic mechanisms in the development of the disease. Therefore, this work summarizes the latest reports on histone modifications, DNA methylation and non-coding RNAs in the pathogenesis of allergic rhinitis.

.....

Alergiczny nieżyt nosa jest chorobą złożoną, której patogenezą zależną jest od czynników genetycznych, środowiskowych oraz epigenetycznych. Badania typu GWAS znacznie wyjaśniły udział tych pierwszych, ciągle jednak niewiele jest wiadomo o dokładnym wpływie mechanizmów epigenetycznych na rozwój choroby. Niniejsza praca podsumowuje najnowsze doniesienia dotyczące roli modyfikacji histonów, metylacji DNA oraz niekodujących cząsteczek RNA w patogenezie alergicznego nieżytu nosa.

Narożna B.: Badania epigenetyczne w alergicznym nieżycie nosa. *Alergia*, 2023, 1; 36-38

Alergiczny nieżyt nosa (ANN) jest jedną z najczęstszych chorób atopowych na świecie. Objawy choroby, takie jak kichanie, swędzenie i wyciek z nosa oraz obstrukcja dróg oddechowych, powodują obniżenie jakości życia, zmniejszenie produktywności w pracy i szkole oraz problemy ze snem [1]. Około 40% pacjentów z ANN choruje również na astmę; obie choroby mają tę samą patogenezę związaną z nieprawidłową odpowiedzią organizmu na alergen, nadprodukcją przeciwciał IgE oraz przewagą limfocytów Th2 i nadmiarem cytokin zapalnych, takich jak interleukiny IL-4, IL-13, IL-33 i limfopoetyną zrębu grasicy (TSLP) [2, 3].

ANN jest chorobą złożoną, co oznacza, iż za rozwój choroby odpowiada udział czynników genetycznych i środowiskowych, a także dodatkowo zmiany epigenetyczne, najczęściej spowodowane ekspozycją na niekorzystne czynniki środowiskowe. Udział tych pierwszych jest już coraz jaśniejszy dzięki badaniom typu GWAS oraz badaniom funkcjonalnym [4]. Ciągle jednak niewiele wiadomo odnośnie wpływu czynników epigenetycznych na rozwój choroby.

Modyfikacje epigenetyczne

Choć wszystkie komórki organizmu mają ten sam materiał genetyczny, to jednak różnią się od siebie

budową i funkcją. Wynika to z różnych mechanizmów epigenetycznych, które pozwalają na różne wykorzystanie tej samej informacji genetycznej poprzez powstanie stałych wzorców ekspresji genów dla poszczególnych komórek [5]. W przeciwieństwie jednak do mutacji w DNA, zmiany epigenetyczne są zmianami odwracalnymi. Wzorce ekspresji genów mogą być dziedziczone lub gromadzone całe życie. Co istotne, mogą również ulegać zmianom pod wpływem czynników środowiskowych.

Regulacja epigenetyczna jest wielostopniowa i może zachodzić na różnych etapach przetwarzania informacji genetycznej. Najczęstsze modyfikacje epigenetyczne to modyfikacje histonów, zmiany w metylacji DNA oraz regulacja ekspresji genów poprzez syntezę niekodujących cząsteczek RNA.

Modyfikacje histonów

Helisa DNA w formie nierozwiniętej jest bardzo długa, w związku z czym musi być silnie skondensowana, w przeciwnym wypadku nie zmieściłaby się w jądrze komórkowym [6]. Materiał genetyczny jest więc związany z białkami histonowymi, co ułatwia jego upakowanie. Ścisłe zwinięta chromatyna jest niedostępna dla czynników transkrypcyjnych i polimerazy RNA, co powoduje zahamowanie ekspresji genów. Modyfikacje chromatyny

Słowa kluczowe:
epigenetyka,
metylacja DNA, niekodujące RNA, alergiczny nieżyt nosa

Key words:
epigenetic, DNA methylation, noncoding RNA, allergic rhinitis

prowadzą z kolei do jej rozluźnienia i wzmożenia aktywności transkrypcyjnej.

Jedną z najczęstszych modyfikacji jest acetylacja, przeprowadzana przez deacetylazę histonową (HDAC). Badania tego enzymu w komórkach nabłonka dróg oddechowych pobranych z nosa pacjentów z ANN wykazały, iż ma on zwiększoną ekspresję w porównaniu do osób zdrowych [7]. Prace na modelu zwierzęcym szczura z ANN wykazały, iż IL-4 może zwiększać ekspresję HDAC i powodować dysfunkcję nabłonka dróg oddechowych jako bariery mechanicznej [8]. Proces ten może być zatrzymany poprzez zastosowanie inhibitorów HDAC, takich jak maślan sodu czy trichostatyna A. Ponadto, zablokowanie HDAC za pomocą trichostatyny A w modelu myszy uczulonej na owalbuminę zmniejszyło poziom specyficznych przeciwciał IgE oraz ekspresję IL-4 i IL-5 [9]. Natomiast zastosowanie maślanu sodu w mysim modelu ANN spowodowało poprawę kliniczną, a także wpłynęło na zwiększenie ekspresji IL-2 i IFN- γ w surowicy oraz spadek poziomu IL-4 i IL-10 [10]. Badania te sugerują, iż inhibicja HDAC stanowi wysoki potencjał terapeutyczny w ANN; konieczne jest jednak przeprowadzenie badań *in vitro* i badań klinicznych na człowieku celem potwierdzenia skuteczności i wykluczenia toksyczności tych preparatów.

Metylacja DNA

Kolejnym z mechanizmów regulacji epigenetycznej jest metylacja DNA, czyli proces przyłączania grup metylowych do cytozyny, który skutkuje powstaniem 5-metylocytozyny [11]. Wzrost metylacji w części regulatorowej genu powoduje zahamowanie jego ekspresji. U człowieka zmetylowane DNA występuje głównie w regionach bogatych w dinukleotydy CG, nazywane wyspami CpG. Zlokalizowane są one najczęściej w sekwencjach regulatorowych genów, za wyjątkiem genów odpowiedzialnych za podstawowe funkcje komórkowe, których ekspresja nie może nigdy być wyłączona.

Analizy metylacji IL-13 w leukocytach chińskiej populacji pacjentów z alergią na roztocza kurzu domowego i osób zdrowych wykazały jej podwyższony poziom u chorych na ANN [12]. Najbardziej istotną okazała się hipometylacja DNA na wyspie CpG38, która korelowała negatywnie z ekspresją mRNA IL-13 i stężeniem całkowitego IgE w surowicy. W innym badaniu, dzięki zestawieniu danych z GWAS i metylacji, udało się zidentyfikować dziedziczny po ojcu wariant genetyczny w regionie 4q35 (rs10009104-G) związany z współwystępowaniem astmy i ANN [13]. Efekt tego wariantu okazał się z kolei być regulowany poprzez zmiany w metylacji wysp CpG w obrębie genu receptora 1A melatoniny (MNTR1A).

Badania kliniczne z wykorzystaniem immunoterapii podjęzykowej (SLIT) u osób z alergią na roztocza kurzu domowego i pyłki traw wykazały poprawę w redukcji odpowiedzi na alergen i zmniejszenie intensywności objawów klinicznych dotyczących nosa i zatok. Co ciekawe, zaobserwowano również zmiany w metylacji wysp CpG w locus Foxp3 jednego z fenotypów limfocytów T regulatorowych (Treg) [14]. SLIT jest więc sku-

teczna w redukcji reakcji alergicznej i wykazuje możliwość regulacji epigenetycznych, które prawdopodobnie promują stabilną ekspresję Foxp3, co z kolei przekłada się na poprawę funkcji supresorowych limfocytów Treg i sugeruje długotrwałą skuteczność terapii.

Niekodujące RNA

Niekodujący RNA (ncRNA) to każdy transkrypt, który nie posiada ramki odczytu, a więc nie koduje białek. Najczęściej opisywane w literaturze ncRNA w kontekście regulacji epigenetycznych są krótkie mikroRNA (miRNA), długie niekodujące RNA (ang. long noncoding RNA, lncRNA) i koliste RNA (circRNA) [15, 16].

miRNA

MikroRNA to niewielkie sekwencje (ok. 20 nukleotydów), które regulują ekspresję transkryptów poprzez ich tymczasową blokadę lub degradację. Jeden miRNA może modulować kilkanaście, a nawet kilkaset różnych genów docelowych, a więc właściwie cząsteczki te regulują ekspresję całych sieci genów i szlaków sygnałowych.

Analiza ekspresji w materiale pochodzącym z biopsji nosa chorych na ANN w porównaniu do grupy kontrolnej wykazała zmienioną ekspresję sześciu miRNA: miR-143, miR-187, miR-224, miR-498, miR-874, oraz miR-886-3p [17]. Badania Shaoqing i wsp. na tym samym materiale i podobnej grupie badawczej również potwierdziły udział tych miRNA w rozwoju choroby; dodatkowo zidentyfikowano jeszcze miR-7, miR-194 i miR-767-5p [18]. MiR-143 może regulować ekspresję genu IL13Ra1 w ANN, miR-187 jest indukowany przez IL-10 i negatywnie reguluje ekspresję innych mediatorów prozapalnych w monocytach, miR-224 reguluje szlak sygnałowy TLR4/MyD88/NF- κ B i CDK9, a miR-498 może być regulowany przez lncRNA Linc00632 [19-22]. Z kolei analiza profilu ekspresji miRNA w osoczu wykazała 7 miRNA, których ekspresja znacząco różniła się pomiędzy grupą pacjentów z astmą, pacjentów z ANN i grupą osób zdrowych: miR-1, miR-21, miR-125b, miR-126, let-7b, let-7c i let-7e, które to również w większości regulują geny związane ze stanem zapalnym [23]. Badania te wskazują potencjał miRNA jako biomarkerów diagnostycznych oraz potencjalnych celów terapeutycznych.

lncRNA

Długie niekodujące RNA pełnią szereg rozmaitych funkcji, związanych z translacją i transkrypcją; są również w stanie regulować ekspresję miRNA. Analiza lncRNA wykazała istotnie zmienioną ekspresję ponad dwóch tysięcy cząsteczek w nabłonku dróg oddechowych u pacjentów z ANN w porównaniu do osób zdrowych [24]. Badacze zbadali również ekspresję RNA, co pozwoliło im na analizę interakcji pomiędzy lncRNA i mRNA i identyfikację 143 potencjalnych sieci genów, m.in. szlaki sygnałowe związane z rozwojem ANN, takie jak szlak IL-13, NF- κ B i Fc ϵ RI. Yue i wsp. wykazali zmniejszoną ekspresję Linc00632 u pacjentów z ANN, która negatywnie reguluje ekspresję miR-498 i docelo-

wo może blokować skutki nadekspresji IL-13, tj. wyższą ekspresję GM-CSF, eotaksyny i MUC5AC [22]. Badania nad lncRNA-ANRIL udowodniły z kolei, iż jego wyciszenie może powstrzymać produkcję cytokin prozapalnych i mucyny w komórkach nabłonka dróg oddechowych stymulowanego IL-13 (model *in vitro* imitujący ANN) poprzez regulację miR-15a-5p i szlaku JAK2 [25]. lncRNA-NEAT1 charakteryzuje się zwiększoną ekspresją w nabłonku dróg oddechowych pacjentów z ANN, a także wykazał pozytywną korelację z objawami klinicznymi choroby i poziomem cytokin zapalnych, a więc mógłby być stosowany jako biomarker ciężkości choroby [26]. Ponadto, lncRNA-NEAT1 może także regulować rozwój choroby poprzez miR-511 i gen NR4A2 [27]. Z kolei, lncRNA-THRIL, lncRNA-GAS-5 i lncRNA-HIPK3 wpływają na brak równowagi pomiędzy limfocytami Th1 i Th2. lncRNA-THRIL poprzez regulację miR-125b ma wpływ na przebieg ciężkości choroby, lncRNA-GAS5 reguluje miR-21 i miR-140, natomiast HIPK3 może regulować miR-495 [28-30].

circRNA

Kolistę RNA to okrągłe cząsteczki powstałe w procesie back-splicing [31]. Ich funkcja to modulacja działania miRNA, regulacja transkrypcji genów oraz regulacja procesów postranskrypcyjnych. Badania nabłonka dróg oddechowych w mysim modelu ANN zidentyfikowały 86 circRNA o istotnie podwyższonej lub zmniejszonej ekspresji; część z nich wykazała udział w aktywacji komórek B i T [32]. Również w mysim modelu wykryto podwyższoną ekspresję circHIPK3, który blokował działanie miR-495 i wpływał na zmianę aktywności GATA3. W rezultacie nastąpiła przewaga odpowiedzi zapalnej Th2, wraz ze zwiększoną produkcją cytokin zapalnych, które nasilały objawy kliniczne [30]. Badanie profilu ekspresji circRNA w krwi wykazało znacząco wyższe stężenie hsa_circRNA_404013 u pacjentów z ANN w porównaniu do osób zdrowych; ten kolisty RNA korelował rów-

nież z objawami choroby oraz ekspresją BDNF i mógłby być potencjalnie stosowany jako biomarker ułatwiający diagnozę choroby [33].

W kompleksowym badaniu interakcji pomiędzy circRNA, miRNA i mRNA zidentyfikowano 264 circRNA o istotnie różnej ekspresji u osób z ANN w porównaniu do grupy kontrolnej [34]. Analiza interakcji zidentyfikowała sieć 17 miRNA, 11 circRNA i 29 mRNA, które są częścią szlaków sygnałowych Wnt, PI3K-Akt, biosyntezy TNF, odpowiedzi zapalnej i receptorów Toll-podobnych. Najbardziej istotne były hsa_circ_0008668, circTRIQQ, hsa_circ_0029853 i circRNA_01002. Inne badanie interakcji wykazało, iż circARRDC3 występuje w sieci interakcji z miR-375 i KLF4, powodując zmiany w ekspresji genów odpowiedzialnych za przebieg stanu zapalnego, tj. GM-CSF, eotaksyny i MUC5AC w nabłonku dróg oddechowych [35]. Ponadto, u pacjentów z ANN ekspresja miR-375, KLF4 i circARRDC3 jest istotnie zmieniona w porównaniu do grupy kontrolnej, co wskazuje iż ekspresja tych cząsteczek jest od siebie zależna, a jej nieprawidłowy poziom może mieć wpływ na rozwój choroby.

Podsumowanie

Badania mechanizmów epigenetycznych są niezwykle istotne, gdyż umożliwiają identyfikację nowych biomarkerów oraz powstanie nowych metod terapeutycznych. Niektóre z badanych substancji czy genów powodują inhibicję zmian epigenetycznych i przywracają równowagę pomiędzy limfocytami Th1 i Th2 oraz produkowanych przez nie cytokin [36]. Efekt jest szczególnie widoczny w przypadku inhibicji enzymów odpowiadających za acetylację histonów czy przy wpływie immunoterapii podjęzykowej na modyfikacje metylacji DNA. Duży potencjał terapeutyczny mają także niekodujące RNA, w szczególności miRNA czy circRNA, gdyż regulacja ich ekspresji może przywrócić prawidłowe funkcjonowanie całych szlaków sygnałowych. ■

Prace nadesłano
14.03.2023
Zaakceptowano do
druku 13.04.2023

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

Piśmiennictwo: 1. Brozek JL, Bousquet J, Agache I, Agarwal A, Bachert C, Bosnic-Anticevich S, et al. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines-2016 revision. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):950-8. 2. Shaaban R, Zureik M, Soussan D, Neukirch C, Heinrich J, Sunyer J, et al. Rhinitis and onset of asthma: a longitudinal population-based study. *Lancet.* 2008;372(9643):1049-57. 3. Khan DA. Allergic rhinitis and asthma: epidemiology and common pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* 2014;35(5):357-61. 4. Choi BY, Han M, Kwak JW, Kim TH. Genetics and Epigenetics in Allergic Rhinitis. *Genes (Basel).* 2021;12(12). 5. Zhang L, Lu Q, Chang C. Epigenetics in Health and Disease. *Adv Exp Med Biol.* 2020;1253:3-55. 6. Zhang Y, Sun Z, Jia J, Du T, Zhang N, Tang Y, et al. Overview of Histone Modification. *Adv Exp Med Biol.* 2021;1283:1-16. 7. Wang Y, Lv L, Zang H, Gao Z, Zhang F, Wang X, et al. Regulation of Tre1 expression in nasal mucosa with allergic rhinitis by specific immunotherapy. *Cell Biochem Funct.* 2015;33(1):23-8. 8. Jiang J, Liu JQ, Li J, Li M, Chen HB, Yan H, et al. Tre1 contributes to maintaining nasal epithelial barrier integrity. *Sci Rep.* 2015;5:9191. 9. Cho JS, Kang JH, Han IH, Um JY, Park IH, Lee SH, et al. Antiallergic Effects of Trichostatin A in a Murine Model of Allergic Rhinitis. *Clin Exp Otorhinolaryngol.* 2015;8(3):243-9. 10. Wang J, Wen L, Wang Y, Chen F. Therapeutic Effect of Histone Deacetylase Inhibitor, Sodium Butyrate, on Allergic Rhinitis *In Vivo*. *DNA Cell Biol.* 2016;35(4):203-8. 11. Moore LD, Le T, Fan G. DNA methylation and its basic function. *Neuropharmacology.* 2013;38(1):23-38. 12. Li JY, Zhang Y, Lin XP, Ruan Y, Wang Y, Wang CS, et al. Association between DNA hypomethylation at IL13 gene and allergic rhinitis in house dust mite-sensitized subjects. *Clin Exp Allergy.* 2016;46(2):298-307. 13. 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. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;138(3):748-53. 14. Swamy RS, Reshamwala N, Hunter T, Vissamsetti S, Santos CB, Baroody FM, et al. Epigenetic modifications and improved regulatory T-cell function in subjects undergoing dual sublingual immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol.* 2012;130(1):215-24 e7. 15. Stachowiak Z, Narozna B, Szczepankiewicz A. Non-Coding RNAs in Pulmonary Diseases: Comparison of Different Airway-Derived Biosamples. *Int J Mol Sci.* 2023;24(3). 16. Cheng S, Tang Q, Xie S, Wen S, Zhang H, Xie Z, et al. The Role of Noncoding RNA in Airway Allergic Diseases through Regulation of T Cell Subsets. *Mediators Inflamm.* 2022;2022:6125698. 17. Suojalehto H, Lindstrom I, Majuri ML, Mitts C, Karjalainen J, Wolff H, et al. Altered microRNA expression of nasal mucosa in long-term asthma and allergic rhinitis. *Int Arch Allergy Immunol.* 2014;163(3):168-78. 18. Shaoqing Y, Ruxin Z, Guojun L, Zhiqiang Y, Hua H, Shudong Y, et al. Microarray analysis of differentially expressed microRNAs in allergic rhinitis. *Am J Rhinol Allergy.* 2011;25(6):e242-6. 19. Teng Y, Zhang R, Liu C, Zhou L, Wang H, Zhuang W, et al. miR-143 inhibits interleukin-13-induced inflammatory cytokine and mucus production in nasal epithelial cells from allergic rhinitis patients by targeting IL13Ralpha1. *Biochem Biophys Res Commun.* 2015;457(1):58-64. 20. Rossato M, Curtale G, Tamassia N, Castellucci M, Mori L, Gasperini S, et al. IL-10-induced microRNA-187 negatively regulates TNF-alpha, IL-6, and IL-12p40 production in TLR4-stimulated monocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(45):E3101-10. 21. Wu J, Wu L, Zhang L, Xu H, Wang M, Wang L, et al. Overexpression of miR-224-5p alleviates allergic rhinitis in mice via the TLR4/MyD88/NF-kappaB pathway. *Exp Anim.* 2021;70(4):440-9. 22. Yue L, Yin X, Hao F, Dong J, Ren X, Xu O, et al. Long Noncoding RNA Linc00632 Inhibits Interleukin-13-Induced Inflammatory Cytokine and Mucus Production in Nasal Epithelial Cells. *J Innate Immun.* 2020;12(1):116-28. 23. Panganiban RP, Wang Y, Howrylak J, Chinchilli VM, Craig TJ, August A, et al. Circulating microRNAs as biomarkers in patients with allergic rhinitis and asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 2016;137(5):1423-32. 24. Ma Z, Teng Y, Liu X, Li J, Mo J, Sha M, et al. Identification and Functional Profiling of Differentially Expressed Long Non-Coding RNAs in Nasal Mucosa with Allergic Rhinitis. *Tohoku J Exp Med.* 2017;242(2):143-50. 25. Liu HW, Hu ZL, Li H, Tan QF, Tong J, Zhang YQ. Knockdown of lncRNA ANRIL suppresses the production of inflammatory cytokines and mucin 5AC in nasal epithelial cells via the miR-15a-5p/JAK2 axis. *Mol Med Rep.* 2021;23(2). 26. Wu X, Zhao S, Huang W, Huang L, Huang M, Luo X, et al. Aberrant expressions of circulating lncRNA NEAT1 and microRNA-125a are linked with Th2 cells and symptom severity in pediatric allergic rhinitis. *J Clin Lab Anal.* 2022;36(3):e24235. 27. Wang T, Cai W, Wu Q, Chen D, Wang P, Xu Z. Exosomal lncRNA Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1 (NEAT1) contributes to the progression of allergic rhinitis via modulating microRNA-511/Nuclear Receptor Subfamily 4 Group A Member 2 (NR4A2) axis. *Bioengineered.* 2021;12(1):8067-79.