

Znaczenie modyfikacji epigenetycznych w modulacji odpowiedzi immunologicznej typu T2 w rozwoju astmy i alergii

The role of epigenetic modifications in the modulation of T2-type immune responses in the development of asthma and allergy

ALEKSANDRA LIKOŃSKA, KINGA KLIMCZAK, MAREK L. KOWALSKI, MACIEJ CHAŁUBIŃSKI

Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi

Streszczenie

Czynniki środowiska zewnętrznego takie, jak stres, zanieczyszczenie powietrza, dieta, wysiłek fizyczny czy infekcje wywołują zmiany epigenetyczne w komórkach organizmu człowieka, w tym w komórkach układu opornościowego. Modyfikacje epigenetyczne mogą po części tłumaczyć związek między wzrostem częstości występowania astmy i alergii, obserwowanym na przestrzeni kilku ostatnich dekad, z działaniem czynników środowiskowych na organizm człowieka przez całe życie - począwszy od okresu płodowego, a obejmujących zanieczyszczenia i alergeny, dietę oraz mikroby. Celem niniejszej pracy jest analiza znaczenia modyfikacji epigenetycznych w modulacji odpowiedzi immunologicznej typu T2 w rozwoju astmy i alergii.

Słowa kluczowe: epigenetyka, alergia, astma, zapalenie alergiczne, metylacja

Summary

Factors of the external environment, such as stress, air pollution, diet, exercise or infections cause epigenetic changes in the cells of the human body, including the cells of the immune system. Epigenetic modifications may partly explain the relationship between the increase in the incidence of asthma and allergies observed over the past few decades, and the effects of environmental factors on the human body throughout their lives - starting from the fetal period, including pollution and allergens, diet and microbes. The aim of this study is to analyze the importance of epigenetic modifications in the modulation of T2-type immune responses in the development of asthma and allergies.

Keywords: epigenetics, allergy, asthma, allergic inflammation, methylation

© Alergia Astma Immunologia 2020, 25 (2): 50-54
www.alergia-astma-immunologia.pl



Adres do korespondencji / Address for correspondence

Dr hab. n. med. Maciej Chałubiński,
Klinika Immunologii i Alergii, Uniwersytet Medyczny w Łodzi
ul. Pomorska 251, 92-213 Łódź
tel. 42 675 73 09.

Czynniki środowiska zewnętrznego takie, jak stres, zanieczyszczenie powietrza, dieta, wysiłek fizyczny czy infekcje wywołują zmiany epigenetyczne w komórkach organizmu człowieka, w tym w komórkach układu opornościowego. Zmiany te, nie modyfikując sekwencji DNA, regulują ekspresję genów m.in. na poziomie regionów promotorowych, wpływając tym samym na funkcjonowanie komórek - ich aktywację, polaryzację czy zdolność do wydzielania różnorodnych cytokin. Co ważne, zostają one utrwalone w kolejnych pokoleniach. Zmiany epigenetyczne mogą mieć charakter fizjologiczny, przystosowawczy - w układzie odpornościowym stanowią jeden z mechanizmów kształtowania tolerancji immunologicznej, koniecznej do utrzymania homeostazy. Z drugiej strony mogą stać się podłożem różnych nieprawidłowości, np. w zakresie nadmiernej polaryzacji odpowiedzi zapalnej w kierunku T2, obserwowanej w przypadku niektórych chorób alergicznych czy astmy [1].

W ostatnich kilkudziesięciu latach nastąpił nieobserwowany wcześniej dynamiczny wzrost występowania chorób alergicznych, szczególnie w populacjach krajów i obszarów o znacznym rozwoju ekonomicznym. W byłej Niemieckiej

Republice Demokratycznej (NRD) częstość występowania chorób alergicznych dramatycznie wzrosła w ciągu zaledwie 20 lat od zjednoczenia Niemiec [2, 3]. Ponieważ kilka dekad to okres zbyt krótki, aby wzrost ten wynikał z przekształceń ewolucyjnych, zależnych od zmian na poziomie genomu, przyczyn tego stanu upatruje się w modyfikacjach epigenetycznych, które mogą zachodzić szybciej. Wyniki licznych analiz epidemiologicznych wskazują, że kluczową rolę w tym procesie może odgrywać oddziaływanie środowiska życia człowieka. Dlatego zmiany zachodzące na poziomie epigenetycznym, będące odzwierciedleniem oddziaływania czynników środowiskowych, stają się po części podstawą do wyjaśnienia wpływu środowiska na rozwój alergii i astmy [4, 5].

Mechanizmy modyfikacji epigenetycznych

Modyfikacje epigenetyczne polegają na przekształcaniach chemicznych DNA lub histonów tworzących chromatynę, które nie wpływają na jego sekwencję, czyli kolejność ułożenia poszczególnych nukleotydów, ale powodują zmianę poziomu ekspresji danego genu lub grupy genów, co przekłada się na utrwalenie zmian funkcjonalności ko-

mórki. Modyfikacje epigenetyczne mogą dotyczyć samego DNA, tu zasadniczym mechanizmem jest metylacja. Zachodzą również w obrębie struktur chromatyny drogą chemicznej modyfikacji histonów głównie w procesie metylacji, acetylacji i fosforylacji [6]. Metylacja DNA polega na dołączeniu grupy metylowej do cytozyny, co prowadzi do powstania 5-metylocytozyny. Metylacji podlegają najczęściej regiony promotorowe lub wzmacniające genów (*promotor or enhancer regions*) oraz białka regulujące chromatynę (MeCP2, MBD2). Jeśli do metylowanego regionu dołączone są kolejne grupy metylowe, mówimy o hipermetylacji. Metylacja w komórkach somatycznych najczęściej występuje w regionie tzw. wysp CpG (cytozyna-fosforanguanozyna). Metylacja odpowiada za zmniejszenie ekspresji genu. Demetylacja DNA jest to usuwanie zaistniałej w przeszłości metylacji; w procesie tym liczba grup metylowych zazwyczaj ulega zmniejszeniu, ale nie są usuwane wszystkie. Demetylacja prowadzi do zwiększenia ekspresji genu. Metylacja i demetylacja histonów, na których nawinięte jest DNA, opiera się na przyłączeniu grupy metylowej do lizyny, często w obrębie motywu N-końcowego tzw. „ogona histonu”. Histony podlegają również reakcjom acetylacji i deacetylacji, polegającym na dołączeniu lub odłączeniu grupy acetylowej (CH₃CO) do lizyny. Acetylacja lizyny neutralizuje dodatni ładunek przez co chromatyna staje się hydrofobowa, a to rozluźnia jej strukturę i ułatwia transkrypcję, podczas gdy deacetylacja daje efekt odwrotny. Wpływ zmian epigenetycznych w obszarze chromatyny na regulację ekspresji genów jest bardziej złożony; nie jest on przedmiotem niniejszego opracowania. Działanie enzymów odpowiadających za powyższe zmiany biochemiczne podsumowano w Tabeli I.

Epigenetyczna regulacja polaryzacji cytokinowej limfocytów Th

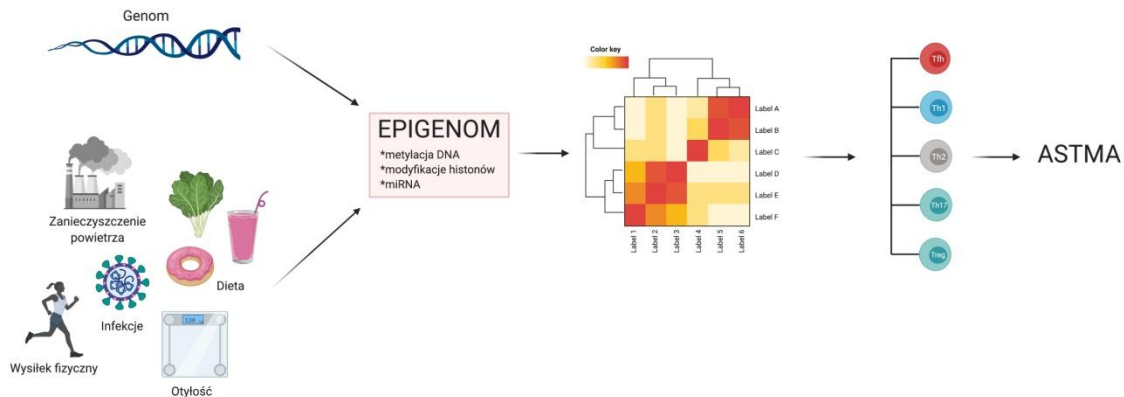
Polaryzacja cytokinowa limfocytów dziewiczych Th0, czyli takich, które nie mają jeszcze dominującego profilu

wydzielanych cytokin, jest wynikiem procesu przekształceń zachodzących na poziomie epigenetycznym - w obrębie genów dla poszczególnych cytokin. Jest on dynamiczny i zależy m.in. od środowiska cytokinowego, które - modyfikując ekspresję właściwych czynników transkrypcyjnych oraz genów poszczególnych cytokin w komórce Th - te zmiany determinuje [6]. Prowadzi on z jednej strony do wyciszenia genów dla jednych cytokin, powodując mniejszy potencjał komórki do ich wytwarzania, z drugiej zaś wprowadza zmiany w genach innych cytokin ułatwiające ich ekspresję i tym samym predestynując komórkę do produkcji określonych cytokin. W efekcie polaryzacji może powstać komórka Th o profilach Th1, Th2, Th17, Treg i innych, zależnie od nabytej właściwości komórki do produkcji konkretnych cytokin.

Podczas polaryzacji komórek Th w kierunku Th1, będącej efektem oddziaływania IFN- γ i IL-12, dochodzi do demetylacji genów dla czynnika transkrypcyjnego TBX21 (T-bet) oraz IFN- γ . Demetylacja ułatwia ich ekspresję [7]. Jednocześnie dochodzi do wyciszenia genów cytokin przeciwważnych, metylacji bowiem podlegają regiony promotorowe genów dla IL-4, IL-13, IL-17 oraz RORC. Stąd komórka o profilu cytokinowym Th1 wytwarza głównie IFN- γ . W przypadku komórek Th2, które do rozwoju potrzebują IL-4 indukującej ekspresję czynnika transkrypcyjnego GATA3, jest odwrotnie [8]. Gen dla IFN- γ jest silnie metylowany, co utrudnia jego ekspresję. Podczas gdy geny dla GATA-3, a także cytokin: IL-4, IL-13 mają niski stopień metylacji (są hipometylowane), co zwiększa możliwość ich transkrypcji, dzięki czemu spolaryzowana komórka Th2 chętniej uwalnia IL-4 i IL-13 [9]. W komórkach T regulatorowych (Treg), które do rozwoju potrzebują TGF- β , dominuje hipometylowana forma czynnika FOXP3 determinującego profil funkcjonalny tych komórek, podczas gdy gen dla RORC jest wysoce etylowany [10]. W komórkach Th17 sytuacja w zakresie tych dwóch czynników jest odwrotna; dodatkowo obserwuje się w nich demetylację *loci* genów dla IL-17A

Tabela I. Podsumowanie działania enzymów uczestniczących w zmianach epigenetycznych

Enzym	Charakterystyka	Efekt biologiczny:
metylotransferaza 3A i 3B (DNMT3A i DNMT3B)	katalizuje metylację DNA do novo	↓ zmniejszona ekspresja genów
metylotransferaza 1 (DNMT1)	odpowiada za dziedziczność, katalizuje metylację DNA	↓ zmniejszona ekspresja genów
Dziesięć-jedenaście translokacja dioksygenametylocytozyny 1 (TET1)	usuwanie grup metylowych	↑ zwiększona ekspresja genów
metylotransferazahistonowa (HMT)	przeniesienie grupy metylowej na lizynę lub argininę w obrębie histonów	↓ zmniejszona ekspresja genów
demetylazahistonowa (HDM)	usuwanie grup metylowych w obrębie histonów	↑ zwiększona ekspresja genów
acetylotransferaza histonowa (HAT)	dodawanie grupy acetylowej do lizyny	↑ zwiększona ekspresja genów
deacetylazahistonowa (HDAC)	usuwanie grupy acetylowej	↓ zmniejszona ekspresja genów
inhibitor deacetylazyhistonowej (HDACis)	hamują deacetylację histonów	↑ zwiększona ekspresja genów



Ryc. 1. Wpływ czynników środowiskowych (zanieczyszczenie powietrza, dieta, infekcje, otyłość, wysiłek fizyczny) na modyfikacje epigenetyczne, które skutkują zmianą ekspresji genów, a w konsekwencji zmianą polaryzacji odpowiedzi Th-zależnej, która stanowi jeden z immunopatomechanizmów astmy oskrzelowej (Created with BioRender.com).

oraz T-bet [11]. Zatem polaryzacja i potencjał do syntezy cytokin przez populację spolaryzowanych komórek Th są ściśle kontrolowane na poziomie zmian epigenetycznych regionów promotorowych genów kodujących czynniki transkrypcyjne i cytokiny charakterystyczne dla poszczególnych profili cytokinowych komórek Th.

Modyfikacje epigenetyczne jako jeden z mechanizmów rozwoju astmy i alergii

Modyfikacje epigenetyczne w komórkach układu odpornościowego i nabłonka oddechowego mogą po części tłumaczyć związek między wzrostem częstości występowania astmy i alergii, obserwowanym na przestrzeni kilku ostatnich dekad, z działaniem czynników środowiskowych na organizm człowieka przez całe życie - począwszy od okresu płodowego, a obejmujących zanieczyszczenia i alergeny, dietę oraz mikrobiom [1, 4] (Ryc. 1.). Zapalenie alergiczne charakteryzuje głównie odpowiedź immunologiczna typu T2, w którą angażują się m.in. komórki Th2 oraz stosunkowo niedawno opisane wrodzone komórki limfoidalne 2 (ILC2, *innate lymphoid cells 2*), zdolne do produkcji dużych ilości IL-5 i IL-4, odpowiedzialnej za produkcję IgE, eozynofile, mastocyty, również będące źródłem m.in. wyżej wymienionych mediatorów, jak też komórki nabłonka oddechowego uwalniające w określonych okolicznościach po zadziaaniu szczególnych bodźców cytokiny takie, jak: IL-33, IL-25 oraz TSLP. Układ odpornościowy w przebiegu chorób alergicznych wykazuje większe tendencje do generowania odpowiedzi typu T2, która dominuje nad potencjałem generowania mechanizmów T1-zależnych, opartych na działaniu m.in. IFN- γ i IL-12. Stan tej „T2-dominacji” może wynikać z nieprawidłowej aktywności komórek T regulatorowych (Treg), uwalniających IL-10, odpowiedzialnych za utrzymanie tolerancji immunologicznej. U chorych z zaburzeniami alergicznymi i astmą zaobserwowano liczne zmiany na poziomie epigenetycznym zarówno w komórkach układu odpornościowego, jak i w komórkach nabłonka oddechowego i skóry, zwiększające potencjał immunologiczny do generowania odpowiedzi typu T2. Wyniki badań wykazują, że u chorych na astmę oskrzelową uczulonych na alergeny roztoczy kurzu domowego niski poziom metylacji genu dla IL-4 koreluje ze zwiększoną ekspresją i produkcją IL-4 [12]. Jednocześnie zwiększona metylacja na obszarze genów dla FOXP3 i IFN- γ może skutkować niższą ekspresją tych genów w komórkach Treg i efektoro-

wych Th u chorych na astmę, co wiąże się z obniżeniem ich aktywności [13].

Wiele czynników środowiskowych obejmujących alergeny, zanieczyszczenia powietrza i wody czy elementy zawarte w diecie jest w stanie wywoływać zmiany epigenetyczne w genomie komórek układu odpornościowego, prowadząc do ich przeprofilowania, zwiększonej tendencji do produkcji cytokin typu T2, mniejszej aktywności T1-zależnej i wreszcie tłumienia komórek Treg. Wykazano, że ekspozycja na alergeny roztoczy kurzu domowego oraz na cząstki spalin z silników Diesla, może zmniejszać poziom metylacji genów cytokin typu T2 (IL-4, IL-5) i zwiększać poziom metylacji genów cytokin typu T2 (IFN- γ) w komórkach Th CD4+ oraz jednojądrowych komórkach krwi obwodowej (PBMCs) [14]. Dodatkowo odnotowano, że cząstki spalin z silników Diesla nasilają produkcję IgE wobec alergenów środowiskowych. Wzrost ten może wynikać ze zwiększonej metylacji promotora genu dla IFN- γ i jednocześnie zmniejszonej metylacji promotora genu dla IL-4, umożliwiającej łatwiejszą jej ekspresję. Taki stan immunologiczny sprzyja nadmiernej produkcji przeciwciał klasy IgE, za co odpowiedzialna jest IL-4. Warto zauważyć, że dieta bogata w tzw. „donory metylowe”, czyli związki chemiczne o wysokim stopniu metylacji, sprzyja rozwojowi fenotypu T2. Możliwy mechanizm tego zjawiska może obejmować m.in. hipermetylację i w konsekwencji wyciszenie genu czynnika transkrypcyjnego RUNX3, genu, którego rolą jest m.in. hamowanie aktywności genu dla IL-4 oraz zwiększanie ekspresji genu dla FOXP3, sprzyjającego aktywacji mechanizmów tolerancji immunologicznej [15]. Zaobserwowano również, że metylacja w regionie promotora FOXP3 oraz w intronowym regionie genu dla IL-10 jest większa u osób chorych na astmę w porównaniu z osobami zdrowymi. Podwyższony poziom metylacji wynikał z narażenia na zanieczyszczenia obejmujące: tlenek węgla (CO), dwutlenek azotu (NO₂), ozonu czy pyłów zawieszonych PM_{2,5} nawet 90 dni po ekspozycji [16].

Związek zmian epigenetycznych zachodzących w życiu płodowym z rozwojem alergii i astmy

Uważa się, że zmiany na poziomie epigenetycznym i ich związek z utwaleniem skłonności do generowania odpowiedzi immunologicznej typu T2 i rozwoju chorób alergicznych mogą zachodzić już na etapie życia płodowego.

Zaobserwowano zależności między ekspozycją na dym tytoniowy matek ciężarnych z rozwojem atopowego zapalenia skóry u dzieci w 2 rż., a metylacją genu dla limfopoetyny zrębu grasicy (TSLP) w leukocytach krwi pępowinowej [17]¹⁷. Co ciekawe, odnotowano również różnice w poziomie metylacji promotora genu dla TSLP, ekspresji mRNA dla TSLP oraz stężenia samego białka TSLP w wycinkach skóry zapalnie zmienionej u dzieci chorych na AZS w porównaniu z próbkami pobranymi ze skóry zdrowej [18]. Wykazano, że oddziaływanie wielopierścieniowych węglowodorów aromatycznych u kobiet ciężarnych może być związane z hipermetylacją promotora dla IFN- γ w leukocytach krwi pępowinowej, co przekłada się na ich mniejszą zdolność wytwarzania tej promującej odpowiedź typu T1 cytokiny [19]. W innym badaniu odnotowano, że silna ekspozycja na wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne może wiązać się z bardziej nasiloną metylacją DNA *locus* FOXP3 komórek Treg pochodzących z jednojądrowych komórek krwi obwodowej (PBMCs). Co ciekawe, powyższe zjawisko było bardziej wyraźne u dzieci chorych na astmę, niż u dzieci zdrowych [20]. Należy zaznaczyć, że zmiany na poziomie epigenetycznym mogą przekładać się na potencjał do produkcji przeciwciał klasy IgE. Otóż u potomstwa myszy ciężarnych karmionych paszą o dużej zawartości „donorów metylowych” stwierdzono wyższy poziom przeciwciał IgE w porównaniu ze zwierzętami niepoddanymi diecie o dużej zawartości związków metylowanych [21]. Istotnym czynnikiem oddziałującym w okresie prenatalnym, jak i poporodowym, jest również dym tytoniowy, narażenie na który silnie wiąże się ze zwiększonym ryzykiem rozwoju astmy i alergii. U podłoża tego związku może leżeć zdolność licznych substancji dymu tytoniowego do modyfikacji epigenetycznych [22 – 24].

Terapia alergii i astmy oparta o modyfikację epigenetyczną odpowiedzi immunologicznej typu T2

Wiedza dotycząca udziału i znaczenia szeroko pojętych zmian epigenetycznych w patogenezie alergii i astmy może stać się w przyszłości podstawą opracowania terapii opartych o modyfikację statusu epigenetycznego poszczególnych komórek czy tkanek. Dotychczas zaobserwowano bowiem, że samoistne ustąpienie astmy czy alergii IgE-zależnej, np. na alergeny mleka krowiego po włączeniu diety eliminacyjnej, będącej przejawem tzw. „wyrastania z alergii” - naturalnego zjawiska obserwowanego nierazdoko w klinice - wiąże się z jednoczesnymi zmianami stanu metylacji genu dla FOXP3, odpowiedzialnego za jeden z mechanizmów indukcji tolerancji immunologicznej zależ-

nej od komórek Treg [6, 25]. Co więcej, u dzieci odczuwanych drogą doustną oraz u chorych, u których stosowano swoistą immunoterapię alergenową metodą podjęzykową, zaobserwowano zachodzenie procesu demetylacji regionu TSDR genu dla FOXP3 (Treg-Specific Demethylation Region), warunkującego stabilną ekspresję czynnika FOXP3 [26].

W badaniach na zwierzętach wykazano, że podawanie myszom ciężarnym probiotycznego szczepu *Acinetobacter lwoffii* F78, którego obecność i naturalną ekspozycję zidentyfikowano na obszarach wiejskich, {3-135,136} może zapobiec rozwojowi astmy w modelu z zastosowaniem owoalbuminy [27]. Prewencyjne działanie tego probiotyku wiązało się z nasiloną acetylacją histonu 4 w promotorze genu dla IFN- γ i deacetylacją w genie dla IL-4 w komórkach T CD4 + i w konsekwencji przyczyniło się do obniżenia ekspresji IL-4 i odpowiedzi immunologicznej typu T2 [28]. Co więcej, w niewielkim badaniu interwencyjnym wykazano, że przyjmowanie z pokarmem *Lactobacillus rhamnosus* przez dzieci z alergią na białko mleka krowiego sprzyjało zjawisku „wyrośnięcia z alergii”, do którego mogły przyczynić się zmiany epigenetyczne w genach czynników odpowiedzialnych za regulację odpowiedzi typu T1/T2 [25].

Na horyzoncie pojawiają się również możliwości zastosowania nowoczesnych terapii celowo ingerujących w status epigenetyczny genów [29]. Co warto podkreślić, już stosowane obecnie glikokortykosteroidy posiadają właściwości zmniejszające aktywność deacetylazy histonowej (HDAC), jednego z enzymów generujących zmiany epigenetyczne [30]. Natomiast specyficzne związki hamujące aktywność metylotransferaz - enzymów odpowiedzialnych m.in. za metylację DNA wprowadzone w pierwszej dekadzie XXI w. w leczeniu białaczek - nie znalazły zastosowania w obszarze chorób alergicznych i astmy. Choć obecnie prowadzi się badania na zwierzętach nad zastosowaniem azacytydyny w leczeniu astmy w oparciu o zmianę statusu metylacji genomu komórek Treg [31]. Co więcej, wykazano, że inhibitory deacetylazy histonowej oraz trichostatyna A mogą wybiórczo obniżyć ekspresję cytokin typu T2, zmniejszając tym samym nasilenie objawów atopowego zapalenia skóry (AZS) w modelu zwierzęcym tej choroby [32]. Odnotowano również dobre efekty zastosowania inhibitora demetylaz H3K27me3 w zapobieganiu rozwojowi astmy w modelu zwierzęcym choroby [21].

Opracowanie skutecznej terapii alergii i astmy w oparciu o celową modyfikację genów odpowiedzialnych za generowanie przez układ odpornościowy odpowiedzi immunologicznej typu T2 na poziomie epigenetycznym wymaga jeszcze lepszego zrozumienia tych złożonych mechanizmów i zależności, co zapewne zajmie najbliższe lata.

Piśmiennictwo

1. Yang IV, Lozupone CA, Schwartz DA. The environment, epigenome, and asthma. *J Allergy Clin Immunol* 2017; 140:14-23.
2. Kramer U, Schmitz R, Ring J, Behrendt H. What can reunification of East and West Germany tell us about the cause of the allergy epidemic? *Clin Exp Allergy* 2015; 45:94-107.
3. Kramer U, Oppermann H, Ranft U, Schafer T, Ring J, Behrendt H. Differences in allergy trends between East and West Germany and possible explanations. *Clin Exp Allergy* 2010; 40:289-98.
4. Kabesch M, Michel S, Tost J. Epigenetic mechanisms and the relationship to childhood asthma. *Eur Respir J* 2010; 36:950-61.
5. Renz H, Conrad M, Brand S, Teich R, Garn H, Pfefferle PI. Allergic diseases, gene-environment interactions. *Allergy* 2011; 66 Suppl 95:10-2.
6. Potaczek DP, Harb H, Michel S, Alhamwe BA, Renz H, Tost J. Epigenetics and allergy: from basic mechanisms to clinical applications. *Epigenomics* 2017; 9:539-71.
7. Hirahara K, Vahedi G, Ghoreschi K, Yang XP, Nakayama S, Kanno Y, et al. Helper T-cell differentiation and plasticity: insights from epigenetics. *Immunology* 2011; 134:235-45.
8. Tindemans I, Serafini N, Di Santo JP, Hendriks RW. GATA-3 function in innate and adaptive immunity. *Immunity* 2014; 41:191-206.

9. Rodriguez RM, Lopez-Larrea C, Suarez-Alvarez B. Epigenetic dynamics during CD4(+) T cells lineage commitment. *Int J Biochem Cell Biol* 2015; 67:75-85.
10. Devaud C, Darcy PK, Kershaw MH. Foxp3 expression in T regulatory cells and other cell lineages. *Cancer Immunol Immunother* 2014; 63:869-76.
11. Cohen CJ, Crome SQ, MacDonald KG, Dai EL, Mager DL, Levings MK. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *J Immunol* 2011; 187:5615-26.
12. Alizadeh Z, Mortaz E, Adcock I, Moin M. Role of Epigenetics in the Pathogenesis of Asthma. *Iran J Allergy Asthma Immunol* 2017; 16:82-91.
13. Runyon RS, Cachola LM, Rajeshuni N, Hunter T, Garcia M, Ahn R, et al. Asthma discordance in twins is linked to epigenetic modifications of T cells. *PLoS One* 2012; 7:e48796.
14. Liu J, Ballaney M, Al-alem U, Quan C, Jin X, Perera F, et al. Combined inhaled diesel exhaust particles and allergen exposure alter methylation of T helper genes and IgE production in vivo. *Toxicol Sci* 2008; 102:76-81.
15. Bruno L, Mazzarella L, Hoogenkamp M, Hertweck A, Cobb BS, Sauer S, et al. Runx proteins regulate Foxp3 expression. *J Exp Med* 2009; 206:2329-37.
16. Prunicki M, Stell L, Dinakarparandian D, de Planell-Saguer M, Lucas RW, Hammond SK, et al. Exposure to NO₂, CO, and PM_{2.5} is linked to regional DNA methylation differences in asthma. *Clin Epigenetics* 2018; 10:2.
17. Wang IJ, Chen SL, Lu TP, Chuang EY, Chen PC. Prenatal smoke exposure, DNA methylation, and childhood atopic dermatitis. *Clin Exp Allergy* 2013; 43:535-43.
18. Luo Y, Zhou B, Zhao M, Tang J, Lu Q. Promoter demethylation contributes to TSLP overexpression in skin lesions of patients with atopic dermatitis. *Clin Exp Dermatol* 2014; 39:48-53.
19. Tang WY, Levin L, Talaska G, Cheung YY, Herbstman J, Tang D, et al. Maternal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and 5-CpG methylation of interferon-gamma in cord white blood cells. *Environ Health Perspect* 2012; 120:1195-200.
20. Hew KM, Walker AI, Kohli A, Garcia M, Syed A, McDonald-Hyman C, et al. Childhood exposure to ambient polycyclic aromatic hydrocarbons is linked to epigenetic modifications and impaired systemic immunity in T cells. *Clin Exp Allergy* 2015; 45:238-48.
21. Hollingsworth JW, Maruoka S, Boon K, Garantziotis S, Li Z, Tomfohr J, et al. In utero supplementation with methyl donors enhances allergic airway disease in mice. *J Clin Invest* 2008; 118:3462-9.
22. Vardavas CI, Hohmann C, Patelarou E, Martinez D, Henderson AJ, Granell R, et al. The independent role of prenatal and postnatal exposure to active and passive smoking on the development of early wheeze in children. *Eur Respir J* 2016; 48:115-24.
23. Tanaka K, Miyake Y, Furukawa S, Arakawa M. Perinatal smoking exposure and behavioral problems in Japanese children aged 5 years: The Kyushu Okinawa Maternal and Child Health Study. *Environ Res* 2016; 151:383-8.
24. 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.
25. Paparo L, Nocerino R, Cosenza L, Aitoro R, D'Argenio V, Del Monaco V, et al. Epigenetic features of FoxP3 in children with cow's milk allergy. *Clin Epigenetics* 2016; 8:86.
26. Syed A, Garcia MA, Lyu SC, Bucayu R, Kohli A, Ishida S, et al. Peanut oral immunotherapy results in increased antigen-induced regulatory T-cell function and hypomethylation of forkhead box protein 3 (FOXP3). *J Allergy Clin Immunol* 2014; 133:500-10.
27. Debarry J, Garn H, Hanuszkiewicz A, Dickgreber N, Blumer N, von Mutius E, et al. *Acinetobacter lwoffii* and *Lactococcus lactis* strains isolated from farm cowsheds possess strong allergy-protective properties. *J Allergy Clin Immunol* 2007; 119:1514-21.
28. Brand S, Teich R, Dicke T, Harb H, Yildirim AO, Tost J, et al. Epigenetic regulation in murine offspring as a novel mechanism for transmaternal asthma protection induced by microbes. *J Allergy Clin Immunol* 2011; 128:618-25 e1-7.
29. Steelant B, Wawrzyniak P, Martens K, Jonckheere AC, Pugin B, Schrijvers R, et al. Blocking histone deacetylase activity as a novel target for epithelial barrier defects in patients with allergic rhinitis. *J Allergy Clin Immunol* 2019; 144:1242-53 e7.
30. Oh KS, Patel H, Gottschalk RA, Lee WS, Baek S, Fraser IDC, et al. Anti-Inflammatory Chromatin Landscape Suggests Alternative Mechanisms of Glucocorticoid Receptor Action. *Immunity* 2017; 47:298-309 e5.
31. Wu CJ, Yang CY, Chen YH, Chen CM, Chen LC, Kuo ML. The DNA methylation inhibitor 5-azacytidine increases regulatory T cells and alleviates airway inflammation in ovalbumin-sensitized mice. *Int Arch Allergy Immunol* 2013; 160:356-64.
32. Kim TH, Jung JA, Kim GD, Jang AH, Cho JJ, Park YS, et al. The histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, inhibits the development of 2,4-dinitrofluorobenzene-induced dermatitis in NC/Nga mice. *Int Immunopharmacol* 2010; 10:1310-5.