BIOMICS/БИОМИКА

ISSN 2221-6197 http://biomicsj.ru

АНАЛИЗ МЕТИЛИРОВАНИЯ ГЕНОВ ГИСТАМИНОВЫХ РЕЦЕПТОРОВ *HRH1* И *HRH2* У БОЛЬНЫХ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ И ЗДОРОВЫХ ИНДИВИДОВ

[1,2]Савельева О.Н., [1,2]Карунас А.С., [1,2]Федорова Ю.Ю., [1]Власова А.О., [1,2]Хуснутдинова Э.К.

[1]Институт биохимии и генетики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного научного учреждения Уфимского федерального исследовательского центра Российской академии наук, Россия, 450054, Республика Башкортостан, Уфа, Проспект Октября, 71
[2]Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования Башкирский государственный университет Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, 450076, Россия, Республика Башкортостан, Уфа, ул. Заки Валиди, 32
E-mail: olyasavelie@yandex.ru, carunas@list.ru

Резюме

Бронхиальная астма (БА) представляет собой одно из наиболее распространенных хронических респираторных заболеваний. Гистамин является центральным медиатором воспаления, играющим важную роль в обструкции дыхательных путей и бронхиальной секреции. Эпигенетические исследования больных БА подтверждают связь между эпигенетической регуляцией экспрессии генов и патогенезом данного заболевания. В последние годы выявляется все больше дифференциально метилированных CpG-сайтов, ассоциированных с риском развития и особенностями клинического течения БА. Целью данной работы был сравнительный анализ степени метилирования промоторных областей генов гистаминовых рецепторов *HRH1* и *HRH2* между больными БА и индивидами контрольной группы из Республики Башкортостан (РБ). В качестве материала исследования использованы образцы ДНК, выделенные из периферической крови 157 больных БА и 155 индивидов контрольной группы до 18 лет русской и татарской этнической принадлежности. При MS-HRM-анализе промоторной области гена гистаминового рецептора 1 типа *HRH1* выявлено, что уровень метилирования данного региона варьирует от 90% до 100%. Обнаружена значительно более высокая частота встречаемости полного метилирования (100%) промоторного региона гена *HRH1* у пациентов с БА по сравнению с контрольной выборкой. При MS-HRM-анализе промоторного региона гена гистаминового рецептора 2 типа *HRH2* показано, что уровень метилирования данной области составляет от 0% до 10%; достоверных различий в частоте встречаемости различных уровней метилирования у детей с БА и индивидов контрольной группы не установлено. Таким образом, обнаружено дифференциальное метилирование промоторной области гена *HRH1* между больными БА и контрольной группой, подтверждающее вовлечение эпигенетического механизма метилирования ДНК в патогенез данного заболевания.

Ключевые слова: бронхиальная астма, гистамин, метилирование ДНК, промоторная область

Цитирование: Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Власова А.О., Хуснутдинова Э.К. Анализ метилирования генов гистаминовых рецепторов *HRH1* и *HRH2* у больных бронхиальной астмой и здоровых индивидов // Biomics. 2022. Т.14(3). С. 258-263. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-22

© Авторы

THE METHYLATION ANALYSIS OF HISTAMINE RECEPTOR GENES *HRH1* AND *HRH2* IN ASTHMA PATIENTS AND HEALTHY INDIVIDUALS

[1,2]Savelieva O.N., [1,2]Karunas A.S., [1,2]Fedorova Yu.Yu., [1]Vlasova A.O., [1,2]Khusnutdinova E.K.

[1]Institute of Biochemistry and Genetics, Ufa Federal Research Center, Russian Academy of Sciences,
71 Pr. Oktyabrya, 450054, Ufa, Russia
[2]Federal State Budgetary Educational Institution of Higher Education Bashkir State University,
32 Zaki Validi, 450076, Ufa, Russia
E-mail: olyasavelie@yandex.ru, carunas@list.ru

Resume

Bronchial asthma is one of the most common chronic respiratory diseases. Histamine is a central mediator of inflammation which plays an important role in airway obstruction and bronchial secretion. Epigenetic studies of asthma patients confirm the association between the epigenetic regulation of gene expression and the pathogenesis of this disease. In recent years, an increasing number of differentially methylated CpG sites associated with the risk of asthma development and clinical course was identified. The aim of this work was to carry out a comparative analysis of the degree of methylation of the histamine receptor genes *HRH1* and *HRH2* promoter regions between with asthma patients and individuals of the control group from the Republic of Bashkortostan (RB). DNA samples isolated from the peripheral blood of 157 asthma patients and 155 controls under 18 years of age of Russian and Tatar ethnicity were used as the study material. MS-HRM analysis of the promoter region of the histamine receptor H1 gene *HRH1* showed that the methylation level of this region varies from 90% to 100%. A significantly higher frequency of complete methylation (100%) of the promoter region of the *HRH1* gene was found in patients with asthma compared to controls. MS-HRM analysis of the promoter region of the histamine receptor H2 gene *HRH2* showed that the methylation level of this region was from 0% to 10%; no significant differences in the frequency of different methylation levels in asthma children and individuals from the control group were found. Thus, differential methylation of the promoter region of the *HRH1* gene between asthma patients and controls was found confirming the involvement of the epigenetic mechanism of DNA methylation in the disease pathogenesis.

Key words: bronchial asthma, histamine, DNA methylation, promoter region

Citation: Savelieva O.N., Karunas A.S., Fedorova Yu.Yu., Vlasova A.O., Khusnutdinova E.K. The methylation analysis of histamine receptor genes *HRH1* and *HRH2* in asthma patients and healthy individuals. *Biomics*. 2022. T.14(3). C. 258-263. DOI: 10.31301/2221-6197.bmcs.2022-22 (In Russian)

© Authors

Введение

Бронхиальная астма представляет собой сложное многофакторное и гетерогенное респираторное заболевание, наследуемость которого достигает 74% у взрослых и 90% у детей. За последние несколько десятилетий проведен широкий ряд генетических исследований БА, в результате которых выявлены полиморфные варианты генов, ассоциированные с риском развития данного заболевания, при этом известно, что наследуемость БА носит полигенный характер и каждый из отдельных вариантов обычно вносит лишь небольшой вклад в формирование патологии [Gautam et al., 2022]. В настоящее время у больных БА все более активно исследуются эпигенетические изменения, такие как метилирование ДНК, модификации гистонов и экспрессия микроРНК, что приводит к более глубокому пониманию патогенетических механизмов заболевания и позволяет объяснить взаимодействие между генетическими вариантами и влиянием окружающей среды [Савельева О.Н. и др., 2019; Ntontsi et al., 2021; Gautam et al., 2022]. Метилирование ДНК является наиболее исследованным при БА эпигенетическим механизмом. Известно, что изменение уровня метилирования ДНК приводит к дифференциальной экспрессии генов цитокинов, факторов транскрипции и как следствие к различным фенотипическим проявлениям БА [Wasti et al., 2021]. При полноэпигеномных исследованиях БА (EWAS) обнаружены дифференциально метилированные CpG-сайты, ассоциированные с риском развития и особенностями клинического течения данного заболевания (https://ngdc.cncb.ac.cn/ewas/atlas).

Гистамин является важным медиатором воспаления, действие которого реализуется через 4 типа гистаминовых рецепторов, связанных с G-белком (HRH1, HRH2, HRH3, HRH4) [Kordulewska et al., 2019]. Обнаружено, что уровни гистамина повышены в бронхоальвеолярной жидкости пациентов с БА, в коже и плазме пациентов с атопическим дерматитом, в плазме и синовиальной жидкости пациентов с ревматоидным артритом и в плазме пациентов с псориатическим артритом [Micallef and Sasse, 2016]. Sobkowiak с коллегами установлен более высокий уровень экспрессии гена *HRH2* в лейкоцитах

периферической крови пациентов с БА, а также генов *HRH1* и *HRH2* в лейкоцитах больных аллергическим ринитом и атопическим дерматитом по сравнению с контролем европейского происхождения [Sobkowiak et al., 2020]. У больных с аллергией европейского происхождения обнаружена более высокая экспрессия мРНК гена *HRH1* в мононуклеарных клетках периферической крови пациентов в ответ на стимуляцию гистамином [Kordulewska et al., 2019]. Отдельные CpG-сайты генов *HRH1* и *HRH2* ранее изучены в группах больных БА и атопией различного происхождения [Nicodemus-Johnson et al., 2016; Cardenas et al., 2019; Forno et al., 2019], однако, у детей с БА и индивидов контрольной группы из РБ подобного исследования ранее не проводилось.

Целью данной работы был сравнительный анализ степени метилирования промоторных областей генов гистаминовых рецепторов *HRH1* и *HRH2* между больными БА и индивидами контрольной группы из РБ.

Материалы и методы

В исследовании использованы образцы ДНК 312 неродственных индивидов в возрасте до 18 лет из РБ русской и татарской этнической принадлежности. В общую выборку включены 157 больных БА, проходящих стационарное лечение в детском отделении Клиники БГМУ и ГБУЗ РДКБ города Уфа, и 155 практически здоровых индивидов с низким уровнем общего IgE (до 150 МЕ/мл), без бронхолёгочных и аллергических заболеваний. Участниками исследования либо их родителями подписано информированное согласие. Исследование одобрено биоэтическим комитетом ИБГ УФИЦ РАН (протокол № 7 от 10.02.2011 г.).

Образцы ДНК выделены из периферической крови методом фенольно-хлороформной экстракции, подвергнуты бисульфитной конверсии набором EZ DNA Methylation-Gold Kit (Zymo Research, США). Оценка уровня метилирования выполнена методом MS-HRM (Methylation-Sensitive High Resolution Melting) на приборе LightCycler® 96 Roche (Roche, Германия). Подбор праймеров для MS-HRM проведен в программе Methyl Primer Express Software v1.0 (Applied Biosystems, США). Бисульфит-конвертированные образцы метилированной (100%) и неметилированной ДНК (0%, Zymo Research, США) использованы для получения кривых плавления стандартных контролей по уровню метилирования. Контрольные стандарты метилированной и неметилированной ДНК (100%/0%) смешаны в определенном процентном соотношении (0/100, 5/95, 10/90, 25/75, 50/50, 75/25, 90/10, 100/0), вследствие чего уровень метилирования контрольных образцов соответственно равен 0%; 5%; 10%; 25%, 50%, 75%, 90% и 100%. Степень метилирования определена относительно кривых плавления стандартных контролей по метилированию, заданных в протоколе прибора LightCycler® 96 Roche как авто стандарты (Auto standard Curve). Результаты MS-HRM подтверждены секвенированием бисульфит-конвертированной ДНК на приборе ABI PRISM 3500 (Applied Biosystems, США).

Результаты и обсуждение

Проведено исследование 5 CpG сайтов, локализованных в промоторной области гена гистаминового рецептора 1 типа *HRH1* (GRCh38:3: 11137169-11137301) у больных БА и здоровых индивидов из РБ. При MS-HRM обнаружен высокий уровень метилирования данного региона гена *HRH1* в группах больных БА и контроля, варьирующий от 90 до 100% в различных CpG сайтах (Рисунок 1). При попарном сравнении групп установлено, что полное метилирование промоторной области гена *HRH1* (100%) у детей с БА наблюдается чаще (60,67%), чем в контроле (47,86%, p=0,03; OR=1,68; 95%CI 1,05-2,68). Обнаружено, что у пациентов с тяжелым и среднетяжелым течением БА полное метилирование промоторной области гена *HRH1* (100%) также встречалось чаще (61,54%), чем в группе контроля (47,86%, p=0,05; OR=1,74; 95%CI 1,0-3,06). Данные MS-HRM, свидетельствующие о высокой степени метилирования исследованных CpG сайтов гена *HRH1,* подтверждены при секвенировании бисульфит-конвертированной ДНК больного БА и контрольного стандарта ДНК со 100% уровнем метилирования (Рисунок 2).

По литературным данным, экспрессия гена *HRH1* (3p25.3) обнаружена в различных тканях, включая респираторный эпителий и иммунные клетки, активация H1-рецепторов приводит к усилению Th1- и Th2-ответов, вазодилатации и бронхоконстрикции [Micallef and Sasse, 2016; Kordulewska et al., 2019; Sobkowiak et al., 2020]. Антагонисты гистаминовых рецепторов 1 типа используются для симптоматического лечения большинства аллергических состояний [Micallef and Sasse, 2016]. При EWAS группы больных БА различного происхождения с использованием образцов ДНК, выделенных из первичных эпителиальных клеток дыхательных путей, установлена более низкая степень метилирования cg09666573, cg11702866, cg26864526, cg1766083, cg05551003 гена *HRH1* в когорте пациентов с БА по сравнению с контролем [Nicodemus-Johnson et al., 2016]. Обнаружена более высокая степень метилирования cg17571559 и cg09492975 гена *HRH1* у больных БА различного происхождения по сравнению с контролем при EWAS, проведенном с использованием образцов ДНК, выделенных из эпителиальных клеток слизистой носа [Cardenas et al., 2019].

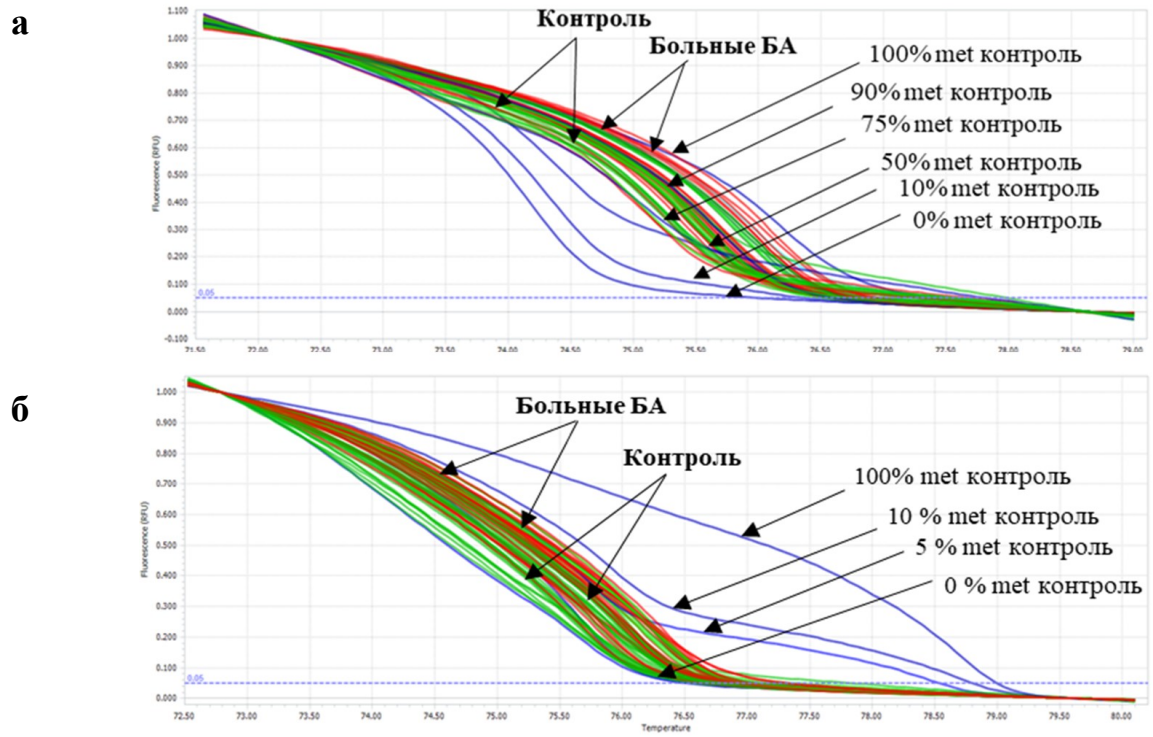

Рисунок 1. MS-HRM анализ промоторных регионов генов *HRH1* (а) и *HRH2* (б) у больных БА и контроля. Синий цвет - кривые плавления контрольных стандартов по метилированию (%, met); красный цвет – кривые плавления детей с БА; зеленый цвет – кривые плавления индивидов из контрольной группы.
Figure 1: MS-HRM analysis of the promoter regions of the *HRH1* (a) and *HRH2* (b) genes in asthma patients and controls. Blue - melting curves of control standards (%, met); red - melting curves of asthma children; green - melting curves of individuals from the control group.

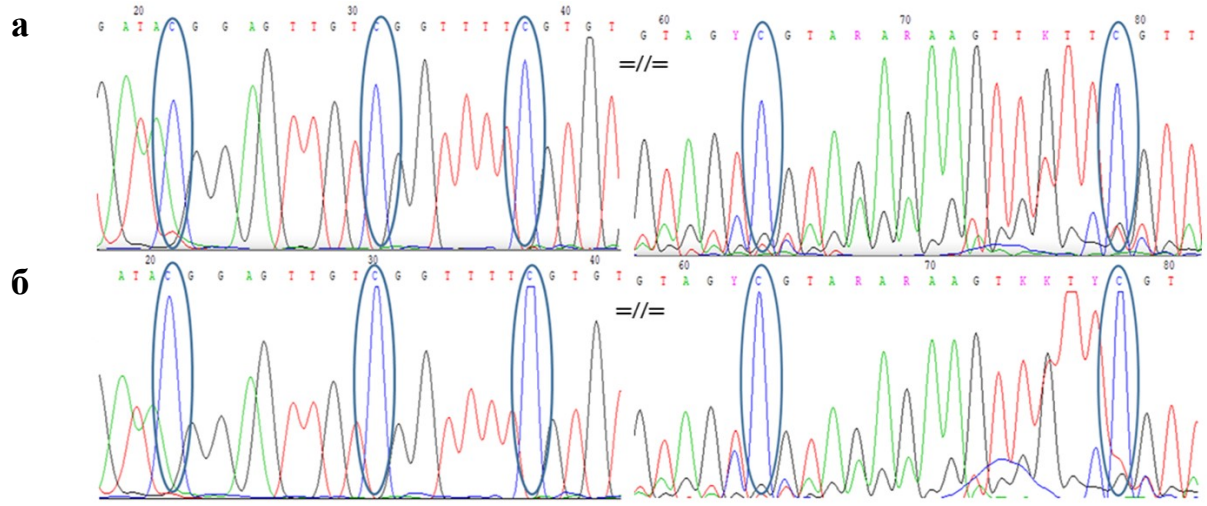

Рисунок 2. Результаты секвенирования промоторного региона гена *HRH1* у больного БА (а) и контроля 100% метилированной ДНК (б).
Figure 2: The results of sequencing of the *HRH1* gene promoter region in asthma patients (a) and controls with 100% methylated DNA (b).

Выполнен анализ уровня метилирования 10 CpG сайтов, локализованных в промоторной области гена *HRH2* (GRCh38:5:175658642-175658809). При MS-HRM выявлен низкий уровень метилирования исследуемой области у детей с БА и индивидов из группы контроля (0-10%). Установлено, что у 5 больных (3,38%) промоторная область гена *HRH2* не метилирована (0%), у 138 больных БА (93,24%) уровень метилирования составляет 5%, у 5 больных с тяжелым и среднетяжелым течением БА (3,38%) - 10%. При анализе выборки контроля показано, что уровень метилирования гена *HRH2* у 144 здоровых индивидов (94,12%) составляет 5%, у 9 здоровых индивидов (5,88%) исследуемая область гена *HRH2* была не метилирована (0%). При сравнении частоты встречаемости различных уровней метилирования CpG сайтов гена *HRH2* в выборках детей с БА и контроля достоверных различий не выявлено. Низкий уровень метилирования CpG сайтов промоторной области гена *HRH2* подтвержден при бисульфитном секвенировании ДНК больных БА и индивидов контрольной группы (Рисунок 3).

Белок, кодируемый геном *HRH2* (5q35.2), преимущественно экспрессируется в гладкомышечных клетках сосудов, Т-супрессорах, нейтрофилах, центральной нервной системе. Гистаминовые рецепторы 2 типа подавляют воспаление путем ингибирования активации нейтрофилов и хемотаксиса эозинофилов, снижения экспрессии IL-12 и увеличения экспрессии IL-10, активации развития Th2-клеток [Micallef and Sasse, 2016]. При EWAS в когортах больных БА и индивидов контрольной группы различного происхождения с использованием первичных эпителиальных клеток дыхательных путей и EWAS детей из Пуэрто-Рико с атопией и группы контроля выявлен более низкий уровень метилирования cg22839180 гена *HRH2* у пациентов по сравнению с контролем [Nicodemus-Johnson et al., 2016; Forno et al., 2019].

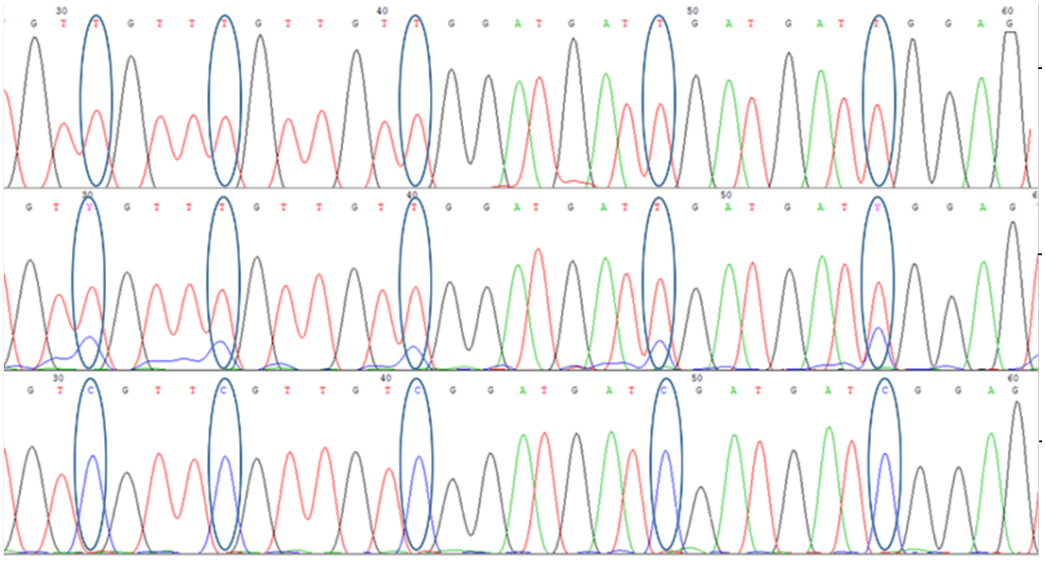

Рисунок 3. Результаты секвенирования промоторного региона гена *HRH2*: а) больной с уровнем метилирования 0%; б) больной с уровнем метилирования 10% по данным MS-HRM-анализа; в) контрольный стандарт со 100% уровнем метилирования.

Figure 3: The results of sequencing of the *HRH2* gene promoter region: a) patient with 0% methylation level; b) patient with 10% methylation level according to MS-HRM analysis; c) control standard with 100% methylation level.

Заключение

Таким образом, в данной работе впервые выполнен анализ метилирования промоторных регионов генов гистаминовых рецепторов *HRH1* и *HRH2* у детей с БА и индивидов контрольной группы из РБ. Полученные результаты свидетельствуют о наличии различий уровня метилирования промоторного региона гена *HRH1* между группами больных БА и контроля, что подтверждает роль метилирования ДНК в формировании данного заболевания.

Благодарности

Авторы исследования выражают благодарность д.м.н., профессору зав. кафедрой детских болезней БГМУ Эткиной Эсфирь Исааковне и

д.м.н., профессору кафедры госпитальной педиатрии БГМУ Гатиятуллину Радику Фидагиевичу за помощь в организации работы и сборе материала. Работа выполнена в рамках государственного задания Министерства науки и высшего образования РФ (№ 122041400169-2 и № 075-03-2021-193/5), при частичной поддержке Мегагранта Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-595), гранта РФФИ (проект № 19-315-90055). Образцы ДНК представлены из Коллекции биологических материалов человека ИБГ УФИЦ РАН, поддержанной Программой биоресурсных коллекций ФАНО России (соглашение № 007-030164/2) с использованием оборудования РЦКП «Агидель».

Авторы сообщают об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Савельева О.Н., Карунас А.С., Федорова Ю.Ю., Хуснутдинова Э.К. Фармакогенетика бронхиальной астмы. *Медицинская генетика.* 2019. № 4. С. 3-23. doi:10.25557/2073-7998.2019.04.
2. Cardenas A., Sordillo J. E., Rifas-Shiman S. L. et al. The nasal methylome as a biomarker of asthma and airway inflammation in children. *Nat Commun.* 2019. V. 10. P. 3095. doi:10.1038/s41467-019-11058-3
3. Gautam Y., Johansson E., Mersha T.B. Multi-Omics Profiling Approach to Asthma: An Evolving Paradigm. *J Pers Med.* 2022; 12(1): 66. doi: 10.3390/jpm12010066
4. Forno E.,Zhang R., Jiang Y. et al. Transcriptome-wide and differential expression network analyses of childhood asthma in nasal epithelium. *J Allergy Clin Immunol*. 2020. V. 146 (3). P. 671-675. doi: 10.1016/j.jaci.2020.02.005
5. Kordulewska N., Cieslinska A., Fiedorowicz E. et al. Effect of the fexofenadine on the expression of HRH-1 and HRH-4 receptor in peripheral blood mononuclear cell isolated from children with diagnosed allergy - in vitro study short communication. *Pharm. Pharm. Sci.* 2019. V. 22 (1). P. 93-97. doi: 10.18433/jpps29971
6. Micallef S., Sasse A. Genetic polymorphisms in the histamine receptor family. Histamine Receptors. In: Blandina P., Passani M. B. Histamine Receptors - Preclinical and Clinical Aspects. Switzerland: Humana Press, Springer Nature. 2016. P. 51-74. doi 10.1007/978-3-319-40308-3_2
7. Nicodemus-Johnson J., Myers R. A., Sakabe N. J. et al. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. *JCI Insight.* 2016. V. 1. P. e90151.doi: 10.1172/jci.insight.90151
8. Sobkowiak P., Langwiński W., Nowakowska J. et al. Neuroinflammatory Gene Expression Pattern Is Similar between Allergic Rhinitis and Atopic Dermatitis but Distinct from Atopic Asthma. *BioMed Research International*. 2020. V. 2020. P. 1-10. doi: 10.1155/2020/7196981
9. Wasti B., Liu S., Xiang X-D. Role of Epigenetics in the Pathogenesis, Treatment, Prediction, and Cellular Transformation of Asthma. *Mediators Inflamm.* 2021. 9412929. doi: 10.1155/2021/9412929

References

1. Cardenas A., Sordillo J. E., Rifas-Shiman S. L. et al. The nasal methylome as a biomarker of asthma and airway inflammation in children. *Nat Commun.* 2019. V. 10. P. 3095. doi:10.1038/s41467-019-11058-3
2. Gautam Y., Johansson E., Mersha T.B. Multi-Omics Profiling Approach to Asthma: An Evolving Paradigm. *J Pers Med.* 2022; 12(1): 66. doi: 10.3390/jpm12010066
3. Forno E.,Zhang R., Jiang Y. et al. Transcriptome-wide and differential expression network analyses of childhood asthma in nasal epithelium. *J Allergy Clin Immunol*. 2020. V. 146 (3). P. 671-675. doi: 10.1016/j.jaci.2020.02.005
4. Kordulewska N., Cieslinska A., Fiedorowicz E. et al. Effect of the fexofenadine on the expression of HRH-1 and HRH-4 receptor in peripheral blood mononuclear cell isolated from children with diagnosed allergy - in vitro study short communication. *Pharm. Pharm. Sci.* 2019. V. 22 (1). P. 93-97. doi: 10.18433/jpps29971
5. Micallef S., Sasse A. Genetic polymorphisms in the histamine receptor family. Histamine Receptors. In: Blandina P., Passani M. B. Histamine Receptors - Preclinical and Clinical Aspects. Switzerland: Humana Press, Springer Nature. 2016. P. 51-74. doi 10.1007/978-3-319-40308-3_2
6. Nicodemus-Johnson J., Myers R. A., Sakabe N. J. et al. DNA methylation in lung cells is associated with asthma endotypes and genetic risk. *JCI Insight.* 2016. V. 1. P. e90151.doi: 10.1172/jci.insight.90151
7. Savelieva O.N., Karunas A.S., Fedorova Yu.Yu., Khusnutdinova E.K. Pharmacogenetics of asthma. *Medical Genetics.* 2019;18(4):3-23. doi: 10.25557/2073-7998.2019.04 (In Russ.)
8. Sobkowiak P., Langwiński W., Nowakowska J. et al. Neuroinflammatory Gene Expression Pattern Is Similar between Allergic Rhinitis and Atopic Dermatitis but Distinct from Atopic Asthma. *BioMed Research International*. 2020. V. 2020. P. 1-10. doi: 10.1155/2020/7196981
9. Wasti B., Liu S., Xiang X-D. Role of Epigenetics in the Pathogenesis, Treatment, Prediction, and Cellular Transformation of Asthma. *Mediators Inflamm.* 2021. 9412929. doi: 10.1155/2021/9412929