

2.02.05 - Genética / Genética Humana e Médica.

ASSOCIAÇÃO DE POLIMORFISMOS DOS GENES *HDAC4*, *GSE1* E *PHF21A* COM O PÊNFIGO FOLIÁCEO: DESREGULAÇÃO DE MECANISMOS EPIGENÉTICOS ENVOLVIDOS NA DESACETILAÇÃO DE HISTONAS NA RESPOSTA AUTOIMUNE.

Maiara S. Denardin^{1*}, Valéria Bumiller-Bini², Danillo G. Augusto³, Maria L. Petzl-Erler^{3,4}, Angelica B. W. Boldt^{3,5}

1. Estudante do Curso de Medicina, Universidade Federal do Paraná (UFPR)

2. Doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Genética (PPG-GEN), UFPR

3. Professor permanente do PPG-GEN, UFPR

4. Professora do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, UFPR

5. Professora do Departamento de Genética, Setor de Ciências Biológicas, UFPR/Orientadora

Resumo

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune cutânea bolhosa. Para investigar se há associação entre PF e polimorfismos de genes relacionados com a (des)acetilação de histonas, foram extraídos dados de 2.486 polimorfismos de nucleotídeo único de 145 genes de microarranjos de genotipagem de 227 pacientes com PF e 194 controles. Restaram 785 polimorfismos após a exclusão das variantes raras ($f < 0,01$), em desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg em controles ($p < 0,05$), e em forte desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo genotipado ($r^2 > 0,8$). Três alelos foram associados com o PF ($p < 0,005$): *HDAC4_rs4852054*A*, associado à susceptibilidade aumentada (OR = 1,79 [IC 95% 1,21 - 2,67], $p = 0,004$); *GSE1_rs13339618*A* e *PHF21A_rs4756055*A* associados à susceptibilidade diminuída (OR = 0,5 [IC 95% 0,41 - 0,80], $p = 0,001$ e OR = 0,39 [IC 95% 0,23 - 0,67], $p = 0,0006$). Essas variantes possivelmente têm efeitos sobre a expressão gênica, que podem explicar a suscetibilidade diferencial ao PF.

Autorização legal: CEP/CONEP, protocolo CAAE02727412.4.0000.0096.

Palavras-chave: Epigenética; Desacetilases de histonas; Complexos de desacetilação de histonas.

Apoio financeiro: CAPES; CNPq; FA.

Introdução

O pênfigo foliáceo (PF) é uma doença autoimune cutânea bolhosa. A forma endêmica brasileira do PF é conhecida como fogo selvagem. A fisiopatologia do PF se distingue pela produção de autoanticorpos do tipo IgG contra desmogleína 1, uma proteína transmembranosa de adesão celular encontrada em junções celulares (desmossomos) de queratinócitos [1]. A formação de bolhas ocorre devido à separação dos queratinócitos, principalmente na camada granular da epiderme, processo conhecido como acantólise [2]. Apesar de a etiologia do PF ainda não ser totalmente esclarecida, apresenta-se associada a fatores ambientais, genéticos e epigenéticos [3 - 5].

Um dos focos da epigenética é o estudo da estrutura da cromatina e sua influência nos padrões de expressão gênica, os quais podem ser alterados por mecanismos epigenéticos, incluindo marcas de metilação no DNA [6]. Mesmo apresentando elevado potencial terapêutico, a desregulação de mecanismos epigenéticos que regem modificações pós-traducionais (como a metilação e a acetilação) de histonas em doenças autoimunes ainda é pouco compreendida. As modificações pós-traducionais de histonas são estabelecidas e removidas por enzimas que integram complexos multiproteicos: a metilação de histonas é estabelecida por metiltransferases de histonas (HMTs, do inglês *histone methyltransferases*) e removida por demetilases de histonas (HDMTs, *histone demethylases*); e a acetilação de histonas é estabelecida por acetiltransferases de histonas (HATs, *histone acetyltransferases*) e removidas por desacetilases de histonas (HDACs *histone deacetylases*) [6].

Recentemente, identificamos associações entre polimorfismos genéticos de HMTs e HDMTs com o PF [5]. Alterações no padrão de acetilação de histonas, bem como no de expressão de desacetilases de histonas foram relacionadas a outras doenças autoimunes cutâneas, como o lupus eritematoso [7, 8], a alopecia areata [9] e o pênfigo vulgar [10]. Esse trabalho tem como objetivo investigar a associação entre polimorfismos genéticos de HAT, HDACs e de proteínas que interagem com essas enzimas, formando complexos de acetilação e desacetilação de histonas com o PF.

Metodologia

Esse estudo foi realizado de acordo com a Declaração de Helsinki e todos os participantes estavam cientes dos objetivos do estudo. Amostras de DNA de 227 pacientes com PF e 194 controles, provenientes, em sua maioria, de regiões endêmicas para o PF, foram coletadas no: Hospital Adventista do Pênfigo (Campo Grande, Mato Grosso do Sul); Lar da Caridade – Hospital do Fogo Selvagem (Uberaba, Minas Gerais); Hospital de Clínicas – Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto, São Paulo); Hospital de Clínicas – Universidade Federal do Paraná, Hospital de Dermatologia Sanitária São Roque e Hospital Santa Casa de Misericórdia (Curitiba, Paraná). Pacientes com PF e controles não eram consanguíneos, eram majoritariamente de ancestralidade europeia e apresentavam similaridade na proporção da variável sexo – nos dois grupos, 52%

eram mulheres – e na distribuição da variável idade – a idade média dos pacientes era de 40,9 anos (mínimo 6 anos, máximo 83 anos) e a dos controles, 44,8 anos (mínimo 11 anos, máximo 86 anos). Nenhum dos pacientes possuía histórico de outra doença autoimune. Nenhum dos controles apresentava doença autoimune.

As amostras de DNA dos pacientes com PF e controles foram genotipadas por hibridação em microarranjo (Illumina v.1.1). Foram avaliados os resultados de 2.486 polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, *single nucleotide polymorphisms*) presentes na região gênica, considerando 1.000 pares de base a 5' e a 3' do transcrito mais longo, de 145 genes codificando HATs (12), HDACs (18) e membros de complexos de acetilação (60) e de desacetilação (55) de histonas. Após exclusão de variantes raras ($f < 0,01$), em desvio das proporções esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg em controles ($p < 0,05$), e em desequilíbrio de ligação com outro polimorfismo genotipado ($r^2 > 0,8$), as possíveis associações entre PF e 785 polimorfismos foram analisadas por regressão logística, corrigindo possíveis associações espúrias decorrentes da estratificação populacional através de dois componentes de análise principal.. O valor de significância estabelecido foi de $p < 0,005$ [11].

Anotações funcionais de bancos de dados públicos foram usadas para explorar potenciais efeitos dos SNPs associadas ao PF. USCS [12] e Ensembl [13] genome browser foram usados para avaliar anotações funcionais de genes e de SNPs; HaploReg v.4.1 [14] data base, para avaliar anotações epigenéticas de SNPs; e GTEx v.8 [15], Blood eQTL [16], GRASP2 Catalog [17], The Cardiogenic Project [18] e para avaliar loci associados a traços quantitativos de expressão e de processamento (e/sQTLs, *expression/splicing quantitative trait loci*).

Resultados e Discussão

Três variantes foram associadas com a susceptibilidade diferencial ao PF ($p < 0,005$). A presença do alelo *rs4852054**A, no íntron 1 do gene *HDAC4* (*histone deacetylase 4*), foi associado à maior susceptibilidade ao PF (OR = 1,79 [IC 95% 1,21 - 2,67], $p = 0,004$), enquanto a do alelo *rs13339618**A, na região regulatória a 5' do gene *GSE1* (*Gse1 coiled-coil protein*), e a do genótipo *rs4756055* A/A, no íntron 1 do gene *PHF21A* (*PHD finger protein 21A*), foram associados com menor susceptibilidade ao PF (OR = 0,5 [IC 95% 0,41 - 0,80], $p = 0,001$ e OR = 0,39 [IC 95% 0,23 - 0,67], $p = 0,0006$, respectivamente).

Variantes genéticas associadas a características multifatoriais são frequentemente enriquecidas em anotações epigenéticas [19]. Em células do sistema imune e da pele, os alelos *HDAC4_rs4852054**A e *PHF21A_rs4756055**A se encontram em regiões enriquecidas com modificações pós-traducionais de histonas associadas a regiões acentuadoras, promotoras e/ou de cromatina descompactada [14]. Em células da pele, o alelo *GSE1_rs13339618**A se encontra em uma região enriquecida com modificações pós-traducionais de histonas associadas a regiões acentuadoras e/ou promotoras [14]. Isso sugere que essas variantes influenciam a regulação da expressão gênica.

Além disso, o alelo *HDAC4_rs4852054**A está associado com o aumento da expressão do gene *HDAC-AS1* (*HDAC4 antisense RNA 1*) em células do sangue ($p = 1,5 \times 10^{-4}$) e com a recomposição alternativa do pré-mRNA de *HDAC4* no músculo esquelético ($p = 9,6 \times 10^{-16}$) [15]. *GSE1_rs13339618**A está associado com o aumento da expressão de *GSE1* no sangue ($p = 7,9 \times 10^{-8}$) [16]. *PHF21A_rs4756055**A está associado com a expressão alterada de *PHF21A* ($p = 2,8 \times 10^{-4}$) [17], aumento da expressão de *CRY2* (*cryptochrome circadian regulator 2*) ($p = 2,7 \times 10^{-4}$) e diminuição da expressão de *PEX16* (*peroxisomal biogenesis factor 16*) em células do sangue ($p = 1,0 \times 10^{-3}$) [16]. Também está associado ao aumento da expressão de *HNRNPH1* (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1*) em macrófagos ($p = 5,8 \times 10^{-6}$) [18].

As proteínas HDAC4, GSE1 e PHF21A interagem com proteínas reguladoras, promovendo a desacetilação de histonas e conseqüentemente, a compactação da cromatina [20-22], reprimindo a expressão de genes relacionados à resposta imune. HDAC4 interage com MEF2 (*myocyte enhancer factor 2*), reprimindo a expressão de *NR4A1* (*nuclear receptor subfamily 4 group A member 1*) [23]; e com MEF2 e p65, reprimindo a expressão de *KLF2* (*Kruppel-like factor 2*) [24]. Interessantemente, HDAC4 interage com a proteína KLF2 [25]. HDAC4 também interage com BCL6 (*BCL6 transcription repressor*), reprimindo a expressão de genes alvo [26]; com GATA3 (*GATA binding protein 3*) e YY1 (*Yin and Yang 1*), reprimindo a expressão de *IL-5* (*interleukin-5*) [27]; e com RFXANK (*regulatory factor X associated Ankyrin repeated protein*) e CIITA (*class II major histocompatibility complex transactivator*), reprimindo a expressão de genes *MHC II* (*major histocompatibility complex class II*) [28]. Consonantemente, além de CIITA apresentar atividade acetiltransferase intrínseca [29], o alelo *CIITA_rs3087456**G foi associada a um efeito dominante no aumento da susceptibilidade ao PF [30], evidenciando a importância da dinâmica entre acetilação e desacetilação de histonas no PF. As proteínas GSE1 e PHF21A são membros do complexo de desacetilação de histonas BRAF35 [21, 22]. Diversas proteínas desse complexo, incluindo a proteína PHF21A, também são constituintes do complexo de desacetilação CoREST [31]. O complexo de desacetilação CoREST, por meio de interações com FOXP3 (*forkhead box P3*), reprime a expressão de *IL-2* (*interleukin 2*) e *IFN- γ* (*interferon- γ*) em células T reguladoras [32]. Caso os alelos associados ao PF promovam alterações de expressão gênica que interfiram nas interações proteicas descritas, a maior ou menor susceptibilidade ao PF conferida aos portadores desses alelos poderia ser explicada.

Conclusões

Este é o primeiro estudo que identificou a associação alélica de genes relacionados com a desacetilação de histonas com a susceptibilidade diferencial ao PF, indicando que o padrão de acetilação de histonas possivelmente apresenta um papel regulador na fisiopatologia do PF. Os resultados sugerem um papel relevante desses polimorfismos na desregulação dos mecanismos epigenéticos que regem a

desacetilação de histonas na resposta autoimune no PF, apontando para os genes *HDAC4*, *GSE1* e *PHF21A* como possíveis novos candidatos a futuros estudos funcionais.

Referências bibliográficas

- [1] KASPERKIEWICZ, M.; ELLEBRECHT, C. T.; TAKAHASHI, H.; et al. Pemphigus. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 11, n. 3, p. 1-18, 17026, 2017.
- [2] SCHMIDT, E.; KASPERKIEWICZ, M.; JOLY, P. Pemphigus. **The Lancet**, v. 394, n. 10201, p. 882-894, 2019.
- [3] QIAN, Y.; JEONG, J. S.; MALDONADO, M.; et al. Cutting Edge: Brazilian Pemphigus Foliaceus Anti-Desmoglein 1 Autoantibodies Cross-React with Sand Fly Salivary LJM11 Antigen. **The Journal of Immunology**, v. 189, n. 4, p. 1535–1539, 2012.
- [4] PETZL-ERLER, M. L. Beyond the HLA polymorphism: A complex pattern of genetic susceptibility to pemphigus. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 3, p. 1-26, e20190369, 2020.
- [5] SPADONI, M. B.; BUMILLER-BINI, V.; PETZL-ERLER, M. L.; et al. First Glimpse of Epigenetic Effects on Pemphigus Foliaceus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 140, n. 2, p. 488- 491.e1, 2020.
- [6] ALLIS, C.D.; CAPARROS, M.L.; JENUWEIN, T.; et al. Overview and concepts, in: ALLIS, C.D.; CAPARROS, M.L.; JENUWEIN, T.; et al. (Ed.). **Epigenetics**. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2015. p. 117-142.
- [7] HU, N.; QIU, X.; LUO, Y.; et al. Abnormal histone modification patterns in lupus CD4+ T cells. **The Journal of Rheumatology**, v. 35, n. 5, p. 804-810, 2008.
- [8] ZHANG, Z.; SONG, L.; MAURER, K.; PETRI, M. A.; SULLIVAN, K. E. Global H4 acetylation analysis by ChIP-chip in systemic lupus erythematosus monocytes. **Genes and Immunity**, v. 11, n. 2, p. 124–133, 2010.
- [9] ZHAO, M.; LIANG, G.; WU, X.; et al. Abnormal epigenetic modifications in peripheral blood mononuclear cells from patients with alopecia areata. **British Journal of Dermatology**, v. 166, n. 2, p. 266–273, 2012.
- [10] ZHAO, M.; HUANG, W.; ZHANG, Q.; et al. Aberrant epigenetic modifications in peripheral blood mononuclear cells from patients with pemphigus vulgaris. **British Journal of Dermatology**, v. 167, n. 3, p. 523–531, 2012.
- [11] BENJAMIN, D. J.; BERGER, J. O.; JOHANNESSON, M.; et al. Redefine statistical significance. **Nature Human Behaviour**, v. 2, n. 1, p. 6-10, 2018.
- [12] KENT, W. J.; SUGNET, C. W.; FUREY, T. S.; et al. The Human Genome Browser at UCSC. **Genome Research**, v. 12, n. 6, p. 996–1006, 2002.
- [13] YATES, A. D.; ACHUTHAN, P.; AKANNI, W.; et al. Ensembl 2020. **Nucleic Acids Research**, v. 48, n. D1, p. D682–D688, 2020.
- [14] WARD, L. D.; KELLIS, M. HaploReg: A resource for exploring chromatin states, conservation, and regulatory motif alterations within sets of genetically linked variants. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n. D1, p. D930-D934, 2012.
- [15] LONSDALE, J.; THOMAS, J.; SALVATORE, M.; et al. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. **Nature Genetics**, v. 45, n. 5, p. 580-585, 2013.
- [16] WESTRA, H. J.; PETERS, M. J.; ESKO, T.; et al. Systematic identification of trans eQTLs as putative drivers of known disease associations. **Nature Genetics**, v. 45, n. 10, p. 1238–1243, 2013.
- [17] FEHRMANN, R. S. N.; JANSEN, R. C.; VELDINK, J. H.; et al. Trans-eqtls reveal that independent genetic variants associated with a complex phenotype converge on intermediate genes, with a major role for the hla. **PLoS Genetics**, v. 7, n. 8, p. 1-14, e1002197, 2011.
- [18] CODONI, V.; BLUM, Y.; CIVELEK, M.; et al. Preservation analysis of macrophage gene coexpression between human and mouse identifies PARK2 as a genetically controlled master regulator of oxidative phosphorylation in humans. **G3: Genes, Genomes, Genetics**, v. 6, n. 10, p. 3361–3371, 2016.
- [19] ROADMAP EPIGENOMICS CONSORTIUM; KUNDAJE, A.; MEULEMAN, W.; et al. Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. **Nature**, v. 518, n. 7539, p. 317–329, 2015.
- [20] WANG, A. H.; BERTOS, N. R.; VEZMAR, M.; et al. HDAC4, a Human Histone Deacetylase Related to Yeast HDA1, Is a Transcriptional Corepressor. **Molecular and Cellular Biology**, v. 19, n. 11, p. 7816-7827, 1999.
- [21] HAKIMI, M. A.; DONG, Y.; LANE, W. S.; SPEICHER, D. W.; SHIEKHATTAR, R. A candidate X-linked mental retardation gene is a component of a new family of histone deacetylase-containing complexes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, n. 9, p. 7234–7239, 2003.

- [22] HAKIMI, M.-A.; BOCHAR, D. A.; CHENOWETH, J.; et al. A core-BRAF35 complex containing histone deacetylase mediates repression of neuronal-specific genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 11, p. 7420-7425, 2002.
- [23] YOUN, H. D.; GROZINGER, C. M.; LIU, J. O. Calcium regulates transcriptional repression of myocyte enhancer factor 2 by histone deacetylase 4. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 29, p. 22563–22567, 2000.
- [24] KUMAR, A.; LIN, Z.; SENBANERJEE, S.; JAIN, M. K. Tumor Necrosis Factor Alpha-Mediated Reduction of KLF2 Is Due to Inhibition of MEF2 by NF- κ B and Histone Deacetylases. **Molecular and Cellular Biology**, v. 25, n. 14, p. 5893–5903, 2005.
- [25] DAS, M.; LAHA, D.; KANJI, S.; et al. Induction of Krüppel-like factor 2 reduces K/BxN serum-induced arthritis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 23, n. 2, p. 1386–1395, 2019.
- [26] LEMERCIER, C.; BROCARD, M. P.; PUVION-DUTILLEUL, F.; et al. Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 277, n. 24, p. 22045–22052, 2002.
- [27] HAN, S.; LU, J.; ZHANG, Y.; et al. Recruitment of histone deacetylase 4 by transcription factors represses interleukin-5 transcription. **Biochemical Journal**, v. 400, n. 3, p. 439–448, 2006.
- [28] MCKINSEY, T. A.; KUWAHARA, K.; BEZPROZVANNAYA, S.; OLSON, E. N. Class II histone deacetylases confer signal responsiveness to the ankyrin-repeat proteins ANKRA2 and RFXANK. **Molecular Biology of the Cell**, v. 17, n. 1, p. 438–447, 2006.
- [29] RAVAL, A.; HOWCROFT, T. K.; WEISSMAN, J. D.; et al. Transcriptional coactivator, CIITA, is an acetyltransferase that bypasses a promoter requirement for TAF(II)250. **Molecular Cell**, v.7, n.1, p.105-115, 2001.
- [30] PIOVEZAN, B. Z.; PETZL-ERLER, M. L.; Both qualitative and quantitative genetic variation of MHC class II molecules may influence susceptibility to autoimmune diseases: the case of endemic pemphigus foliaceus. **Human Immunology**, v. 74, n. 9, p. 1134-1140, 2013.
- [31] MEIER, K.; BREHM, A. Chromatin regulation: How complex does it get? **Epigenetics**, v. 9, n. 11, p. 1485–1495, 2014.
- [32] XIONG, Y.; WANG, L.; GIORGIO, E. DI; et al. Inhibiting the coregulator CoREST impairs Foxp3⁺ Treg function and promotes antitumor immunity. **Journal of Clinical Investigation**, v. 130, n. 4, p. 1830–1842, 2020.