



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

### III. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29  
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

#### OSASUN ZIENTZIAK

**Eritasun zeliakoarekin  
asoziatutako rs6822844  
polimorfismoaren ikerketa  
funtzionala heste-zeluletan**

*Maialen Sebastian-delaCruz, Ane  
Olazagoitia-Garmendia, Irati  
Romero-Garmendia, Iñaki Irastorza,  
Ainara Castellanos-Rubio eta Jose  
Ramon Bilbao*

57-62 or.  
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.07>



## Eritasun zeliakoarekin asoziatutako rs6822844 polimorfismoaren ikerketa funtzionala heste-zeluletan

Sebastian-delaCruz, Maialen<sup>1</sup>; Olazagoitia-Garmendia, Ane<sup>1</sup>; Romero-Garmendia, Irati<sup>1</sup>;  
Irastorza, Iñaki<sup>2</sup>; Castellanos-Rubio, Ainara<sup>1,3\*</sup>; Bilbao, Jose Ramon<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, BioCruces-Bizkaia Osasun  
Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria

<sup>2</sup>Haur Gastroenterologia, Gurutzetako Unibertsitate Ospitalea, BioCruces-Bizkaia Osasun  
Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria

<sup>3</sup>IKERBASQUE, Zientziarako Euskal Fundazioa, Bilbo, Euskal Herria  
maialensebastian@gmail.com

### Laburpena

Eritasun zeliakoa (EZ), predisposizio genetikoak baldintzatutako pertsonetan glutenaren aurkako erantzun desorekatuak eragiten duen gaixotasun immunitarioa da. HLA eremutik kanpo, rs6822844 polimorfismoak aurkeztu zuen EZ garatzeko arriskurako asoziazio maila altuena lehen genoma osoko asoziazio ikerketan (ingelesez GWAS). Polimorfismoa *IL2* eta *IL21* geneen artean dago, eta horregatik horiek izan ziren eremu horretan proposatutako gene erantzuleak. Lan honen helburua, eremu hori aztertzea da. Horretarako, heste-zelula eta monozitoen proliferazioa eta *IL2* eta *IL21* geneen adierazpena aztertzeaz gain, *FGF2* gene erantzule berriaren adierazpena ere ikertu da. Lortutako emaitzek, eremu hau EZren garapenean garrantzitsua dela baieztatzen dute, gaixotasunaren zenbait ezaugarri desagertzen baita eremuan aldaketak eragitean.

Hitz gakoak: Eritasun zeliakoa, rs6822844, *IL2*, *IL21*, *FGF2*

### Abstract

*Celiac disease (CeD) is an immune disorder derived from the dysregulated reaction to gluten in genetically susceptible individuals. The polymorphism rs6822844 showed the strongest association with risk to CeD in the first GWAS outside the HLA region. It is located between the IL2 and IL21 genes, so they were considered candidate genes in that region. The aim of this work is to analyze this region in intestinal cells and monocytes, through proliferation and expression studies of IL2 and IL21 genes, and a new candidate gene proposed in this work, FGF2. The results obtained confirm that this region is important for the development of CeD, as certain characteristics of the disease disappear, when the region is altered.*

*Keywords: Celiac disease, rs6822844, IL2, IL21, FGF2*

### 1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (EZ) predisposizio genetikoaren duten pertsonengan gertatzen den glutenaren aurkako erantzun desorekatuaren ondorioz garatzen den gaixotasun immunitario kronikoa da. Beraz, faktore genetikoek zein ingurumenekoek, batez ere glutenak, parte hartzen dute gaixotasunean. Ezaguna den arrisku genetiko nagusia HLA-DQ2 edota HLA-DQ8 aldaerek ekartzen dute, sistema immunitarioko zelulei gluten aurkezteko duten ahalmenagatik. Dena den, aldaera horiek ez dira nahiko eritasun zeliakoa garatzeko; izan ere, ohikoak dira populazioan, eta adibidez, pertsona ez-zeliakoen %30 inguruak HLA-DQ2 eramaten du (Megiorni eta Pizzuti, 2012).

Azken urteotan, beste arrisku faktoreak ezagutu nahian, genoma osoko (GWAS) eta ImmunoChip plataformako asoziazio azterketak burutu dira (van Heel et al., 2007; Dubois et al., 2010; Trynka et al., 2011; Garcia-Etxebarria et al., 2016) eta eritasun zeliakoarekin asoziatuta dauden HLA lokusetik kanpoko eremu berriak aurkitu dira. Eremuok ematen duten arriskua erantzun immunitarioan parte hartzen duten bertako geneei egotzi zaie, baina oraindik ez da ezaguna asoziatutako eremu gehien funtzioa.

HLA eremuaz aparte, rs6822844 polimorfismoak EZ garatzeko arrisku altuena aurkeztu zuen eritasun zeliakoan burutu zen lehen GWASean. SNP (ingelesezko *Single Nucleotide Polymorphism* inisialatik) hau *IL2* eta *IL21* geneen artean dago, laugarren kromosoman. Bi gene horiek IL-2 eta IL-21 zitokinak kodetzen dituzte, hurrenez hurren, eta biek funtzio immunitarioan parte hartzen dutela kontuan hartuta, gene erantzuletzat proposatu ziren (van Heel et al., 2007).

## 2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Eritasun zeliakoa gaixotasun genetiko konplexua da, non faktore genetiko ugariak parte hartzen duten. Azken urteetan, Genetika eta Biologia Molekularreko tekniken hobekuntzari esker, asko aurreratu da faktore genetiko horien ezagutzan, eta gaur egun, EZren erantzule izan daitezkeen eremu genetiko berriak proposatu dira. Dena dela, eremu horietako askoren funtzioa ez da ikertu, eta hauen inplikazioa EZan ez dago frogatuta.

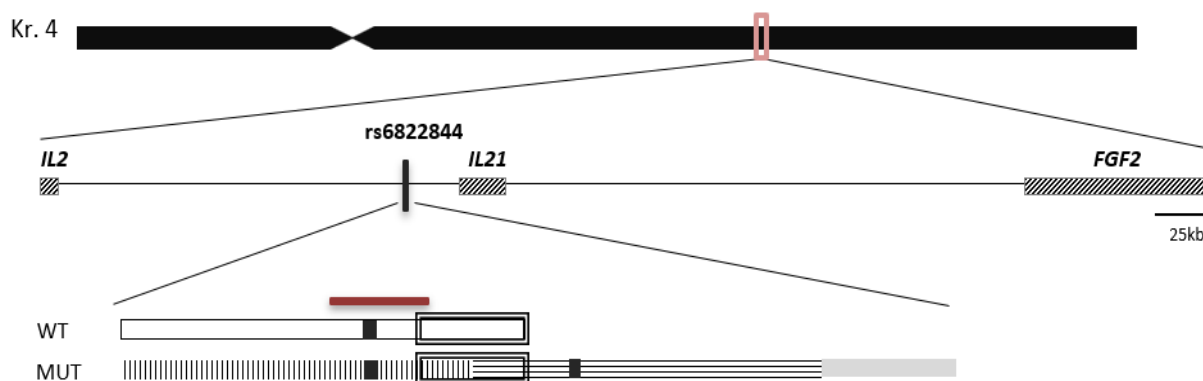
Hori kontuan izanik, rs6822844 polimorfismoaren eremuaren funtzioa aztertu nahi izan dugu. Horretarako hiru azpi helburu planteatu ditugu:

- 1) Polimorfismoaren efektua aztertzea heste-zelula epitelialetan, lehen GWASean proposatutako *IL2* eta *IL21* gene erantzuleen adierazpena neurtuta.
- 2) Gene bi horietaz aparte gene erantzule gehiago bilatzea, SNParen eremuarekin elkarrekintzak aztertuz eta haien efektuak ebaluatuz.
- 3) SNParen eremu genomikoa editatuta duten heste-zelulek baldintzatutako medioan hazteak sistema immunitarioko zeluletan duen eragina aztertzea.

## 3. Ikerketaren muina

rs6822844 polimorfismoaren eta bere eremu genomikoaren azterketa egiteko, HCT116 heste-zelula epitelialen genoma editatu da CRISPR-Cas9 teknikaren bidez. Edizioak eragindako mutazioak SNPa bikoiztea eragin du editatutako zeluletan (1. Irudia).

**1. irudia. HCT116 zeluletan editatutako rs6822844 polimorfismoaren inguruko eremu genomikoaren irudi eskematikoa.** Sekuentzia mutatu (MUT) hiru zatiz osatuta dago: batetik, zelula basatien (WT) sekuentziaren berdina den zatia (lerro bertikalak); bestetik, WT sekuentziaren alderantzizko bikoizketa (lerro horizontalak); eta azkenik, WT sekuentziaren antzik ez duen zatia (grisez). Ertz bikoitza duen laukiak sekuentzia palindromikoa irudikatzen du eta laukitxo beltzek rs6822844 polimorfismoa. Marra gorria CRISPR-Cas9 teknikan erabilitako RNA-gida da.



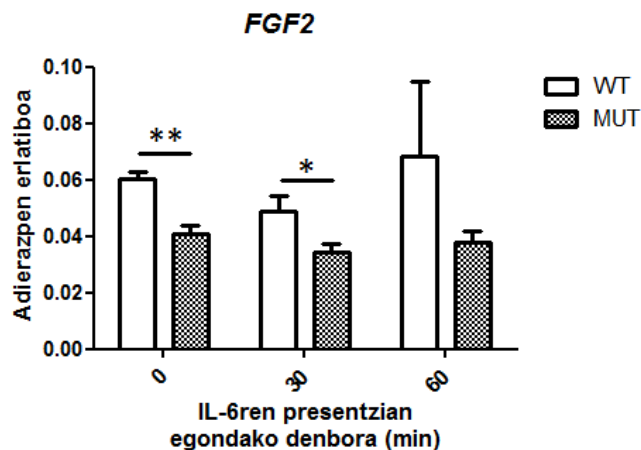
### 3.1. Adierazpen eta proliferazio azterketak HCT116 heste-zeluletan

Lehen GWASean *IL2* eta *IL21* proposatu ziren gene erantzule gisa. Hori dela eta, CRISPR-Cas9 bidezko edizioak gene horien adierazpenean izan zezakeen eragina aztertu da HCT116 heste-zeluletan.

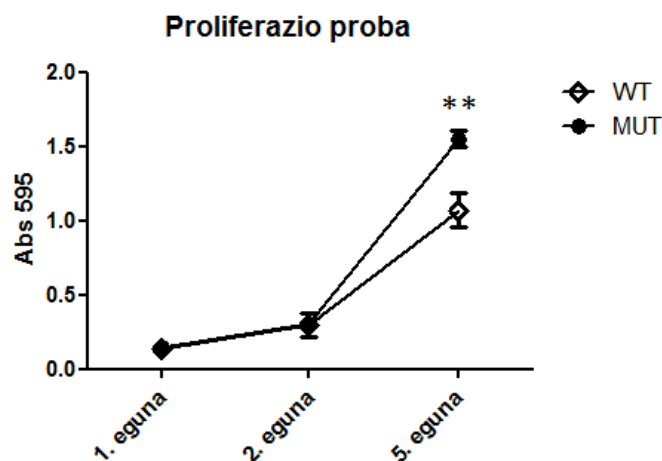
Gene horiek erantzun immunitarioan parte hartzen dutela jakinik, eta egoera normalean adierazten ez direla behatu eta gero, zelulak IL-6 zitokina proinflamatorioarekin kitzikatu dira, adierazpena emendatu asmoz. Emaitzek erakutsi dutenez, *IL2* eta *IL21* geneak ez dira HCT116 heste-zeluletan adierazten, ez egoera normalean ezta IL-6 zitokina proinflamatorioaren presentzian ere.

Proposatutako geneak adierazten ez direla ikusirik, gene erantzule posible berriak bilatu dira. Horretarako SNParen eremuarekin elkarrekintzak dituzten geneak bilatu dira HiC bilatzailearen *online virtual 4C* lanabesa erabiliz (Lieberman-Aiden et al., 2009). Lanabes honek, DNAREN hiru dimentsioko egitura kontuan hartzen du geneen edota genomaren eremu desberdinen arteko elkarrekintzak iradokitzeko. Kasu honetan, *FGF2*, *SPATA5* eta *KIA1109* geneek hiru dimentsioko elkarrekintza aurkezten dute SNParen eremuarekin. Horien artean lehenak erantzun immunitarioarekin erlazioa du, fibroblastoen hazkuntza sustatzen baitu. *FGF2*ren adierazpena aztertu da eta zelula editatuetan azpiadierazita dagoela behatu da (2. Irudia). Gainera, adierazpena berdina mantentzen da IL-6ren presentzian ere. *FGF2* geneak FGF-2 hazkuntza faktorea kodetzen du, eta horrek zelulen hazkuntza eta proliferazioa sustatzen duenez, heste-zelulen proliferazio analisia burutu da. Zelula editatuek (MUT) proliferazio abiadura handiagoa dute (3. Irudia).

**2. irudia. *FGF2* genearen adierazpen erlatiboa *HPRT* etxezaintza-genearekiko (ingelesez *housekeeping genea*).** Emaitzak egoera normalean (0), eta IL-6 zitokina proinflamatorioarekin kitzikatu eta 30 eta 60 minutura. WT: editatu gabeko HCT116 zelulak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulak.



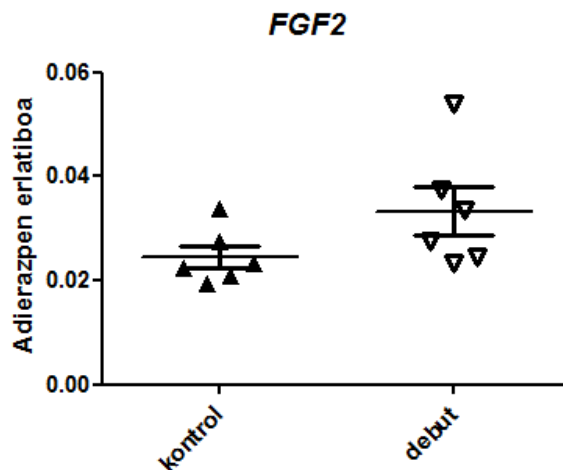
**3. irudia. HCT116 zelulen proliferazio azterketa.** 200.000 zeluletik abiatuta eta bat, bi eta bost egunetara egin dira neurketak. WT: editatu gabeko HCT116 zelulak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulak.



### 3.2. Adierazpen azterketak biopsietan

*FGF2* genearen adierazpen aldaketak ikusita, pertsona zeliakoengan ere aldaketarik dagoen aztertu da. Horretarako sei paziente zeliako (debut) eta beste sei pertsona ez-zeliakoren (kontrol) duodenoko biopsietatik erauzitako RNA erabili da, eta *FGF2*ren adierazpena zeliakoetan emendatuta dagoela behatu da (4. Irudia).

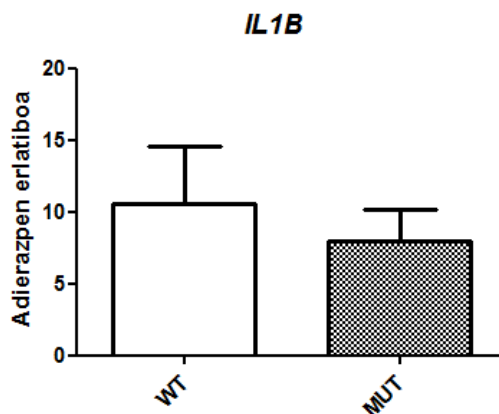
#### 4. irudia. *FGF2*ren adierazpena biopsietan, *RPLPO* etxezaintza-genearekiko.



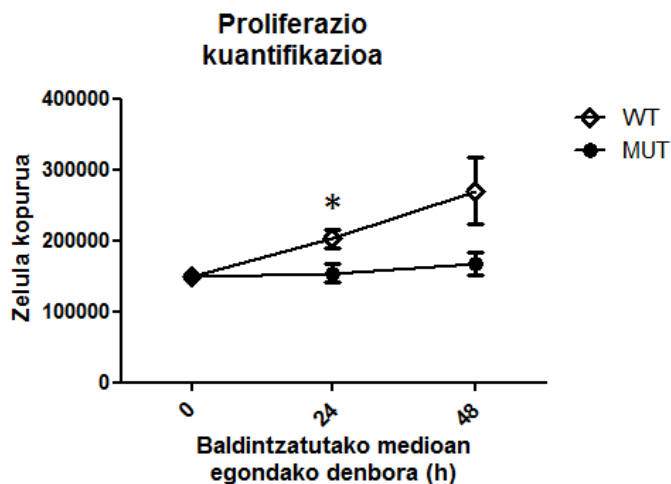
### 3.3. Aktibazio eta proliferazio azterketak U937 zelula immunitarioetan

HCT116 zeluletan sortutako mutazioak inguruko zelula immunitarioan izan dezakeen efektua aztertzeko U937 zelula monozitikoak heste-zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazi dira, eta haien aktibazio eta proliferazioa aztertu dira. Baldintzatutako medioa, medio freskoarekin nahastu da 1:1 proportzian, elikagai faltarik ez izateko. Aktibazioa *IL1B* genearen adierazpenaren bitartez neurtu da, interleukina horren adierazpena emendatu egiten baita monozitoak aktibatzean (Petes C et al, 2017). *IL1B* zertxobait azpiadierazita dago zelula editatuek (MUT) baldintzatutako medioan hazitako monozitoetan (5. Irudia). Proliferazioari dagokionez, zelula editatuek (MUT) baldintzatutako medioan hazitako monozitoek, hazkunde abiadura baxuagoa aurkeztu dute (6. Irudia).

**5. irudia. *IL1B*ren adierazpen erlatiboa *RPLPO* etxezaintza-genearekiko. *IL1B* aktibazioaren adierazle modura erabili da. WT: editatu gabeko HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak.**



**6. irudia. U937 zelulen proliferazio azterketa.** 0 puntua medio baldintzatua gehitu aurreko puntua da, 150.000 zeluletatik abiatuta. Beste bi puntuak, baldintzatutako medioan 24 eta 48h eta gero egindako neurketak dira. WT: editatu gabeko HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak, MUT: eremu genomikoa CRISPR-Cas9 bidez editatuta duten HCT116 zelulek baldintzatutako kultura-medioan hazitako monozitoak.



Emaitzen arabera, editatu gabeko zelulek baldintzatutako medioan haztean, monozitoak aktibatu eta azkarrago proliferatzen dira. Dirudienez, sortutako mutazioak U937 zelula monozitikoaren aktibazio eta proliferazioan ondorioak dituen aldaketaren bat ekarri du, rs6822844 SNParen eremuaren edizioak, inguruko zeluletan ere eragina duela erakutsiz.

#### 4. Ondorioak

Laburbilduta, EZren arriskuarekin asoziatutako rs6822844 polimorfismoaren eremua editatzeak heste-zeluletan eta inguruko zelula immunitarioetan eragina duela behatu da lan honetan.

Batetik, HCT116 zeluletan, proposatutako gene erantzuleen adierazpen aldaketarik ikusi ez dugun arren, *FGF2* gene erantzule berria proposatu dugu, eta gene hori azpiadierazita dago rs6822844 SNParen eremu genomikoa editatuta duten zeluletan. Aldiz, *FGF2* gainadierazita dago paziente zeliakoetan.

Bestetik, editatutako zelulek baldintzatutako kultura-medioan inkubatutako monozitoek aktibazio eta proliferazio apalagoa izateak, eremu genomikoaren edizioak hantura egoeran eragina izan dezakeela iradoki du. Izan ere, hantura egoeretan monozito eta makrofagoak aktibatuta egon ohi dira eta proliferazio maila altuagoa dute (Abella V et al., 2017).

Beraz, eremu genomiko horrek EZren garapenean parte hartu dezakeen zantzuak ikusi ditugu, hori eraldatzean gaixotasunaren hainbat berezko ezaugarri desagerrarazten direlarik.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan HCT116 zeluletan burutu da rs6822844 polimorfismoaren eremuaren edizioa. Baina hasieran proposatutako *IL2* eta *IL21* geneak zelula mota horretan adierazten ez direla kontuan hartuta, etorkizunean SNParen eremua gene horiek adierazten diren sistema immunitarioko zeluletan editatzeko asmoa dugu, T linfuzitoetatik eratorritako Jurkat zelulak kasu.

Horrez gain, SNParen ondoan DNAsarekiko hipersentikorra (DH) den eremu bat dago, eta eremu horiek erregulazio puntuak izan daitezkeela ezaguna da (Degner JF et al., 2012). Beraz, polimorfismoak DH eremu horretan eragina duen ikertu nahi dugu.

## 6. Erreferentziak

- Abella V, Scotece M, Conde J, Pino J, Gonzalez-Gay MA, Gomez-Reino JJ, Mera A, Lago F, Gomez R eta Gualillo O. (2017), Leptin in the interplay of inflammation, metabolism and immune system disorders. *Nat Rev Rheumatol*, 13(2), 100-109.
- Degner JF, Pai AA, Pique-Regi R, Veyrieras JB, Gaffney DJ, Pickrell JK, De Leon S, Michelini K, Lewlén N, Stephens M, Gilad Y eta Pritchard JK. (2012), DNase I sensitivity QTLs are a major determinant of human expression variation. *Nature*, 482(7385), 390-394.
- Lieberman-Aiden E, Van Berkum NL, Williams L, Imakaev M, Ragoczy T, Telling A, Amit I, Lajoie BR, Sabo PJ, Dorschner MO, Sandstrom R, Bernstein B, Bender MA, Groudine M, Gnirke A, Stamatoyannopoulos J, Mirny LA, Lander ES eta Dekker J. (2009), Comprehensive mapping of long-range interactions reveals folding principles of the human genome, *Science*, 326(5950), 289-293.
- Megiorni F eta Pizzuti A. (2012), HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: practical implications of the HLA molecular typing, *J. Biomed Sci*, 19, 88-92.
- Petes C, Wynick C, Guzzo C, Mehta D, Logan S, Banfield BW, Basta S, Cooper A eta Gee, K. (2017), IL- 27 enhances LPS- induced IL- 1 $\beta$  in human monocytes and murine macrophages, *J Leukoc Biol*, 102(1), 83-94.
- Trynka G, Hunt KA, Bockett NA, Romanos J, Mistry V, Szperl A, Bakker SF, Bardella MT, Bhaw-Rosun L, Castillejo G, de la Concha, E. G, Coutinho de Almeida R, Dias KRM, van Diemen CC, Dubois PCA, Duerr RH, Edkins S, Franke L, Fransen K, Gutierrez J, Heap GAR, Hrdlickova B, Hunt S, Plaza-Izturieta L, Izzo V, Joosten LAB, Langford C, Mazzilli MC, Mein CA, Midah V, Mitrovic M, Mora B, Morelli M, Nutland S, Núñez C, Onengut-Gumuscu S, Pearce K, Platteel M, Polanco I, Potter S, Ribes-Koninckx C, Ricaño-Ponce I, Rich SS, Rybak A, Santiago JL, Senapati S, Sood A, Szajewska H, Troncone R, Varadé J, Wallace C, Wolters VM, Zhernakova A, CEGEC (Spanish Consortium on the Genetic of Coeliac Disease), Prevent CD Study Group, Wellcome Trust Case Control Consortium, Thelma BK, Cukrowska B, Urcelay E, Bilbao JR, Mearin ML, Barisani D, Barrett JC, Plagnol V, Deloukas P, Wijmenha C eta van Heel DA. (2011), Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease, *Nat. Genet.*, 43, 1193-201.
- van Heel DA, Franke L, Hunt KA, Gwilliam R, Zhernakova A, Inouye M, Wapenaar MC, Bernardo MCNM Bethel G, Holmes GKT, Feighery C, Jewell D, Kelleher D, Kumar P, Travis S, Walters JRF, Sanders DS, Howdle P, Swift J Playford RJ, McLaren WM, Mearin ML, Mulder CJ, McManus R, McGinnis R, Cardon LR, Deloukas P eta Wijmenga C. (2007): A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21, *Nat. Genet*, 39, 827-9.
- Visscher PM, Brown MA, McCarthy MI eta Yang J. (2012), Five years of GWAS discovery. *Am J Hum Genet*, 90(1), 7-24.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Hemen aurkeztutakoak Ikerketa Immunologian masterreko amaierako lanaren emaitzak dira. Eskerrak eman nahi dizkiet Ainara Castellanos eta Jose Ramon Bilbaori, lana laborategian egitea onartzeagatik.

Ikerketa hau ACM-2017 ikerketa proiektuaren bidez finantzatu da.