



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

**1 motako diabetesari asoziatutako
lncRNAen azterketa funtzionala
 β -zelulen hanturan eta apoptosian**

*Itziar Gonzalez-Moro,
Ane Olazagoitia-Garmendia,
Nora Fernandez-Jimenez,
Ainara Castellanos-Rubio eta
Izortze Santin*

84-91 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.11>



1 motako diabetesari asoziatutako lncRNAen azterketa funtzionala β -zelulen hanturan eta apoptosian

Gonzalez-Moro, Itziar¹; Olazagoitia-Garmendia, Ane²; Fernandez-Jimenez Nora³;
Castellanos-Rubio, Ainara^{2*} eta Santin, Izortze^{1*}

¹*Biokimika eta Biologia Molekularra saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa; Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketako Institutua, Barakaldo; CIBERDEM*

²*Genetika, Antropologia eta Animalia Fisiologia saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa; Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketako Institutua, Barakaldo*

³*Pediatría Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa; Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketako Institutua, Barakaldo*

**Egile hauen parte-hartzea berdina izan da.*

igonzalez207@ikasle.ehu.eus

Laburpena

1 motako diabetesarekin (DM1) asoziatutako polimorfismo ugari RNA luze ez kodetzaileetan (lncRNA) kokatuta daude. Lan honen helburua DM1-rekin asoziatutako lnc13 eta lncBACH2 deritzen lncRNAen karakterizazio funtzionala gauzatea izan da. Gure emaitzek lnc13-k β -zelulen hantura prozesuan parte hartzen duela baieztatzen dute. Izan ere, lnc13-ak STAT1 eta PCBP2 molekulen arteko elkarrekintza baimentzen du, hantura sustatzen duen STAT1 mRNAren egonkortasuna emendatzen duelarik. Bestalde, lncBACH2-k BACH2 genearen adierazpena erregulatzen duela eta aldi berean hanturak eragindako β -zelulen apoptosian eragina duela ikusi dugu. Gure lanak gaixotasunarekin lotura duten lncRNAk β -zelulen funtzionamenduan eragina dutela erakusten du, eta hortaz, lncRNAk DM1ren patogenesisian berebiziko garrantzia eduki dezaketela iradokitzen du.

Hitz gakoak: 1 motako diabetesa, lncRNA, β -zelula, hantura.

Abstract

Several polymorphisms associated with type 1 diabetes (T1D) are located in long non-coding RNAs (lncRNAs). The aim of the present work is to characterize the functional impact of two lncRNAs; lnc13 and lncBACH2. lnc13 is implicated in β -cell inflammation process. Indeed, lnc13 allows the interaction between STAT1 and PCBP2 molecules, inducing the stability of the pro-inflammatory STAT1 mRNA. On the other hand, lncBACH2 controls BACH2 gene expression which is directly related to β -cell apoptosis. Our work shows that T1D-associated lncRNAs are implicated in pancreatic β -cell function, and thus, they may play a crucial role in the pathogenesis of the disease.

Key words: type 1 diabetes, lncRNA, β -cell, inflammation.

1. Sarrera eta motibazioa

1 motako diabetes mellitusa (DM1) gaixotasun autoimmune konplexua da. Honetan, zelula immuneak pankreako irlatan murgildu egiten dira (intsulitis deritzon prozesua) eta pankreako β -zelulen suntsipena ematen da (Eizirik et al., 2009). β -zelulak intsulina ekoizteaz arduratzen diren zelulak izanda, zelula hauen desagerpenak intsulinarekin gabezia ekartzen du gaixoetan, odoleko glukosa-mailak gora egiten duelarik. Odoleko glukosa-maila kontrolatzeko gaixoei bizitza osoan zehar intsulina-tratamendua jaso behar dute. DM1 pairatzen duten gaixoen prebalentzia urtez urte emendatuz doa eta 2005-2020 urte bitartean gaixo berrien kopurua Europan bikoiztuko dela aurreikusten da (EURODIAB ACE Study Group, 2000). Emendatze larri horrek eta oraindik inolako tratamendurik ez egoteak, 1 motako diabetesa XXI. mendeko osasun erronka nagusietariko bat bilakatu du.

Eragile genetikoek zein ingurune faktoreek gaixotasunaren garapenean parte hartzen dute. Genetikari dagokionez, gene kodetzaile ugari asoziatu egin dira gaixotasun honekin, hala nola giza antigenu leukozitarioaren (HLA) eskualdea edota intsulinarekin (INS) genea. Halere, jakina da gaur egun gaixotasun autoimmunekin loturik dauden nukleotido bakarreko polimorfismoen

(SNP) %10 inguru RNA luze ez-kodetzailletan (lncRNA) kokatzen direla. lncRNAk proteina kodetzen ez dituzten 200 nukleotido baino gehiagoz osaturiko RNA molekulak dira. Beraien funtzioaren inguruan informazio gutxi dagoen arren, badirudi geneen transkripzioa erregulatzen dutela mekanismo ezberdinen bitartez (geneen promotoreetara lotuz, transkripzio-faktoreen translokazioa eraginez, etabar). Honek aditzera ematen digu lncRNAtan aurkitzen diren aldaera genetikoek euren funtzioa alda dezaketela, gene eta bidezidor desberdinen adierazpena azalduz. Gure interesa lnc13 eta lncBACH2 deritzen bi lncRNAtan jarri dugu.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lan honen helburu nagusia 1 motako diabetesarekin lotura duten lncRNAen karakterizazio funtzionala egitea da, pankreako β -zeluletan duten funtzioa deskribatuz eta gaixotasunaren patogenesisian eduki dezaketen eragina aztertuz. Helburu hau gauzatzeko EndoC- β H1 deritzon pankreako giza β -zelulen lerroa erabili da, gaur egun diabetesaren ikerketarako dagoen *in vitro* eredurik egokiena delako.

3. Ikerketaren muina

1 Motako diabetesarekin asoziatutako lncRNAen identifikazioa

Gaixotasunarekin lotura duten lncRNAk identifikatzeko, DM1-rekin asoziatutako dauden polimorfismoen lokalizazio genomikoaren eta gaur egunera arte publikoki anotatu diren lncRNAen koordinatu genomikoen arteko gainjarpena gauzatu genuen software bioinformatikoez baliaturik. Lehenik eta behin, DM1-rekin lotutako polimorfismoen zerrenda deskargatu genuen Europako Bioinformatika Institutuak (EBI) duen datu base batetik (https://www.ebi.ac.uk/gwas/efotraits/EFO_0001359), bertan gaixotasunarekin asoziatuta dauden 288 SNP identifikatu genituelarik. Bestalde, *Noncode* datu basetik (http://www.noncode.org/datadownload/NONCODEv5_human.fa.gz) gaur egunera arte anotatu diren giza lncRNA guztien zerrenda atera genuen. Zerrenda biak izanda, gure helburua lncRNAtan kokatuta zeuden DM1-rekin asoziatutako SNPak identifikatzea izanik, RStudio software informatikoa erabili genuen SNPen kokapen genomikoa eta lncRNAen kokapen genomikoa gainjartzeko. Horrela, 69 gainjarpen identifikatu genituen, hau da, DM1-rekin asoziatutako 69 SNP lncRNAtan kokatuak zeudela ikusi genuen.

Ikerketa funtzionala egiteko lncRNAen lehenespena

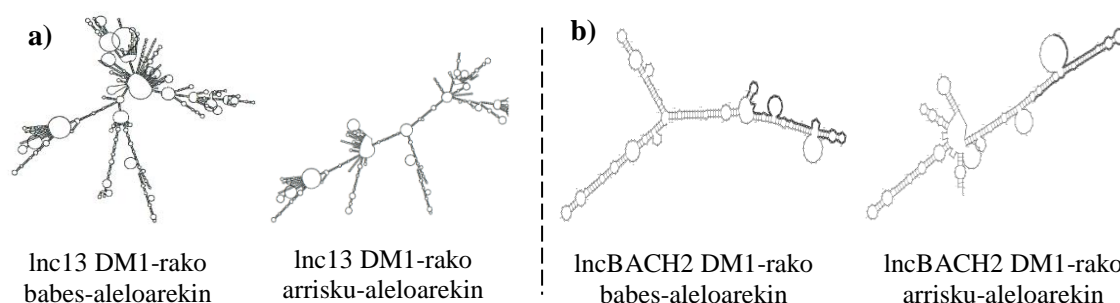
Kontuan izanda DM1-rekin asoziatutako 69 SNP lncRNAtan kokatuak zeudela, ikerketa funtzionala egiteko zenbait lncRNAen aukeraketa egitea erabaki genuen. Horretarako SNP guztien azterketa sistematikoa egin genuen eta honako irizpidea jarraituta sailkatu genituen:

1) SNPen kokapena lncRNAen baitan: exonikoak eta intronikoak banandu genituen. Hau gauzatzeko NONCODE eta Ensembl datu baseetan dagoen informazioa erabili genuen. Horrela, 19 SNP exonikoak eta 50 SNP intronikoak zirela ikusi genuen. Gure kasuan, lehenetsi ditugu exoietan kokatuta dauden SNPak, lncRNAen bigarren mailako egituran izan dezaketen eraginagatik. Bigarren mailako egiturak berebiziko garrantzitsua du lncRNAen funtziorako. Izan ere, itu molekulekiko interakzioa baimenduko baitu.

2) SNPek lncRNAen bigarren mailako egituran duten eragina: *Center for non-coding RNA in Technology and Health* zentruak eskaintzen duen *RNAsnp Web Server*-aren bidez (<https://rth.dk/resources/rnasnp/>), aurreko pausuan aukeratutako 19 SNP exonikoek lncRNAen bigarren mailako egituran eduki dezaketen eragina *in silico* analizatu genuen. Gure hipotesiaren arabera, lncRNAen bigarren mailako egituraren eragina duten SNPek lncRNA beraren funtzioan eragin dezakete. Aztertutako 19 SNPen artean, 9k ez zuten lncRNA iturean bigarren mailako egituran aldaketarik eragiten. Gainerako 10 SNPek berriz, bigarren mailako aldaketak eragiten zituzten lncRNA ituetan. 1.irudian ikus daitekeen bezala, lnc13 eta lncBACH2 geneetan dauden DM1-rekin asoziatutako SNPen alelo ezberdinek (babes-aleloa (maizago agertzen da DM1 ez duten pertsonetan) eta arrisku-aleloa (maizago agertzen da DM1 duten pertsonetan)) eragina dute lncRNA horiek hartzen duten bigarren mailako egituran.

3) lncRNAen funtzioaren araberako lehenespena: Aurreko pausuan lehenestutako lncRNAen inguruko bibliografia aztertuz, pankreako β -zelulen funtzioarekin edota diabetesaren patogenesiarekin erlazio potentziala zuten lncRNAk aukeratu genituen. Bilaketa sistematiko baten ostean PUBMED datu base bibliografikoan, bi lncRNA aukeratu genituen; lnc13 eta lncBACH2 (1. irudia). Alde batetik, lnc13 aukeratu genuen autoimmunea den eritasun zeliakoarekin asoziatuta dagoelako eta zelula immuneetan diabetearen patogenesisian parte hartzen duten zenbait hanturazko geneen adierazpena kontrolatzen duelako (Castellanos-Rubio et al., 2016). Bestalde, lncBACH2 aukeratu genuen, bere kokapen genomikoa *BACH2* izeneko gene kodetzaile baten sekuentziarekin gainjartzen delako. Aurretiaz *BACH2* geneak β -zelulen apoptosia erregulatzen duela ikusi da eta ondorioz, lncBACH2 azterketa funtzionalentzako hautagai interesgarria izan zitekeela iruditu zitzaigun (Marroquí et al., 2014).

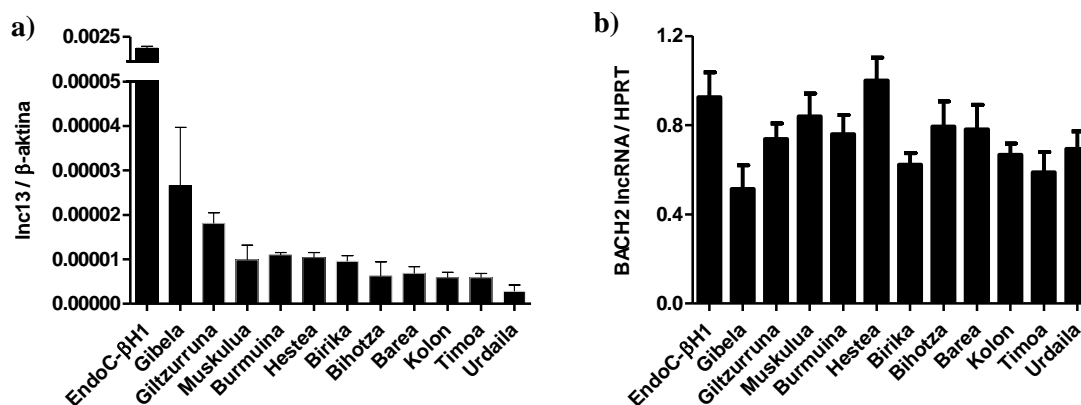
1. irudia. lnc13 eta lncBACH2 lncRNAen egitura sekundarioak. a) lnc13-ren bigarren mailako egitura rs917997 polimorfismoan DM1-rako babes- edo arrisku-aleloa duenean. b) lncBACH2-ren bigarren mailako egitura, rs3757247 polimorfismoan DM1-rako babes- edo arrisku-aleloa duenean.



lncBACH2 eta lnc13 lncRNAen adierazpen-profila

Azterketa funtzionalekin hasi aurretik, aukeratutako bi lncRNAk pankreako β -zeluletan adierazten ziren aztertu genuen eta bertako adierazpen-maila beste ehunekin konparatu genuen. Adierazpena neurtzeko lncRNAen RNA mailak neurtu genituen Taqman entsegua (lnc13) edo hasle espezifikoa (lncBACH2) erabilia Q-PCR teknikaren bitartez. Lortutako adierazpen-balioak, edozein baldintzatan eta ehunetan RNA-maila egonkorra duen gene baten (β -aktina edo HPRT geneak) adierazpen-mailagatik normalizatu genituen, laginean dagoen RNA totalaren kantitatearen arabera zuzentzeko. 2. irudian ikus daitekeen bezala, lnc13 eta lncBACH2, EndoC- β H1 giza β -zeluletan adierazten ziren. Pankreako β -zeluletan lnc13-ren adierazpen-maila absolutua beste ehunetan baino altuagoa zen bitartean (2a. irudia), lncBACH2-ren adierazpena konparagarria zen ehun guztietan, pankreako β -zeluletan barne (2b. irudia). Aipatzekoa da lncBACH2-ren adierazpen-maila absolutua aztertutako ehun guztietan, nabarmen altuagoa zela lnc13 adierazpen-mailarekin alderaturik.

2. irudia. lnc13 eta lncBACH2 lncRNAen adierazpena ehun desberdinetan. a) lnc13-ren adierazpena giza ehun ezberdinetan. b) lncBACH2-ren adierazpena giza ehun ezberdinetan



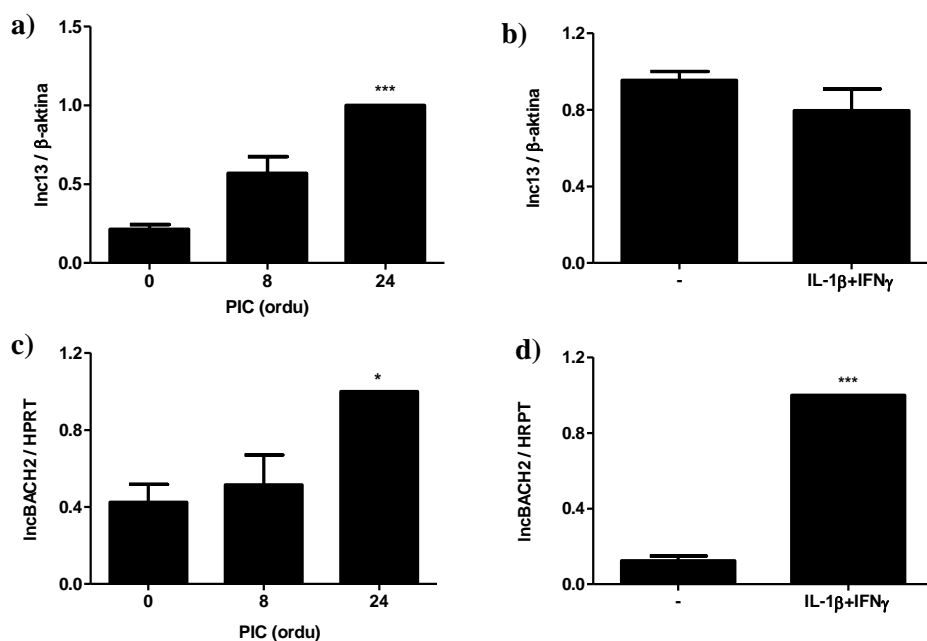
Behin gure intereseko lncRNAk pankreako giza β -zeluletan adierazten zirela ikusita, hurrengo pausua, haien adierazpenean estimulu diabetogeniko ezberdinen eragina aztertzea izan zen.

Zenbait ikerketen arabera, birusek eragindako infekzioek eta hauen ondorioz sistema immuneko zelulek ekoizten dituzten zitokinek eragin zuzena dute diabetesaren patogenesisian, batez ere hasierako etapetan (Eizirik et al., 2009). Horrela izanda, birusek eta zitokinek bi lncRNAen adierazpenean eragina zuten azertu genuen, horretarako infekzioa birikoa simulatzen duen harizpi bikoitzeko RNA biriko sintetikoa (PIC deritzona) edo interleukina-1 β (IL-1 β) eta interferon- γ (IFN γ) zitokinen nahasketa tratamendu gisa erabili genuelarik.

3. irudian ikus daitekeen bezala, PIC tratamenduak 24 orduz izandako zelulek lnc13 (3a. irudia) zein lncBACH2-ren (3b. irudia) adierazpena emendatua zuten. Pankreako β -zelulak IL-1 β + IFN γ nahasketarekin 48 orduz tratatzen zirenean berriz, lnc13-ren adierazpenean ez zen aldaketarik ikusten (3c. irudia), baina lncBACH2-ren adierazpena 8 aldiz emendatzen zen tratatu gabeko zelulekin (-) konparatuta (3d. irudia). Estimulu diabetogeniko hauen efektua oso zabala izan daitekeen arren, lncRNA hauen adierazpenean duten eragina haien adierazpena kontrolatzen dituzten transkripzio-faktoreen aktibazioan eragiten dutelako izan daiteke. Etorkizunean egingo ditugun esperimenduetan, lncRNA hauen adierazpena kontrolatzen dituzten faktoreen identifikazioa eta karakterizazioa egingo dugu.

3. irudia. lnc13 eta lncBACH2 lncRNAen adierazpena PIC eta IL-1 β +IFN γ tratamenduen ostean.

a) lnc13-ren adierazpena 8 edo 24 orduz PIC tratamenduarekin egon ostean. b) lnc13-ren adierazpena 48 orduz zitokina tratamenduarekin egon ostean. c) lncBACH2-ren adierazpena 8 edo 24 orduz PIC tratamenduarekin egon ostean. d) lncBACH2-ren adierazpena 48 orduz zitokina tratamenduarekin egon ostean (*p < 0.05 eta ***p < 0.001).



Aukeratutako lncRNAen azterketa funtzionala

Aukeratutako lncRNA bakoitzaren funtzioa karakterizatzeko eta potentzialki diabetesaren patogenesisian eragina eduki dezaketen bidezidorretan duten eragina aztertzeko, pankreako β -zeluletan intereseko lncRNAen inhibizioa ala gainadierazpena oinarritzat dituen zenbait esperimendu martxan jarri genituen. Kontuan izanda diabetesaren patogenesisiaren ezaugarriak, bi bidezidor-talde izan genituen aztergai, alde batetik hanturarekin erlazionaturikoak (lnc13-arekin lotua) eta bestaldetik, apoptosiarekin (lncBACH2-arekin lotura duena) erlazionaturikoak.

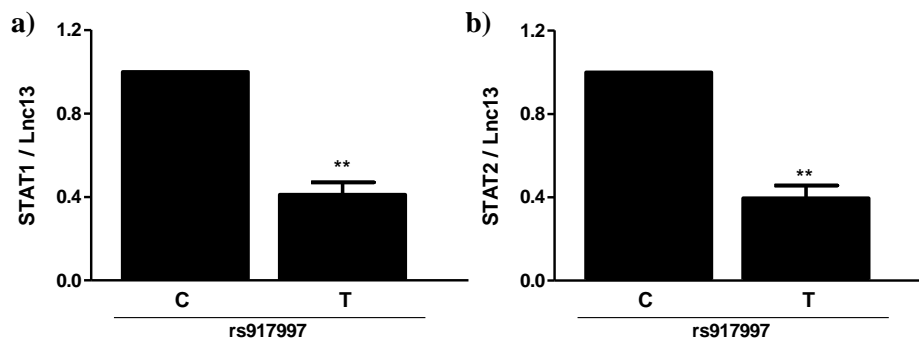
lnc13 eta birusek eragindako β -zelulen hantura

Aurretiaz aipatu dugun bezala, harizpi bikoitzeko RNA biriko sintetikoak (PIC) lnc13-ren adierazpena emendatzen du pankreako β -zeluletan. Zenbait ikerketen arabera, enterobirusek pankreako β -zelulak infektatzen dituztenean, β -zeluletan hanturarekin erlazionatutako bidezidorrak aktibatzen dira, intsulitisa (sistema immuneko zelulen infiltrazioa) eraginez (Rodriguez-Calvo, 2018; Dunne et al., 2019 eta Richardson eta Morgan 2018).

Gure taldeak lnc13-aren inguruan egindako azterketek aditzera eman dute lnc13-k STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen adierazpenean eragina duela, hauek pankreako β -zelulen hanturan berebiziko garrantzia duten transkripzio-faktoreak direlarik. Ikertzen ari garen gaixotasunarekin asoziatutako rs917997 polimorfismoaren eragina kontuan hartzeko, DM1-erako arrisku aleloa (rs917997*C) duen lnc13-a edo babeserako aleloa (rs917997*T) duen lnc13-a pankreako β -zeluletan gainadierazi eta gero, STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen adierazpena neurtu genuen.

4. irudian ikus daitekeen bezala, DM1-erako arrisku aleloa zeraman lnc13-a gainadierazten genuenean (rs917997*C), STAT1 (4a. irudia) eta STAT2 (4b. irudia) transkripzio-faktoreen adierazpena handiagoa zen, DM1rako babes-aleloa zeraman lnc13-a gainadierazten genuenean baino. Emaitza hauek lnc13-k STAT1/2-ren adierazpena alelo-espezifikoki kontrolatzen duela konfirmatzen dute.

4. irudia. STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen adierazpen alelo-espezifikoak. a) STAT1 transkripzio-faktorearen adierazpena lnc13-rs917997*C edo lnc13-rs917997*T gainadierazten denean. b) STAT2 transkripzio-faktorearen adierazpen alelo-espezifikoak lnc13-rs917997*C edo lnc13-rs917997*T gainadierazten denean. (**p < 0.01).

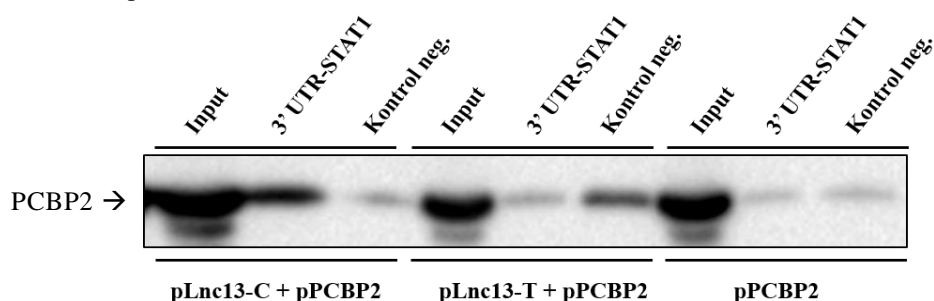


Argitaratutako lanen arabera (Xin et al., 2011), PCBP2 deritzon proteina batek STAT1 eta STAT2 mRNAk egonkortzen ditu, transkripzio-faktore hauen itzuli gabeko 3' muturreko eskualdera (3'UTR) lotuz. Egonkortze horrek mRNA molekulen endekapena zaildu egiten du, molekulak luzaroago mantenduz. Zenbait zelula-motetan PCBP2 proteinak eragindako STAT1/2 mRNA molekulen egonkortzeak hantura eragiten duela ikusi da (Murahashi et al., 2016 eta Xia et al., 2015).

Aurretiaz egindako zenbait RNA-immunoprezipitazio esperimenduei esker, lnc13 PCBP2 proteinara eta STAT1/2 mRNA molekuletara lotzen dela ikusi genuen, PIC-en presentzian molekula hauen arteko elkarrekintza handiagotzen delarik. Hori jakinda, lnc13 PCBP2 eta STAT1/2 molekulen arteko estekatzailea izan zitekeela pentsatu genuen eta hipotesi hori aintzat hartuz, STAT1 mRNAren 3'UTR eskualdearen *in vitro* transkripzioa egin genuen eta biotinarekin markatu. Ekoiztutako 3'UTR-STAT1 biotinizatua lnc13-C, lnc13-T edota PCBP2 gainadierazita zuten β -zelulen erauzkinarekin inkubatu genituen. Jakinda estreptabidina-biotina elkarrekintza oso sendoa dela, estreptabidinarekin biotinadun 3'UTR-STAT1-ari lotutako proteinak purifikatu genituen. Lorturiko laginekin *Western blot* teknika erabili genuen PCBP2 proteinaren adierazpena aztertzeko (5. irudia).

RNA pull-down esperimentu hauen aurretiazko emaitzek (n=1),PCBP2 eta 3'UTR-STAT1-aren arteko elkarrekintza egoteko lnc13-ren presentzia beharrezkoa dela aditzera eman zuten. Gainera lnc13 molekula DM1-rako arrisku-aleloa (rs917997*C) duenean, PCBP2 eta 3'UTR-STAT1-aren arteko lotura indartsuagoa da lnc13 molekula DM1-rako babes-aleloa (rs917997*T) duenean baino (5. irudia). pLnc13-C zein pLnc13-T plasmidoekin transfektatutako zeluletan, 3'UTR-STAT1-en presentzian PCBP2 dagoela ikus daiteke pPCBP2-rekin soilik transfektatutako zelulekin konparatuta (*Input*-ean pPCBP2-rekin transfektatutako zelulen kasuan pLnc13-T-rekin transfektatutako zeluletan baino proteina gehiago kargatu dela ikus daiteke; esperimentu gehiago edukitzean grafiko batean “*input-rekiko %*” gisa adieraziko bagenu diferentzia argi ikusiko litzateke). Hauek aurretiazko emaitzak dira eta teknikaren optimizazioa egitea beharrezkoa da emaitza eztabaiaezinak lortzeko (ikus daitekeen bezala, pLnc13+pPCBP2 baldintzan kontrol negatiboa nahiko zikina baitago).

5. irudia. Biotinilizatutako 3'UTR-STAT1 RNAREN pull-down esperimentua eta PCBP2 proteinaren Western blot-a. lnc13-C eta PCBP2 (plnc13-C+pPCBP2) edo lnc13-T eta PCBP2 (plnc13-T+pPCBP2) gainadierazitako zeluletan, PCBP2 proteina STAT1 molekularen 3'UTR eskualdera lotuta dagoela ikus daiteke. Gainera, DM1-rako arrisku-aleloa duen lnc13a (C aleloa) gainadierazten denean, PCBP2 eta 3'UTR-STAT1 molekularen arteko elkarrekintza handiagoa da. lnc13 gainadierazten ez denean berriz (pPCBP2), 3'UTR-STAT1 ez da PCBP2 proteinari lotzen.



lncBACH2-k β -zelulen apoptosiaren erregulazioan parte hartzen du

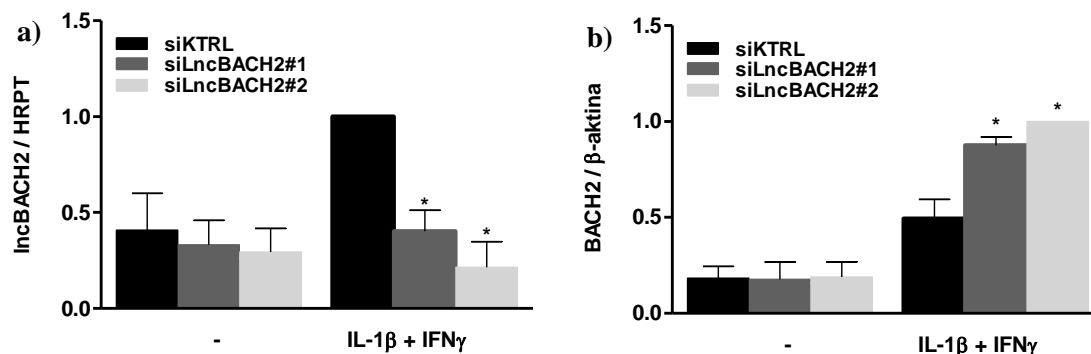
Kontuan izanda lncBACH2-ren kokapen genomikoa eta *BACH2* gene kodetzailearen kokapen genomikoa gainjartzen direla gure hasierako hipotesia lncBACH2-k *BACH2* genearen adierazpena erregulatzen zuela izan zen.

Hasteko, β -zeluletan lncBACH2 isilarazi genuen *BACH2* genearen adierazpenean eragina zuen aztertzeko. Isilarazpena gauzatzeko bi siRNA molekula desberdin erabili genituen. siRNAk RNA molekula txikiak dira zeintzuk RNA itura nukleotido osagarritasuna dela eta lotu egiten diren RNA horren adierazpena blokeatuz. siRNA kontrol bat erabili genuen (siCTRL) zeinak ez duen ezer isilaraziko baina esperimentua ondo joan denaren adierazle izango dena. lncBACH2 isilarazpenaz gainera, 48 orduko IL-1 β +IFN γ tratamendua aplikatu zitzairen lagin erdiei. Honela, lncBACH2 gabeziaren eragina aztertu genuen bai egoera basalean bai zitokinen eraginaren ostean. 6. irudian ikus daitezkeen emaitzek, alde batetik, IL-1 β +IFN γ tratamenduak lncBACH2 eta *BACH2*-ren adierazpena emendatzen duela adierazten dute. Bestalde, IL-1 β +IFN γ -rekin tratatutako eta lncBACH2 isilarazitako β -zeluletan, *BACH2* gene kodetzailearen adierazpenak gora egiten du. Beraz, badirudi hanturazko testuinguru batean, non IL-1 β +IFN γ dagoen, lncBACH2-k *BACH2* gene kodetzailearen adierazpena kontrolatzen duela; lncBACH2 murrizteak *BACH2* genearen emendatzea dakarrela ikusten dugu.

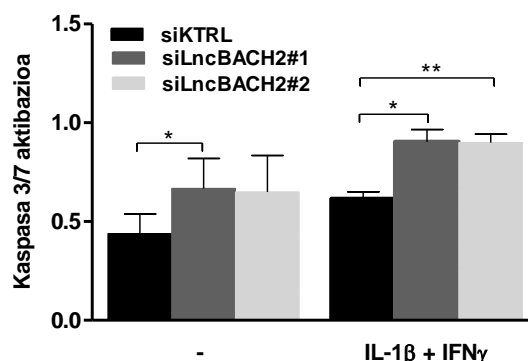
BACH2 geneak DM1-rekin lotura duela ikusi da (Marroquí et al., 2014). Izan ere, *BACH2* proteinak immunitate-sistemak abiarazitako pankreako β -zelulen apoptosia erregulatzen du. β -zelulen heriotza horrek diabetesaren sorrera ekar lezake. Hau horrela izanda, lncBACH2 eta apoptosiaren arteko lotura aztertzea jo genuen. Apoptosiaren neurketa egiteko kaspasa 3/7-ren aktibazioa aztertu genuen luziferasaren aktibitatean oinarritzen den kit komertzial bat erabiliz. Aurrekoan bezala, lncBACH2 isilarazpena eta 48 orduz IL-1 β +IFN γ tratamenduaren eraginak aztertu ziren. 7. irudian adierazten den moduan, IL-1 β +IFN γ tratamenduak apoptosia

emendatzen du, kaspasa 3/7-ren aktibazioaren igoerak adierazten duen bezala. Gainera, lncBACH2 isilarazitako β -zeluletan, kaspasa 3/7-ren aktibazioa handiagoa da siRNA kontrolarekin (siKTRL) transfektatutako zelulekin alderatuta bi baldintzetan (IL-1 β +IFN γ tratamenduarekin edo gabe). Ondoriozta daiteke IL-1 β +IFN γ 48 orduz trataturiko zeluletan apoptosia emendatzen dela eta gainera, lncBACH2 isilaraztean apoptosi-maila gorago doala.

6. irudia. lncBACH2 eta BACH2 genearen adierazpena lncBACH2 isilarazitako zeluletan. a) lncBACH2 lncRNAren adierazpena tratatu gabeko (-) edo IL-1 β +IFN γ -rekin tratatutako zeluletan. b) BACH2 genearen adierazpena tratatu gabeko (-) edo IL-1 β +IFN γ -rekin tratatutako zeluletan (* $p < 0.05$).



7. irudia. Kaspasa 3/7 aktibazioaren neurketa. Luziferasa bidezko kaspasa 3/7 aktibatuauren neurketa espezifikoa, lncBACH2 isilarazitako β -zeluletan eta IL-1 β +IFN γ tratamenduarekin edo gabe (-).



4. Ondorioak

Oro har, datu hauek DM1-rekin asoziatutako lncRNAk β -zelulen bideragarritasunean eragina duten bi bidezidorretan (hantura eta apoptosia) eragina dutela baieztatzen dute eta 1 motako diabetesaren patogenesisian berebiziko garrantzia eduki dezaketela iradokitzen dute.

Gure emaitzen arabera, lnc13-ak β -zelulen hantura prozesuan parte hartzen du STAT1 eta STAT2 transkripzio-faktoreen erregulazioaren bitartez. Gainera, efektu horren atzean dagoen mekanismo molekularra identifikatu dugu eta lnc13 STAT1/2 mRNA molekulen eta RNAren egonkortzailea den PCBP2 proteinaren arteko estekatzailea dela ikusi dugu. Bestalde, lnc13-an dagoen DM1-rekin asoziatutako polimorfismoaren aleloek prozesu honetan eragina dutela ikusi dugu, arrisku-aleloaren efektua babes-aleloarena baino indartsuagoa delarik. Laburbilduz, lan honek lnc13-a DM1-rako arrisku aleloa duenean infekzio birikoek eragiten duten hantura handiagotzen duela ikusi dugu, honek diabetesaren patogenesisian berebiziko eragina duelarik. Izan ere, hantura DM1-ren garapenaren hasierako faseetan ematen den prozesua da. Hanturak sistema immuneko zelulak aktibatzen laguntzen du, pankreako β -zelulen suntsipena bideratuz (apoptosiaren aktibazioa eraginez). Pankreako β -zelulen suntsipenak, intsulinararen eskasia dakar eta ondorioz, gaixotasunaren garapena.

Bestalde, lncBACH2-ren azterketa funtzionalari dagokionez, lncBACH2-k *BACH2* genearen adierazpena kontrolatzen duela dirudi. Gainera, lncBACH2 molekulak, *BACH2* genearen erregulazioaren bitartez, hanturak eragindako β -zelulen apoptosian (suntsipenean) eragina duela ikusi dugu.

Laburbilduz, DM1-rekin asoziatuta dauden SNPak dituzten bi lncRNA hauek 1 motako diabetesaren patogenesian eragina duten bi prozesuetan (hantura eta zelulen heriotza) parte hartzen dutela ikusi dugu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa lan honen bitartez bi lncRNAen karakterizazio funtzionala egin dugu, baina DM1-rekin asoziatutako lncRNA gehiago daudela jakinda, epe laburrera gure helburu nagusia beste lncRNA batzuen karakterizazioa egitea da. lncRNA horien eta ingurune faktoreen (batez ere, infekzio birikoen) arteko elkarrekintza aztertuz, β -zelulen suntsiketari DM1-rekin asoziatutako lncRNAen eragina zein den argitu nahi dugu.

6. Erreferentziak

- Castellanos-Rubio A. et al. (2016), A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease. *Science*, 352, 91-95.
- Dunne J. et al. (2019), Rationale for enteroviral vaccination and antiviral therapies in human type 1 diabetes, *Diabetologia*, 62, 1-10.
- Eizirik DL. et al. (2009), The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 219–226.
- EURODIAB ACE Study Group (2000), *Lancet*, 355, 873–876.
- Marroqui L. et al. (2014), BACH2, a candidate risk gene for type 1 diabetes, regulates apoptosis in pancreatic β -cells via JNK1 modulation and crosstalk with the candidate gene PTPN2. *Diabetes*, 63(7), 2516-2527.
- Murahashi et al. (2016), Identification of poly(rC) binding protein 2 (PCBP2) as a target protein of immunosuppressive agent 15-deoxyspergualin. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476 (4), 445-449.
- Richardson S., eta Morgan N. (2018). Enteroviral infections in the pathogenesis of type 1 diabetes: new insights for therapeutic intervention. *Current opinion in pharmacology*, 43, 11-19.
- Rodriguez-Calvo T. (2018), Enteroviral Infections as a Trigger for Type 1 Diabetes. *Current Diabetes Reports*, 18, 106.
- Xia N. et al. (2015), PCBP2 regulates hepatic insulin sensitivity via HIF-1 α and STAT3 pathway in HepG2 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 463 (1–2), 116-122.
- Xin, Z. et al. (2011), PCBP2 enhances the antiviral activity of IFN- α against HCV by stabilizing the mRNA of STAT1 and STAT2. *PloS one*, 6(10), e25419.

7. Eskerrak eta oharrak

- Ikerkuntza lan hau honako proiektuen bitartez finantzatu da: Eusko Jaurlaritzako Osasun Saila (2015111068) eta *Sociedad Española de Diabetes* emandako dirulaguntza.