



III. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

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

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Gaixotasun autoimmunei
asoziatutako RGS1 eremuko
lncRNA baten karakterizazio
funtzionala**

*Ane Olazagoitia-Garmendia,
Nora Fernandez-Jimenez,
Maialen Sebastian-delacruz,
Jose Ramon Bilbao eta
Ainara Castellanos-Rubio*

92-98 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.12>



Gaixotasun autoimmuneen asoziatutako *RGS1* eremuko lncRNA baten karakterizazio funtzionala

Olazagoitia-Garmendia, Ane¹; Fernandez-Jimenez, Nora¹; Sebastian-delaCruz, Maialen¹; Bilbao, Jose Ramon^{1,3} eta Castellanos-Rubio, Ainara^{1,2,3}

¹Euskal Herriko Unibertsitatea (UPV-EHU)-BioCruces Bizkaia Osasun Ikerketarako Institutoa, Leioa, ²IKERBASQUE, Basque Foundation for Science, Bilbo. ³CIBERDEM, Madril
ane.olazagoitia@ehu.eus

Laburpena

Genome-wide association studies (GWAS) eta *RNA sequencing* (RNAseq) teknologiei esker gaixotasun autoimmuneekin lotutako gene eta mekanismo ugari aurkitu badira ere, asoziatutako aldaera (Single Nucleotide Polymorphism edo SNP) gehienak eremu ez kodetzailatan kokatzen direla ikusi da. Azken aldian RNA ez kodetzaila luzeak (lncRNA) zenbait prozesu biologikoetan duten garrantzia azpimarratu da eta gaixotasun askoren garapenarekin erlazionatu dira, gaixotasun autoimmuneak kasu. Lan honen helburua *RGS1* eremuan dagoen gaixotasun autoimmuneen asoziatutako rs2816316 SNParen karakterizazio funtzionala egitea izan da. Gure emaitzen arabera, SNParen inguruan dagoen eremuak *RGS1* genearen erregulazioan eragina du bertan aurkitzen den lncRNA nuklear baten bitartez.

Hitz gakoak: lncRNA, SNP, gene adierazpena, eQTL

Abstract

Genome-wide association studies (GWAS) and *RNA sequencing technology* (RNAseq) have helped in the detection of genes and genetic mechanisms involved in autoimmune diseases. However, the majority of associated variants reside in non-coding regions, which are mainly functionally uncharacterized. New evidences indicate that long non-coding RNAs (lncRNAs) play crucial roles in various biological processes and they have emerged as key regulatory molecules involved in the development of a wide range of diseases, including autoimmune disorders. The aim of this study was to functionally characterize the autoimmune disease associated rs2816316 SNP located in *RGS1* region. Our results suggest that the region around rs2816316 is involved in *RGS1* regulation, probably through a nearby nuclear lncRNA.

Keywords: lncRNAs, SNP, gene expression, eQTL.

1. Sarrera eta motibazioa

Erantzun immune egokia bermatzeko ezinbestekoa da gorputzak patogenoak eta berezko zelulak ondo bereiztea. Prozesu horrek huts egitean erantzun immune okerra gertatzen da, hantura kronikoa eta ehun osasuntsuen suntsipena eraginik. Egoera horrek gaixotasun autoimmuneak eta inflamatorioak sortzen ditu eta populazioaren %5ari eragiten dio (Cotsapas et al, 2011; Gutierrez-Arcelus et al, 2016).

Ikerketa desberdinek erakutsi dute gaixotasun autoimmuneak pairatzeko arriskuak ekarpen genetiko garrantzitsua duela, eta gainera, gaixotasun autoimmune desberdinek hainbat arrisku lokus partekatzen dute (Cotsapas et al, 2011; Gutierrez-Arcelus et al, 2016; Jonkers eta Wijmenga, 2017). Azken urteotako tekniken aurrerapenari esker GWAS eta ImmunoChip bezalako asoziazio ikerketak egin dira gaixotasun autoimmune askotan, eta haiekin zerikusia duten genomaren eremu eta nukleotido bakarrek aldaera (Single Nucleotide Polymorphism edo SNP) berriak atzeman dituzte. Gainera, eQTL (*expression quantitative trait locus*) hurbilketak egin dira asoziatutako SNP hauen efektu fenotipikoak zehaztu asmoz. Hala, ikerketa desberdinek asoziatutako SNPen aleloek inguruko geneen adierazpenean izan dezaketen eragina aztertu dute. Eta horrela, erantzun immunean parte hartzen duten gene eta mekanismo desberdinak identifikatu dira (Castellanos-Rubio eta Bilbao, 2018; de Haas et al, 2014; Jonkers eta Wijmenga, 2017; Lee et al, 2018).

Gaixotasun hauei asoziatutako geneen ezagutzan asko aurreratu den arren, SNP gehienek gaixotasunaren

garapenean nola eragiten duten ulertzeke dago oraindik. Alde batetik, gizakiok erantzun immune konplexua dugu; parte hartzen duten zelula desberdinek, geneen adierazpen aldaketek eta kanpo eragileek eragiten dituzten jokabide desberdinak ez dira guztiz ezagunak oraindik (Gutierrez-Arcelus et al, 2016). Horrez gain, gaixotasun konplexuei asoziatutako SNP gehienak genomaren eremu ez kodetzaileretan daudela ikusi da, eta zaila izaten da beraien eragina identifikatzea. Bestalde, ikerketa desberdinek erakutsitakoaren arabera, eremu ez kodetzaileretan dauden SNPek eragin dezakete bai inguruko geneen edota bai beste kromosoma bateko geneen adierazpenean (Ricaño-Ponce et al., 2016). Hori guztia kontuan izanik, eremu ez kodetzaileretako SNP asoziatuen funtzioak argitzea zaila bezain beharrezkoa den lana dugu gaixotasun horien inguruko ezagutza sakontzeko.

Egun, giza genoma ez kodetzaileraren %70 inguru transkribatzen dela dakigu. Azken urteotan garatu den RNAREN sekuentziazio teknikari esker transkribatzen diren eremu berriak identifikatu dira (mRNA zein RNA ez kodetzailerak) (Castellanos-Rubio eta Bilbao, 2018; Mowel et al, 2018). Azken horien artean RNA luze ez kodetzailerak (long non-coding RNA edo lncRNA) dira ugariak eta askotan beren funtzioa ezezaguna izan arren, molekula horiek gaixotasunen garapenean izan dezaketen eraginak interes handia piztu du azken aldian (Mowel et al, 2018).

lncRNAk proteinarik kodetzen ez duten 200 nt baino luzeagoko RNA molekulak dira. Zenbait ikerketek erakutsi dutenez, lncRNAk garapenarekin, homeostasiarekin, aldaketa patofisiologikoekin edota erantzun immunearekin erlazionatuak daude, ekintza-mekanismo desberdinen bidez (de Haas et al, 2014). Izan ere, molekula horiek azkar eta zelula espezifiktasunez erantzun diezaiekete kanpo seinale desberdinei (Mowel et al, 2018). Gainera, lncRNAk transkripzioan zein transkripzioaren ostean erregula dezakete geneen adierazpena; zuzenean beste RNA, DNA edo proteinei lotuta edo bitartekari moduan jokatzuz (Chen et al, 2017; Mowel et al, 2018). Guzti horretaz gain, RNAREN eraldaketa desberdinek, deaminazio edota m6A eraldaketek kasu, elkarrekintza horiek baldintza ditzakete eta lncRNAren funtzioan eragin (Chen et al, 2017; Patil et al, 2018). Azkenik, gaixotasunekin asoziatutako SNP asko lncRNAren funtzioa erregulatzen egon daitezkeela ikusi da (Castellanos-Rubio et al, 2016; 2018). Hortaz, lncRNAren aniztasuna kontuan izanda eta asoziatutako SNPak molekula horien sekuentzietan agertzen direla ikusirik, gaixotasunen garapenean duten papera argitzeko esfortzuak egiten ari dira (gaixotasun autoimmuneak barne).

Sistema immuneko zelulek oso funtzio bereziak dituztela, kanpo seinaleei erantzuteko gai direla eta transkripzio faktoreek erregulatzen dituztela jakina den bitartean, ez da oso ezaguna lncRNAek erantzun immunean duten funtzioa. Azken urteotan lncRNA batzuk gaixotasun inflamatorioen aurrean babesa handitzen dutela ikusi da (Chen et al, 2017; Mowel et al, 2018) bai eta beste batzuk hantura edo autoimmunitatea garatzeko arriskua areagotzen dutela ere (Castellanos-Rubio et al, 2016; 2017; Huang et al, 2015; Santin et al, 2018; Zhang et al, 2017). Hortaz, gaur egun interes berezia dago lncRNA desberdinek inflamazioan eta erantzun immunean jokatzeko duten papera deskribatzeko eta gaixotasun konplexuei asoziatutako SNPek lncRNA horiengan duten eragina argitzeko.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Aipatu bezala, geroz eta adibide gehiago deskribatu dira non gaixotasun autoimmunei eta hanturari asoziatutako SNPek lncRNA molekulengan eragiten duten, eta beren funtzioa aldatu eta gaixotasuna pairatzeko arriskua handitu dezakete. Ikusi den moduan, zenbait gaixotasun autoimmuneek arrisku lokus desberdinak partekatzen dituzte, eta askotan erantzun immunearekin edota hanturarekin erlazionatutako eremuak dira. Beraz, eskualde horietan dauden eta eremu ez kodetzaileretan kokatzen diren SNPak interes handikoak dira. Bertan aurkitzen diren elementu erregulatzailerak identifikatu eta beraien funtzioa deskribatzeak informazio oso interesgarria emango baitu gaixotasun autoimmuneetan parte hartzen duten mekanismoak identifikatzeko.

Horregatik, *RGS1* genearen ondoan dagoen rs2816316 SNPa aztertzea izan da lan honen helburu nagusia. SNP hori eritasun zeliakoarekin (EZ) asoziatua dago gehien bat, baina esklerosi anizkoitza (EA) eta 1 motako diabetesarekin (DM1) erlazionatuta ere badago (Esposito et al, 2010; Hunt et al, 2008; Parkkola et

al, 2017; Smyth et al, 2008). Gainera, *RGS1* geneak T zelulen funtzioaren erregulazioan parte hartzen duela ikusi da eta zelula horiek gaixotasun autoimmune horietan paper garrantzitsua dute (Caballero-Franco et al, 2016; Gibbons et al, 2011).

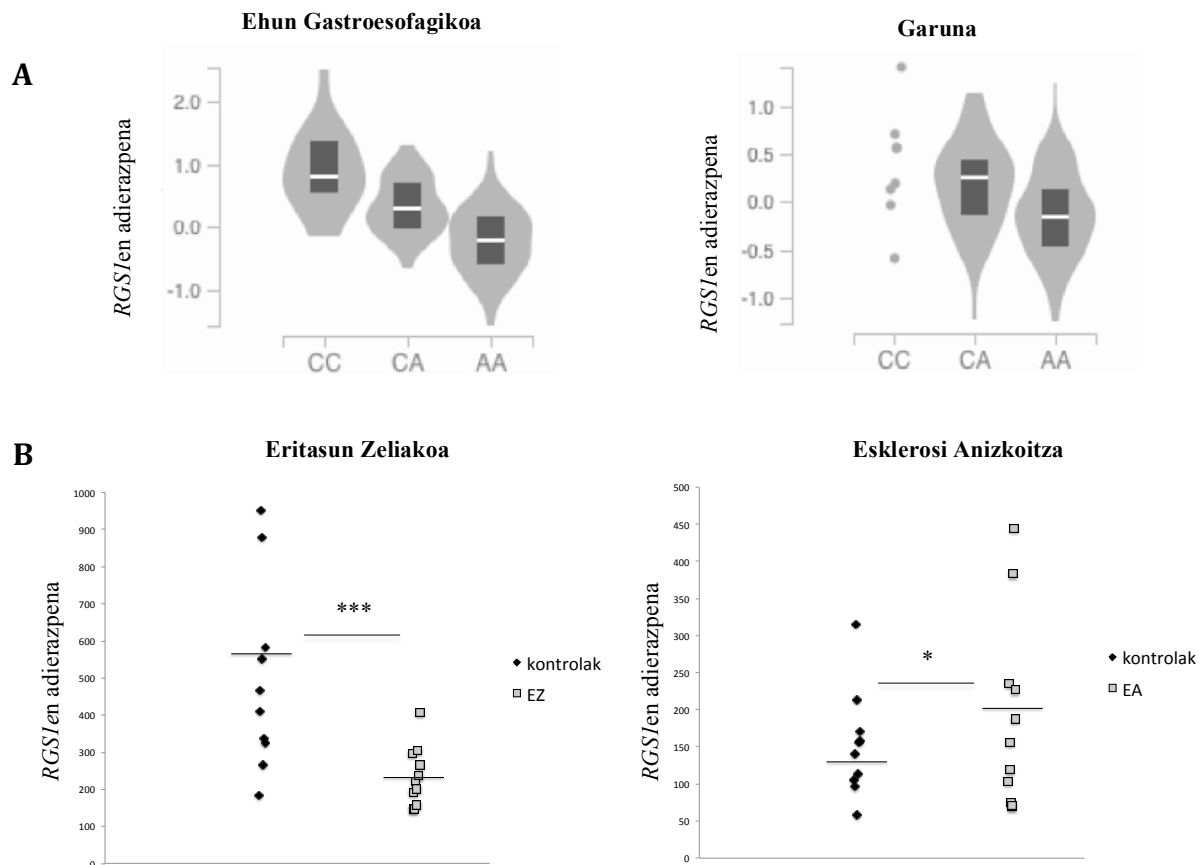
Beraz, lan honen helburua rs2816316 SNPa dagoen eremu genomikoaren karakterizazio funtzionala burutzea izan da, asoziaturiko gaixotasun autoimmunetan izan dezakeen eragina azaltzeko asmoz.

3. Ikerketaren muina

3.1. *RGS1* genearen adierazpena aldatua dago rs2816316 SNPari asoziaturiko gaixotasunetan

Goian aipatutako ikerketa desberdinek adierazi duten moduan *RGS1* eremua EZ, EA edota DM1 motako gaixotasun autoimmunekin asoziatua dago. Gainera EZak eta EAK rs2816316 SNPren arrisku aleloa (A aleloa) partekatzen dutela ere deskribatu da. Hortaz, lehenengo *GTEX* datu basean (<https://gtexportal.org/home/>) ikusi genuen SNP hau eQTL dela *RGS1* genearentzat bai ehun gastroesofagikoan (1.Irudia A, ezkerrean) eta baita garunean ere (1.Irudia A, eskubian). Hau da, genotipoak genearen adierazpenean eragiten duela ikusi daiteke. Ondoren, *GEO profile* datu basean (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/?term=>) egindako bilaketari esker ikusi genuen *RGS1* genearen adierazpena gutxitua dagoela EZ gaixoen zelula immuneetan (Sanginetto et al, 2018) (1.Irudia B, ezkerrean). EA gaixoen kasuan aldiz, *GEO* on aurkitutako datuen arabera (Kempainen et al, 2011) *RGS1* genearen adierazpena emendatua dago kontrolekin alderatzean (1.Irudia B, eskubian).

1.irudia. *RGS1* genearen adierazpena. (A) *GTEX* datu basearen arabera *RGS1*en adierazpen maila rs2816316 SNPren genotipoaren arabera (CC, CA edota AA), ehun gastroesofagikoan (ezkerrean) eta garunean (eskuibian); **(B)** *GEO* datu basearen arabera *RGS1*en adierazpen maila EZ gaixo eta kontroletan (ezkerrean) eta EA gaixo eta kontroletan (eskuibian). *** $p < 0.001$ eta * $p < 0.05$ (t testa).

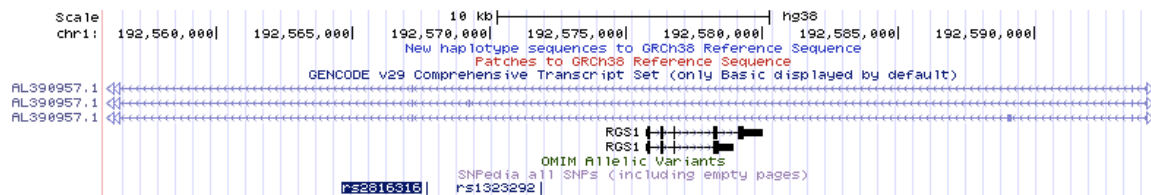


3.2. rs2816316 SNPa deskribatu gabeko lncRNA nuklear batean dago eta *RGS1* genearen erregulazioan eragin dezake

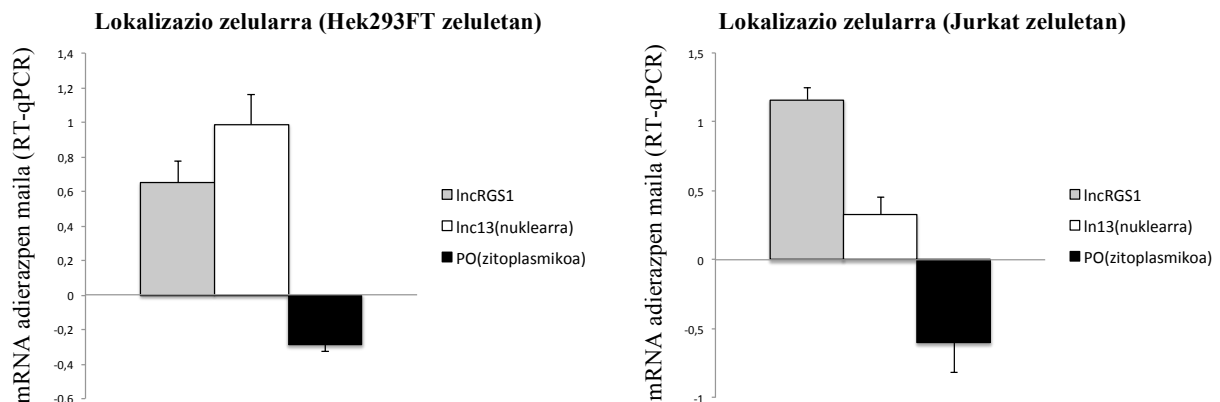
RGS1 genearen adierazpena asoziatutako gaixotasunetan aldatua dagoela ikusirik, rs2816316 SNPak izan dezaken efektua ikertzen saiatu ginen. Horretarako, UCSC genom bilatzailea erabiliz (<http://genome-euro.ucsc.edu>) SNP honen eremua aztertu genuen eta deskribatu gabeko lncRNA batentzat intronikoa dela ikusi genuen (2.Irudia A). LncRNA hau *RGS1* genearekiko alderantzizko transkritoa izanik, genearen adierazpena erregulatzen duen ikusi nahi izan genuen. Zelulen nukleoak banatu eta RT-qPCR teknikaz baliatuz lncRNA hau, hots, *lncRGS1*, gehien bat nukleoan adierazten dela ikusteko gai izan ginen lan honetan erabilitako lerro zelularretan (Hek293FT eta Jurkat T zelulak) (2.Irudia B). Emaita honek adierazten du lncRNA honen funtzioa adierazpen erregulatuak izan daitezkeela.

2.irudia. rs2816316 SNPa intronikoa da deskribatu gabeko lncRNA nuklear batentzat. (A) Erantzun immunearekin lotutako rs2816316 SNPa eta *RGS1* genea hartzen dituen eremuaren irudikapena UCSCn; **(B)** asoziatutako eremuan dagoen *lncRGS1*-en lokalizazio zelularren grafikoak Hek293FT eta Jurkat zeluletan, *lnc13* kontrol nuklearra eta *PO* kontrol zitoplasmikoa izanik.

A

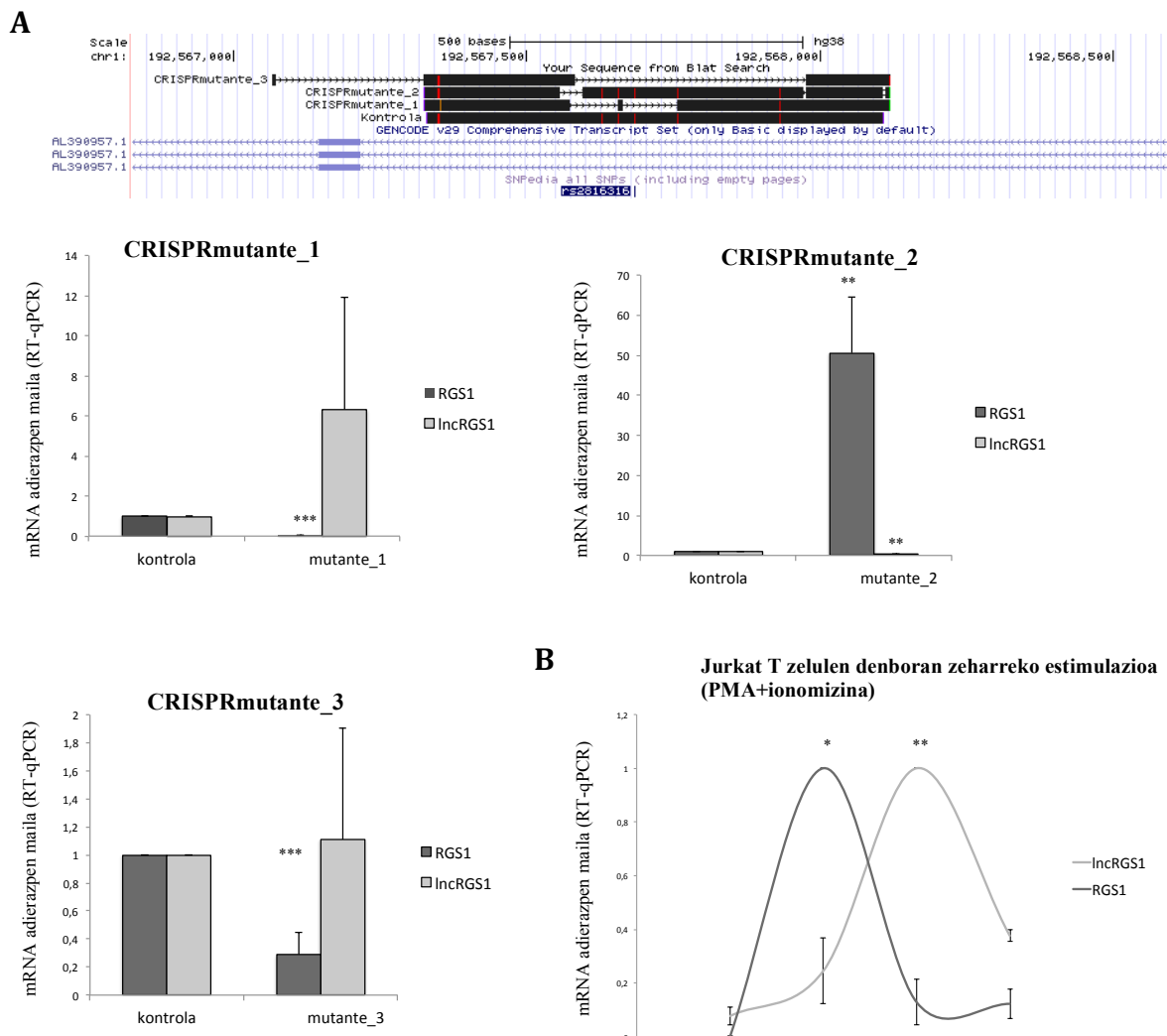


B



Hau ikusita, CRISPR-Cas9 bidez rs2816316 SNPa hartzen duen 400 nt inguruko eremuaren delezioa egin genuen eta Hek293FT zeluletan 3 mutante desberdin isolatzeko gai izan ginen (3.Irudia A, goian). Zelula mutante hauetan *lncRGS1* eta *RGS1* geneen adierazpenak aztertu genituen eta 3.irudian ikusi daitekeen moduan 3 mutanteen kasuan bi geneek aurkako joera azaltzen zuten (3.Irudia A, behean). Gainera, *RGS1* erantzun immunean T zelulen funtzioarekin erlazionatua izan denez, Jurkat T zelulak PMA eta ionomizinarekin tratatu genituen. Kasu honetan ere *lncRGS1* eta *RGS1* geneek aurkako joera adierazi zuten (3.Irudia B).

3.irudia. rs2816316 SNParen eremuaren karakterizazio funtzionala. (A) CRISPR-Cas9 teknika bidez lortutako mutanteen delezioen irudikapena (goian) eta *RGS1* eta *lncRGS1* geneen adierazpen mailak RT-qPCR bidez neurtuta (behean), kontrol bezala deleziorik gabeko Hek293FT zelulak erabili ziren, *** $p < 0.001$ eta ** $p < 0.01$ (t testa); (B) PMA eta ionomizinarekin estimulatutako 0h, 8h, 24h eta 48h-tan Jurkat T zeluletan *lncRGS1* eta *RGS1* geneen adierazpen aldaketak, irudikatutako puntuak gene bakoitzaren balio altuenarekiko normalizatu ziren ** $p < 0.01$ eta * $p < 0.05$ (t testa).



4. Ondorioak

Alde batetik gure emaitzek adierazten dute rs2816316 SNPa dagoen eremuak *RGS1*en adierazpenean eragina duela. Gainera, identifikatu dugun lncRNA nuklearra izateak eta *RGS1* genearen aurkako adierazpen joera aurkezteak (bai CRISPR-Cas9 bidezko delezioetan baita estimulazio esperimenduetan) pentsarazten digu lncRNA honek genearen adierazpenaren erregulazioan parte hartzen duela. Hortaz, asoziatutako SNPak lncRNA honen funtzioan eragin lezake eta *RGS1* genearen erregulazioa asaldatu. Gainera, ikusi dugu T zelulak kitzikatzean bi gene hauen adierazpenak aldatu egiten direla, erantzun immunean parte hartzen dutela iradokiz.

Horrez gain, T zelulen funtzioak garrantzia duen gaixotasun desberdinekin erlazionatu dira bai SNPa eta baita genea ere. Datu base desberdinak erabiliz ikusi dugun moduan, EZ eta EA gaixoen zelula immuneetan *RGS1* genearen adierazpena aldatua dago kontrolekin alderatzean. Gainera, gaixotasun hauetan kaltetzen diren ehunetan *RGS1*en adierazpenak genotipoarekin harremana duela dirudi GTExen

datuen arabera.

Guzti honekin ondorioztatu dezakegu rs2816316 SNPak bertan dagoen lncRNAREN funtzioan eragiten duela, hala *RGS1*en erregulazio okerra bultzatuz. *RGS1* adierazpen aldaketak T zelulen funtzioan eragin lezake erantzun immunea nahastuz, eta hala, EZ edota EA bezalako gaixotasun autoimmuneak garatzeko arriskua handitu.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Lan honetan lortutako emaitzek *RGS1* eta ondoan dagoen lncRNAk erantzun immunean paper garrantzitsua izan dezaketela adierazten dute. Seguruenik lncRNAk genearen adierazpenaren erregulazioan parte hartzen du eta erregulazio honen hausturak (rs2816316 SNParen edo gehiagoren genotipoak bultzatuta) T zelulen funtzioan eta gaixotasun autoimmuneen garapenean eragin lezake. Hala ere, mekanismo honen azterketa sakonagoa beharrezkoa dugu baieztapen hau egiteko. Alde batetik, lncRNAk *RGS1* genea zuzenki erregulatzen duen eta hala bada nola burutzen duen aztertu behar da (geneari zuzenean lotzen den, bitartekari moduan lan egiten duen, etab). Bestalde, orain arte ikusi ditugun azterketak, gaixoak eta kontrolak alderatzen dituzten lanak, odoleko zeluletan egin dira. Honek gene adierazpen mailan gertatzen denaren ideia bat eman diezaguke, baina gaixotasunean kaltetzen diren zeluletan bereziki zer gertatzen den ikustea izango litzateke hurrengo pausua. Gainera, *RGS1* genearen adierazpena neurtzeaz gain lncRNAREN adierazpena ere neurtzea oso garrantzitsua izango da.

6. Erreferentziak

- Caballero-Franco, C eta Kissler, S. (2016): The autoimmunity-associated gene *RGS1* affects the frequency of T follicular helper cells, *Genes and Immunity*, 17, 228-238.
- Castellanos-Rubio, A. et al (2016): A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease, *Science*, 352 (6281), 91-95.
- (2017): Cytoplasmic form of Carlr lncRNA facilitates inflammatory gene expression upon NF-kb activation, *J. Immunol.*, 199, 1-8.
- (2018): Profiling celiac disease-related transcriptional changes, *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, 336, 149-174.
- Chen, Y.G. et al (2017): Gene regulation in the immune system by long noncoding RNAs, *Nat. Immunol.*, 18 (9), 962-972.
- Cotsapas, C. et al (2011): Pervasive Sharing of Genetic Effects in Autoimmune Disease, *PLOS Genetics*, 7 (8), 1-8.
- de Haas, E. C. et al (2014): Immunogenetics of celiac disease, in S.D. Rampertab, G.E. Mullin (arg.), *Celiac Disease*, USA, 53-66.
- Esposito, F. et al (2010): IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and *RGS1* are novel multiple sclerosis loci. *Genes Immun.*, 11, 397-405.
- Gibbons, D.L. et al (2011): Regulator of G protein signalling-1 (*RGS1*) selectively regulates gut T cell trafficking and colitic potential, *J Immunol.*, 187 (5), 2067-2071.
- Gutierrez-Arcelus, M. et al (2016): Autoimmune diseases-connecting risk alleles with molecular traits of the immune system, *Nat. Rev. Genet.*, 17 (3), 160-174.
- Huang, W. et al (2015): DDX5 and its associated lncRNA Rmrp modulate TH17 cell effector functions, *Nature*, 28, 519-522.
- Hunt, K.A. et al (2008): Novel celiac disease genetic determinants related to the immune response, *Nat Genet.*, 40 (4), 395-402.
- Jonkers, I.H. eta Wijmenga, C. (2017): Context-specific effects of genetic variants associated with autoimmune disease, *Human Molecular Genetics*, 26 (2), 185-192.
- Kemppinen, A.K. et al (2011): Systematic review of genome-wide expression studies in multiple sclerosis, *BMJ Open*, 1 (1).
- Lee, P.H. et al (2018): Principles and methods of insilico prioritization of non-coding regulatory variants, *Hum. Genet.*, 137, 15-30.
- Mowel, W.K. et al (2018): Control of immune cell homeostasis and function by lncRNAs, *Trends Immunol.*, 39 (1).
- Parkkola, A. et al (2017): HLA and non-HLA genes and familial predisposition to autoimmune diseases in families with a child affected by type 1 diabetes, *PLoS ONE*, 12 (11).
- Patil, D.P. et al (2018): Reading m6A in the transcriptome: m6A-binding proteins, *Trends Cell Biol.*, 28 (2), 113-127.
- Ricaño-Ponce, I. et al. (2016): Refined mapping of autoimmune disease associated genetic variants with gene expression suggests an important role for non-coding RNAs, *J. Autoimmun.*, 68, 62-74.

Sangineto, M. et al (2018): Identification of peculiar gene expression profile in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of celiac patients on gluten free diet, *PLoS One*, 13 (5).

Santin, I. et al (2018): A celiac disease associated lncRNA named HCG14 regulates NOD1 expression in intestinal cells, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 67 (2), 225–231.

Smyth, D.J. et al (2008): Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease, *N Engl J Med*, 359, 2767-77.

Zhang, F. et al (2017): Linc-MAF-4 regulates Th1/Th2 differentiation and is associated with the pathogenesis of multiple sclerosis by targeting MAF, *Faseb. J.*, 31 (2), 519–525.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau ISCIII(16/00258), ERDF-ek lagunduta “A way to make Europe”, EJSan-2018111086, EJ-2017111082 eta ACM ikerketa proiektuen bidez finantziatu da.