



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

**Elementu erregulatzaileen
identifikazioa eritasun zeliakoan
genoma osoko koadierazpen
analisi bidez**

*Irati Romero-Garmendia,
Koldo Garcia-Etxebarria,
Izortze Santin, Amaia Jauregi-Miguel,
Leticia Plaza-Izurieta, Maria Legarda,
Iñaki Irastorza, Nora Fernandez-
Jimenez eta Jose Ramon Bilbao*

88-93 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.11>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Elementu erregulatzailen identifikazioa eritasun zeliakoan genoma osoko koadierazpen analisi bidez

Romero-Garmendia I.¹, Garcia-Etxebarria K.¹, Santin I.², Jauregi-Miguel A.¹, Plaza-Izurietia L.¹, Legarda M.³, Irastorza I.³, Fernandez-Jimenez N.^{1*}, Bilbao JR^{1*}.

¹*Immunogenetika laborategia, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

²*Endokrinologia eta Diabetes ikerketa taldea, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

³*Haur Gastroenterologia, Gaixotasun zeliakoa, Nutrizioa eta digestio hodiko gaixotasunen ikerketa taldea, Pediatria Saila, BioCruces Osasun Ikerketa Institutua, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

irati.romero@ehu.eus

Laburpena

Eritasun zeliakoa (EZ) glutenaren eraginez genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan agertzen den gaixotasun autoimmunea da. Jakina da gliadinak zenbait generen koadierazpenean eragiten duela EZan. Ikerketa honen helburua genoma mailako koadierazpen patroiz zeliakoak eraikitzea izan da, eta baita gaixotasunaren testuinguruan alterazioen atzean egon daitezkeen elementu erregulatzailak identifikatzea ere. Gure metodologia gaixotasunerako funtsezko izan daitezkeen elementu erregulatzailak identifikatzeko gai izan da. Zehazki, *CREB1* eta *IRF1* desberdin adierazten dira pazienteetan kontrol ez zeliakoekin alderatuta, eta haien aktibazioa gertatzen da gliadinarekin kitzikatutako C2BBel zeluletan.

Hitz gakoak: Eritasun zeliakoa, koadierazpena, IRF1, CREB1

Abstract

Celiac disease (CD) is an autoimmune disease that develops in genetically susceptible individuals due to ingested gluten. It is known that gliadin provokes coexpression changes in several genes in the disease. The aim of this study was to construct the celiac coexpression patterns at a whole genome level and to identify regulatory elements that drive CD-related alterations in coordination. Coexpression analyses at a whole genome level are a useful strategy to identify regulators that could underlie these patterns and consequently be relevant to the disease. In particular, CREB1 and IRF1 are differentially expressed in patients, and are activated upon gliadin stimulation in C2BBel cells.

Keywords: Celiac disease, coexpression, IRF1, CREB1

1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (EZ, MIM: 212750) %1eko maiztasuna duen gaixotasun kroniko eta autoimmunea da, gariaren glutenaren eta zekale eta garagarraren beste antzeko proteinekiko intolerantzia dela eta, genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan ematen dena. Heste meharraren endekatzea eragiten du EZak; hala nola, linfuzito intraepitelialen infiltrazioa, kripten hiperplasia eta biloxken atrofia. Gainera, diagnosirako erabilgarriak diren auto-antigorputzak agertzen dira zirkulazioan, anti-endomisio (EMA) edo anti-transglutaminasa (TGA) antigorputzak, esaterako (Green eta Cellier, 2007).

Sintomak oso aldakorak izan daitezke. Ohikoenak beheko kronikoa, pisu galera eta hantura abdominala dira, baina nekea, altuera baxua, osteoporosia, urritasun psikomotoreari dagozkion sintomak (giharren ahultzea...) ere aurkeztu ditzake.

Gaur egun, tratamendu eraginkor bakarra erabateko glutenik gabeko dieta (GGD) da, gari, zekale eta garagarraren produktuak dietatik kenduz. Tratamendua betetzen ez bada, beheakoa, inflamazioa, pisu galera, giharren ahultzea etab. eman daitezke.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Zeliakia eritasun konplexua da, bere patogenesisian faktore genetikoek zein ingurune faktoreek parte hartzen dutelarik. Giza Antigeno Leukozitarioaren (ingelesez Human Leucocyte Antigen edo HLA) DQ2 eta DQ8 aldaerak arrisku genetikoaren erantzule nagusiak dira, baina beharrezkoak izan arren, gaixotasunaren osagarri genetikoaren %40a inguru besterik ez dute azaltzen (Greco et al., 2002). Azken urteetan genoma osoko asoziazio azterketek (GWAS) eta Immunochip (van Heel eta al., 2007; Dubois et al., 2010; Trynka et al., 2011; Garcia-Etxebarria et al., 2016) proiektuak gaixotasunaren arriskuan eragiten duten beste markatzaile batzuk identifikatu dituzte. Azken horiek osagai genetikoaren %10-15 azaltzen dute.

Asoziazio seinale horien atzean egon daitezkeen ondorioak ulertzeko burutu diren gene hautagaien banakako adierazpen azterketek emaitza mugatuak erdietsi dituzte (Plaza-Izurietta et al., 2015). Gaixotasunaren patogenesisian eszenatoki konplexuagoa iradokitzen dute, non gene taldeen edota bidezidorren erantzun koordinatua izan daitezkeen maila ukitua. Zentzu horretan, asoziazio eremu genomiko bereko *PTPRK* eta *THEMIS* geneen adierazpen mailak gaixoen heste biopsietan (baina ez kontrol ez zeliakoetan) korrelazionatuta daudela ikusi dugu (Bondar et al., 2014). Gainera, NFκB bidezidorrarekin erlazionatutako 93 geneen mRNA mailen arteko korrelazio estua aurkitu da kontrol ez zeliakoetan, baina gaixoetan gene multzoaren adierazpena guztiz desantolatzen da (Fernandez-Jimenez et al., 2014).

Aurkikuntza horiek, gaixotasuna eragiten duten faktoreak gene indibidualak baino, gene taldeak erregulatzen dituzten elementu genomikoak izan litezkeela iradokitzen dute. Eritasun zeliakoa pairatzeko joera duten pertsonengan glutenaren ingestioak zenbait gene multzoren erantzun koordinatuan eragin dezakeela proposatzen dugu, gene multzo koordinatuak sortuz edota multzoak desantolatuz transkriptoma osoan zehar. Gainera, koadierazpen aldaketa horien erantzule izan litezkeen transkripzio faktore (TF) zein miRNA bezalako elementu erregulatuak gaixotasunean asaldatuta egon litezkeela proposatzen dugu.

Hipotesi hau baieztatzeko, aurretiaz gure laborategian egindako bi adierazpen *microarray*-en emaitzak berraztertu ditugu. *Microrarray* horietan, pazienteen heste biopsiak aztertuz, gliadinaren epe luzeko zein laburreko esposizioek genoma osoaren adierazpenean duten eragina deskribatzen da (Castellanos-Rubio et al., 2008; Castellanos-Rubio et al., 2010). Lan honetan, koadierazpena ikertu dugu genoma osoan, eta modu koordinatuan antolatzen diren geneen moduluak identifikatu ditugu. Gainera, koadierazpenaren aldaketa hauen bultzatzaile izan daitezkeen elementu funtzionalak identifikatu ditugu. Azkenik, gure estrategia balioztatzeko, elementu erregulatuak horien alterazio funtzionalak identifikatzen saiatu gara gaixo eta kontrolen ehunetan zein *in vitro* eredu batean.

3. Ikerketaren muina

3.1 Glutenak koadierazpen aldaketak sortzen ditu eritasun zeliakoan

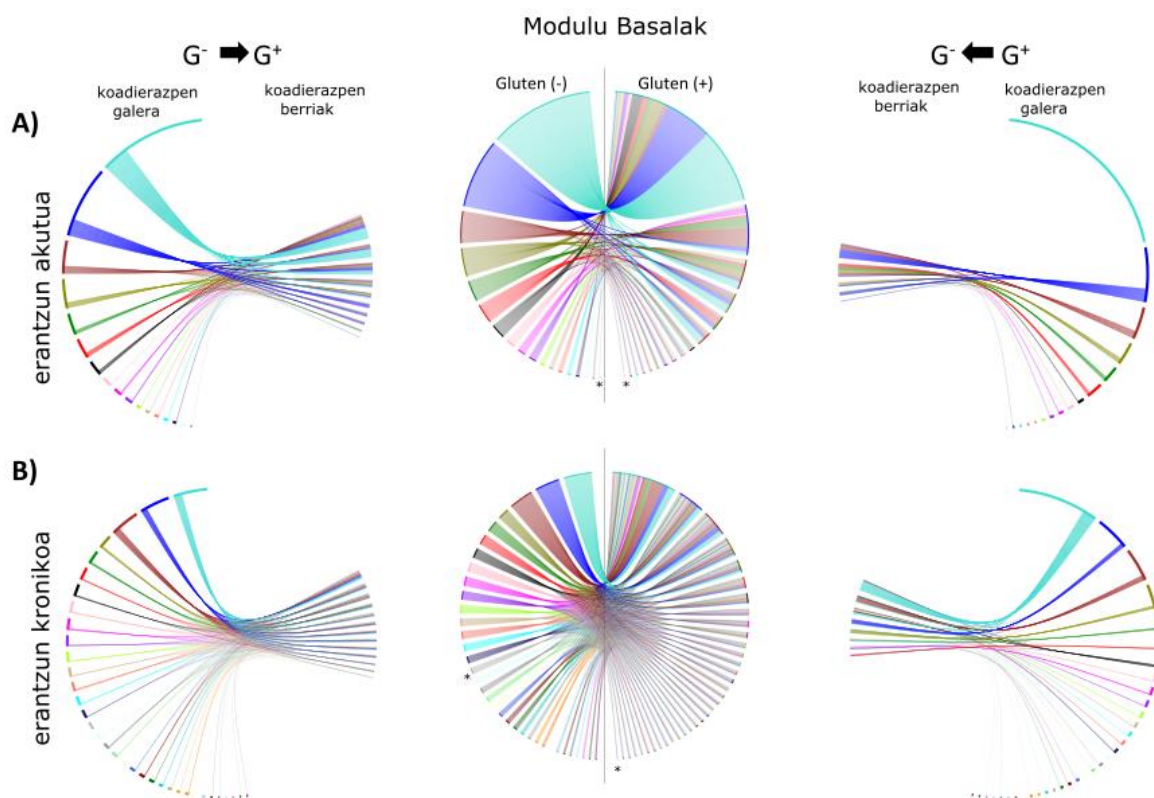
Glutenak koadierazpenean izan dezakeen eragin akutua eta kronikoa aztertzeko, aurretik gure laborategian egindako bi *microarray* esperimendu berraztertu dira; esperimendu haietan, erantzun akutua aztertzeko GGD tratamenduan zeuden pazienteen biopsiak gliadinarekin eta gliadina gabe inkubatu ziren 4 orduz, eta erantzun kronikoa aztertzeko, GGD tratamendupean eta tratamendurik gabeko gaixo aktiboen biopsiak behatu ziren (Castellanos-Rubio et al., 2008; Castellanos-Rubio et al., 2010).

Oraingo analisisian, esperimendu akutuen kasuan 18 koadierazpen talde, modulu izenez ezagutzen direnak, identifikatu dira GGD biopsietan, eta 16 gliadinarekin lau orduz tratatutako frakzioetan. Esperimendu kronikoaren kasuan, aldiz, 35 modulu ezberdin sortu dira bai GGD zein paziente aktiboen taldeetan (1. irudia).

Baldintza desberdinetako koadierazpen moduluak identifikatzeaz gain, gliadinaren ondoriozko koadierazpen aldaketak ere aztertu dira. Koadierazpen diferentziala erakusten zuten geneak (KDG) moduluko beste geneekiko harremanak modu esanguratsuan aldatzen dituztenak

dira. Zehazki, esperimentu akutuan, egoera basaleko geneen %21,71k koadierazpen aldaketak jasaten ditu, eta 4 orduz estimulatutako biopsien kasuan geneen %9,93k. Erantzun kronikoan, koadierazpen galera horrek GGD taldean gaixo aktiboen taldean baino gehiago eragiten du (%14,68 vs. %12,60). Baliteke behin gaixoen mukosa osatuta eratzten diren moduluak gaixo aktiboetan daudenak baino aldakorragoak izatea.

- 1. irudia. Genoma osoko koadierazpen moduluak gliadinaren aurkako erantzun A) akutuan eta B) kronikoan. Esperimentu bakoitzean, erdiko irudian egoera basaleko (glutenarekin -G⁺- edo gluten gabe -G⁻-) koadierazpen moduluak erakusten dira. Kolore bakoitzak modulu bat adierazten du eta izartxoak modulutan taldekatzen ez diren geneei dagozkie. Ezkerrean G⁻ egoeran glutena gehitzen denean moduluetatik ihes egiten duten geneak eta hauek egoera berrian sortzen dituzten moduluak adierazten dira (G⁻ → G⁺ trantsizioa). Eskuinean G⁺ → G⁻ trantsizioko ondorioak.**



3.2 Erregulatzaile hautagaien identifikazioa

Modulu bakoitzeko KDGekin miRNA eta transkripzio faktoreen aberaste-analisia burutu da koadierazpen aldaketen atzean egon daitezkeen elementu erregulatzaileak identifikatzeko. Aberaste-analisiak 9 miRNA eta 3 TF identifikatu ditu esperimentu akutuan, eta 37 miRNA eta 8 TF esperimentu kronikoan ($P < 0.05$). Identifikatutako zenbait erregulatzaile balioztapen esperimentalerako hautatu dira; batzuk aurretik inflamazio prozesuekin erlazionatutakoak, IRF1 (Guo et al., 2010) eta CREB1 (Wen et al., 2010) kasu. Beste batzuk eritasun zeliakoarekin erlazionatutako bidezidorrarekin asoziatu dira: Toll-like hartzaileen bidezidorrarekin hsa-miR-92a (Lai et al., 2013) eta hsa-let-7b-3p (Teng et al., 2013); NFκB bidezidorrarekin hsa-miR-33a (Kuo et al., 2013), hsa-miR-503 (Zhou et al., 2013), hsa-miR-18a-3p (Trenkmann et al., 2013), hsa-miR-26b (Zhao et al., 2014), hsa-miR-520e (Zhang et al., 2012) eta NFKB1 (Fernandez-Jimenez et al., 2014); lotura hertsiekin ELK1 (Al-Sadi et al., 2013); eta beste batzuk gaixotasunarekin asoziatutako geneekin, hsa-miR-655 (Kitamura et al., 2014) eta hsa-miR-520b (Yadav et al., 2008) esaterako. HOXA5 transkripzio faktorearen ituen aberaste nabarmena ere ikusi da bai esperimentu akutuko zein kronikoko zenbait modulutan.

3.2 Adierazpen aldaketak TF eta miRNA hautagaietan

Aukeratutako 9 miRNA hautagaien forma heldugabearen (pri-miRNA) adierazpena neurtu da gaixo aktibo eta kontrolen duodenoko biopsietan. Zazpi pri-miRNA (hsa-mir-33, hsa-mir-363, hsa-let-7b, hsa-mir-655, hsa-mir-26b, hsa-mir-520b eta hsa-mir-520e) modu esanguratsuan ($P < 0.05$) gutxiago adierazten dira gaixoetan, kontrolekin konparatuta.

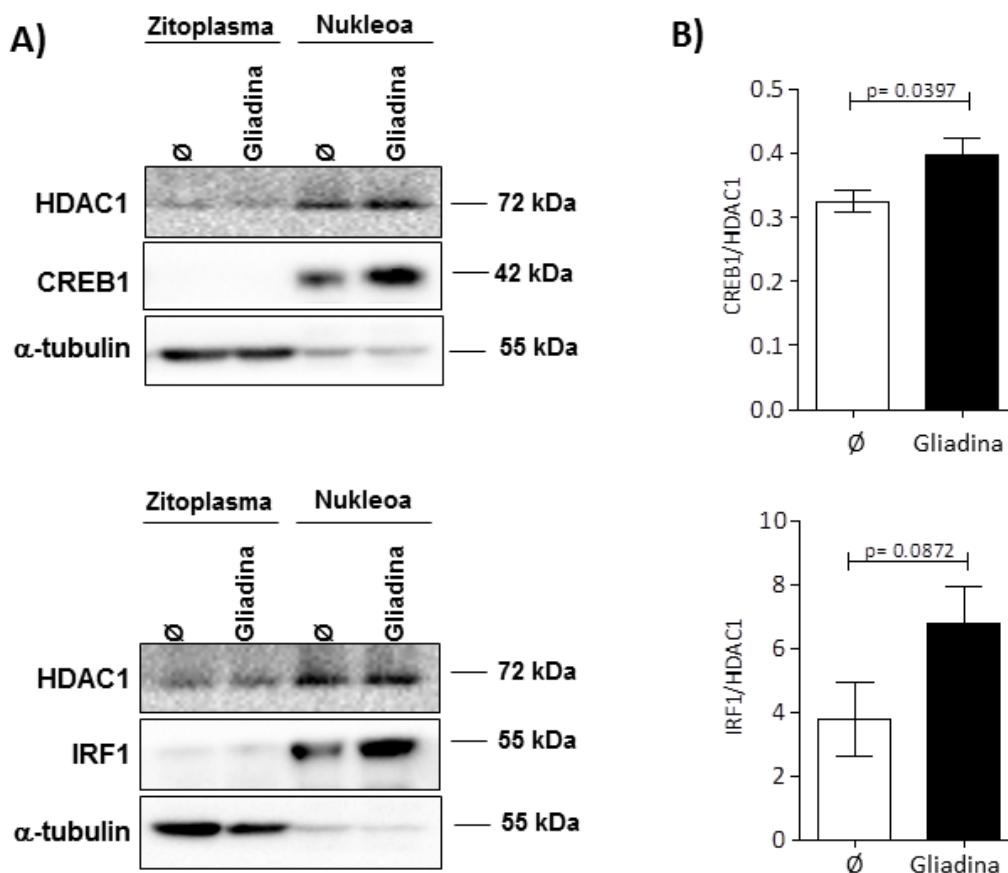
Zenbait miRNA eritasun zeliakoarekin aurretik erlazionatu badira ere (Capuano et al., 2011), lan honetan identifikatutako miRNA-k ez daude horien artean.

Bestetik, transkripzio faktore hautagaien adierazpen analisiak *IRF1*, *ELK1*, *NFKB1* eta *CREB1* gaixotasunean gain-adierazita ($P < 0.05$) daudela erakutsi du. Aurreko zenbait lanek *IRF1* eta *NFKB1* gaixotasunean asaldatuta daudela ikusi dute (Lahdenperä et al., 2011; Fernandez-Jimenez et al., 2014), baina oraingoa da gaixotasunean *CREB1*-en gain-adierazpena identifikatu den lehen aldia. Bestetik, *ELK1* garrantzitsua da hesteko irazkortasunaren emendatzean, gaixotasunean bereizgarria den ezaugarria (Jauregi-Miguel et al., 2014).

3.4 TF kandidatuak C2BBel lerro zelularrean

Transkripzio faktore aktibo batek eragin biologikoa izateko zelularen nukleoan sartu behar denez, adierazpen aldaketa erakutsi duten 4 TFen nukleorako translokazioa aztertu dugu gliadinarekin eta gliadina gabe tratatutako C2BBel lerro zelularrean. Gliadinarekin tratatutako zeluletako nukleoan, IRF1 eta CREB1 proteinen emendioa ikusi dugu (2. irudia), TF hauen aktibazioan gliadinaren inplikazioa iradokiz, baita eredu ez zeliakoetan ere.

2. irudia. IRF1 eta CREB1 transkripzio faktoreen translokazioa gliadinarekin/gabe kitzikatutako C2BBel zeluletan. A) TF-en translokazioa neurtzeko hiru Western blot esperimentu independente egin dira. B) Banden intentsitatea kuantifikatu eta HDAC1 kontrolarekiko normalizatu dira, batz bestekoa \pm SEM.



4. Ondorioak

Laburbilduz, mota honetako ikerketak gaixotasunetan garrantzitsuak diren elementu erregulatzaileak identifikatzeko erabilgarriak izan daitezkeela erakutsi dugu. Aztertutako hautagai gehienek adierazpen aldaketak dituzte gaixoen ehun ituan, eta horietako bik aktibazioa erakutsi dute gliadinarekin tratatutako C2BBel zeluletan (EZaren eredutzat aurretiaz erabilitako heste-zelulak). Esperimentu bioinformatikoen eta modu librean eskura daitezkeen genoma osoko datuen erabilgarritasuna azpimarratu nahiko genuke mekanismo berriak eta kandidatu terapeutikoak identifikatzeko orduan.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Identifikatutako elementu erregulatzaile guztietatik 9 miRNA eta 5 transkripzio faktore balioztatu dira esperimentalki. Etorkizunean elementu erregulatzaile gehiagoren balioztapenak egin nahi ditugu. Beste erregulazio mekanismo batzuk ere aztertu nahi ditugu, RNA luze ez-kodetzaileak (long non-coding RNA edo lncRNA) eta kromatinaren egoera kasu.

6. Erreferentziak

- Al-Sadi, R., et al. (2013), TNF- α modulation of intestinal epithelial tight junction barrier is regulated by ERK1/2 activation of Elk-1, *Am. J. Pathol.*, 183, 1871-84.
- Bondar, C., et al. (2014), THEMIS and PTPRK in celiac intestinal mucosa: coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge, *Eur. J. Hum. Genet.*, 22, 358-62.
- Capuano, M., et al. (2011), MicroRNA-449a overexpression, reduced NOTCH1 signals and scarce goblet cells characterize the small intestine of celiac patients, *PLoS One*, 6.
- Castellanos-Rubio, A., et al. (2008), Combined Functional and Positional Gene Information for the Identification of Susceptibility Variants in Celiac Disease, *Gastroenterology*, 134, 738-46.
- Castellanos-Rubio, A., et al. (2010), Long-term and acute effects of gliadin on small intestine of patients on potentially pathogenic networks in celiac disease, *Autoimmunity*, 43, 131-9.
- Dubois, P., et al. (2010), Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression, *Nat. Genet.*, 42, 295-302.
- Fernandez-Jimenez, N., et al. (2014), Coregulation and modulation of NF κ B-related genes in celiac disease: Uncovered aspects of gut mucosal inflammation, *Hum. Mol. Genet.*, 23, 1298-310.
- Garcia-Etxebarria, K., et al. (2016), Ancestry-based stratified analysis of ImmunoChip data identifies novel associations with celiac disease, *Eur. J. Hum. Genet.*, 1-4.
- Greco, L., et al. (2002), The first large population based twin study of coeliac disease, *Gut*, 50, 624-8.
- Green, P.H.R. eta Cellier, C. (2007), Celiac disease, *N. Engl. J. Med.*, 357, 1731-43.
- Guo, M., et al. (2010), Inhibition of IFN regulatory factor-1 down-regulate Th1 cell function in patients with acute coronary syndrome, *J. Clin. Immunol.*, 30, 241-52.
- Jauregi-Miguel, A., et al. (2014), Alteration of tight junction gene expression in celiac disease, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 58, 762-7.
- Kitamura, K., et al. (2014), MiR-134/487b/655 cluster regulates TGF- β -induced epithelial-mesenchymal transition and drug resistance to gefitinib by targeting MAGI2 in lung adenocarcinoma cells, *Mol. Cancer Ther.*, 13, 444-53.
- Kuo, P.L., et al. (2013), MicroRNA-33a functions as a bone metastasis suppressor in lung cancer by targeting parathyroid hormone related protein, *Biochim. Biophys. Acta.*, 1830, 3756-66.
- Lahdenperä, A., et al. (2011), The effect of gluten-free diet on Th1-Th2-Th3-associated intestinal immune responses in celiac disease, *Scand. J. Gastroenterol.*, 46, 538-49.
- Lai, L., et al. (2013), MicroRNA-92a negatively regulates toll-like receptor (TLR)-triggered inflammatory response in macrophages by targeting MKK4 kinase, *J. Biol. Chem.*, 288, 7956-67.
- Plaza-Izurieta, L., et al. (2015), Expression analysis in intestinal mucosa reveals complex relations among genes under the association peaks in celiac disease, *Eur. J. Hum. Genet.*, 1-6.
- Teng, G.G., et al. (2013), Let-7b Is Involved in the Inflammation and Immune Responses Associated with Helicobacter pylori Infection by Targeting Toll-Like Receptor 4, *PLoS One*, 8.

- Trenkmann, M., et al. (2013), Tumor necrosis factor α -induced microRNA-18a activates rheumatoid arthritis synovial fibroblasts through a feedback loop in NF- κ B signaling, *Arthritis Rheum.*, 65, 916-27.
- Trynka, G., et al. (2011), Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease, *Nat. Genet.*, 43, 1193-201.
- van Heel, D.A., et al. (2007), A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21, *Nat. Genet.*, 39, 827-9.
- Wen, A.Y., et al. (2010), The Role of the Transcription Factor CREB in Immune Function, *J. Immunol.*, 185, 6413-9.
- Yadav, D., et al. (2008), Cutting Edge: Down-Regulation of MHC Class I-Related Chain A on Tumor Cells by IFN- γ -Induced MicroRNA, *J. Immunol.*, 182, 39-43.
- Zhang, S., et al. (2012), MicroRNA-520e suppresses growth of hepatoma cells by targeting the NF- κ B-inducing kinase (NIK), *Oncogene*, 31, 3607-20.
- Zhao, N., et al. (2014), MicroRNA-26b suppresses the NF- κ B signaling and enhances the chemosensitivity of hepatocellular carcinoma cells by targeting TAK1 and TAB3, *Mol. Cancer*, 13, 35.
- Zhou, R., et al. (2013), Histone Deacetylases and NF- κ B Signaling Coordinate Expression of CX3CL1 in Epithelial Cells in Response to Microbial Challenge by Suppressing miR-424 and miR-503, *PLoS One*, 8.

7. Eskerrak eta oharra

- Ikerketa hau ISCIII (PI13/01201) ikerketa proiektuaren bitartez finantzatu da.
- Lan honen parte bat tesi egonaldiaren ondorioa izan da, eta nazioarteko kongresu batetik (ESHG, 2016) eta kongresu nazional batetik (SEEC, 2016) eratorria da.
- Egileek SGikerrek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, EGEF eta EGIF) emandako laguntza tekniko eta gizatiarra eskertzen dute.