



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

I. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2015eko maiatzaren 13, 14 eta 15
Durango, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUNA

**Lotura hertsien gene
adierazpenaren alterazioa eritasun
zeliakoan**

*A. Jauregi-Miguel, L. Plaza-Izurieta,
N. Fernandez-Jimenez, I. Romero-
Garmendia eta J. R. Bilbao*

745-750 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.103>

ANTOLATZAILEA:



udako
euskal unibertsitatea

BABESLEAK:



EUSKO JAURLARITZA
GOBIERNO VASCO



Bizkaiko Foru Aldundia
Diputacion Foral de Bizkaia

eman ta zabal zaku



UPV EHU

LAGUNTZAILEAK:



Universidad de Deusto
Deustuko Unibertsitatea



MONDRAGON
UNIBERTSITATEA



UDALBILTZA



Universidad
Pública de Navarra
Nafarroako
Unibertsitatea Publikoa

Lotura hertsien gene adierazpenaren alterazioa eritasun zeliakoan

Jauregi-Miguel A.¹, Plaza-Izurieta L.¹, Fernandez-Jimenez N.¹, Romero-Garmendia I.¹ eta Bilbao J.R.¹

¹*Immunogenetika laborategia, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia*

amaia.jauregim@ehu.eus

Laburpena

Eritasun zeliakoan (CD), heste epitelioko zelularteko loturak kaltetuak agertzen dira eta honen ondorioz, gaixoek gliadinarekiko iragazkortasuna emendatua aurkezten dute. Ikerketa honen helburua, zelularteko lotura hertsiek (TJ) eritasun zeliakoan jasaten duten kaltea karakterizatzea da. Horretarako, alde batetik, gaixoen eta kontrolen heste meheko biopsietan TJ gene hautagaien adierazpen analisiak egin dira eta bestetik, heste epitelioko C2BBE1 modelo zelularrean gliadinak TJ egituren eraketan duen eragina ikertu da. Lortutako emaitzek, patogenesia TJ bidezidorraren desregulazio orokorra dagoela egiaztatzen dute eta tratamenduan ikusitako normalizazioak prozesuaren itzulgarritasuna baieztatzen du. Gainera, gliadinak TJ egituren eraketak ekiditen dituela eta C2BBE1 monogerruzen osotasuna kaltetzen duela ikusi da. Analisi genetiko eta funtzional gehiago beharrezkoak dira hau guztia egiaztatzeko.

Hitz gakoak: Eritasun zeliakoa; Lotura hertsia; Adierazpen analisiak; Modelo zelularra

Abstract

In celiac disease (CD), cell junctions of the intestinal epithelial are disrupted, leading to an augmented permeability to gliadin. The aim of the present study was to characterize the deregulation of epithelial tight junction (TJ) genes in CD. For that, we performed expression analyses of tight junction candidate genes in biopsies from patients and non-celiac controls. We also studied the effect of gliadin in the formation of the tight junction structures in C2BBE1 intestinal epithelial cell model. Our results confirm a general deregulation of the TJ network in CD and its normalization after gluten free diet confirmed the reversibility of the process. Moreover, we observed that gliadin inhibits TJ structures formation, leading to a disruption of the C2BBE1 monolayer integrity. Further genetic and functional analyses are necessary to confirm these findings.

Keywords: Celiac disease; Tight junctions; Expression analyses; Cell model

1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (CD), gariaren glutenarekiko zein zekale eta garagarrean agertzen diren antzeko proteinekiko intolerantziaren eraginez garatzen den enteropatia autoimmune eta kronikoa da. Glutenean dagoen gliadina proteinak, genetikoki suszeptibleak diren pertsonetan gehiegizko erantzun immunologikoa sortzen du, hesteetako mukosan lesioak eraginez. Honen ondorioz, elikagai gehien xurgatzea nabarmen murrizten da eta gaixoek besteak beste, pisu galera, anemia, beharrezkoak eta masa muskularraren gutxitzea jasaten dute. Populazioan %1eko maiztasuna du eta egun, tratamendu eraginkor bakarria biziarteko glutenik gabeko dieta hertsia da.

Eritasun konplexua da zeliakia, ingurune-faktoreek eta faktore-genetikoek parte hartzen dutelarik. Arrisku genetikoaren parterik handiena Giza Antigeno Leukozitarioaren (HLA) zenbait aleloek ematen duten arren, hauen ekarpena ez da nahikoa eritasunaren garapena azaltzeko, gaixotasunaren osagarri genetikoaren %40a inguru azaltzen dutela estimatu baita (Houlston R.S. et al., 1996). Azken urteotan, eragin txikiagoa duten baina patogenia garatzeko beharrezkoak diren beste hainbat arrisku ebidentziatu dira, gehienak erantzun immunologikoarekin lotuak (Trynka G. et al., 2011). Dena den, eritasun zeliakoaren patroia oraindik ezezaguna da eta heste mukosaren suntsipenean eragina duten gertaera sekundarioen

funtzionamendua eta ekarpena azaltzeko dago. Patogenia hobeto ulertzeko egin diren analisi funtzionalek, sistema immunearen parte hartzeaz gain, beste bidezidor biologikoen eragina ere azpimarratu dute, besteak beste zelularteko loturak (Castellanos-Rubio A. et al., 2010).

Zelularteko loturek gure ehunen osotasuna mantentzen laguntzen dute. Egitura apikalenak, lotura hertsiek (TJ), zelulen artean gerriko estu eta jarrai bat eratzen dute, eta haien bidez, zelularteko fluxua kontrolatzen da, kanpo ingurunearekiko langa selektibo gisa jokatzuz (Tsukita S. et al., 2001). CD gaixoen lotura hertsien morfologia eraldatua eta hesteetako iragazkortasuna emendatua aurkezten dute, gliadinaren zelularteko fluxu libre baimenduz eta immune sistemaren gehiegizko erantzuna areagotuz (Schulzke J.D. et al., 1998 eta Ménard S., et al., 2012). Disfuntzio honek oinarri genetikoa duela iradoki da, alde batetik gaixotasun goiztiarrean agertzen delako eta bestetik, glutenik gabeko dieta jarraitzen duten gaixo asintomatikoetan kalteak mantentzen direlako (Bjarnason I, 1984 eta Bjarnason I, 1985). Honen bidez, TJ bidezidorrarekin erlazionatuta dauden geneak gaixotasunaren suszeptibilitaterako hautagai potentzialak direla ondorioztatzen da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Lotura hertsiek CD patogenesisian funtsezko papera dutela iradoki den arren, gutxi asko dakigu egitura hauetan parte hartzen duten proteinen elkarrekintza funtzionalari eta biokimikoari buruz. TJ bidezidorraren harira egindako ikerketek, ebidentzia berriak azalerratu dituzte. Eritasunean aurkitutako asoziazio genetikoek eta TJ morfologiaren eraldaketa sakonek, TJ egiturek barrera epitelialaren suntsipenean funtsezko papera dutela iradokitzen dute (Ciccocioppo R. et al., 2006 eta Wapenaar M.C. et al., 2008). Aurrerapen ugari egin diren arren, egun ez dakigu egitura hauekin loturiko genetikak gaixotasunean duen ekarpena eta analisi genetiko eta funtzional gehiago beharrezkoak dira irudi orokorra ulertzeko.

Ikerketa honen helburua, eritasun zeliakoan TJ bidezidorrean egon daitezkeen desregulazioak karakterizatzea da. Horretarako bidezidor honetan parte hartzen duten gene hautagai sorta baten adierazpen analisia egin da eta aldaera hauen itzulgarritasuna aztertu da. Bestetik, gliadinak zelularteko loturen egiturak apurtzeko duen gaitasuna neurtu da in vitro, heste epitelioko C2Bee1 modelo zelularra erabiliz.

3. Ikerketaren muina

3.1 Lotura hertsiko geneen adierazpen analisia heste mukosan

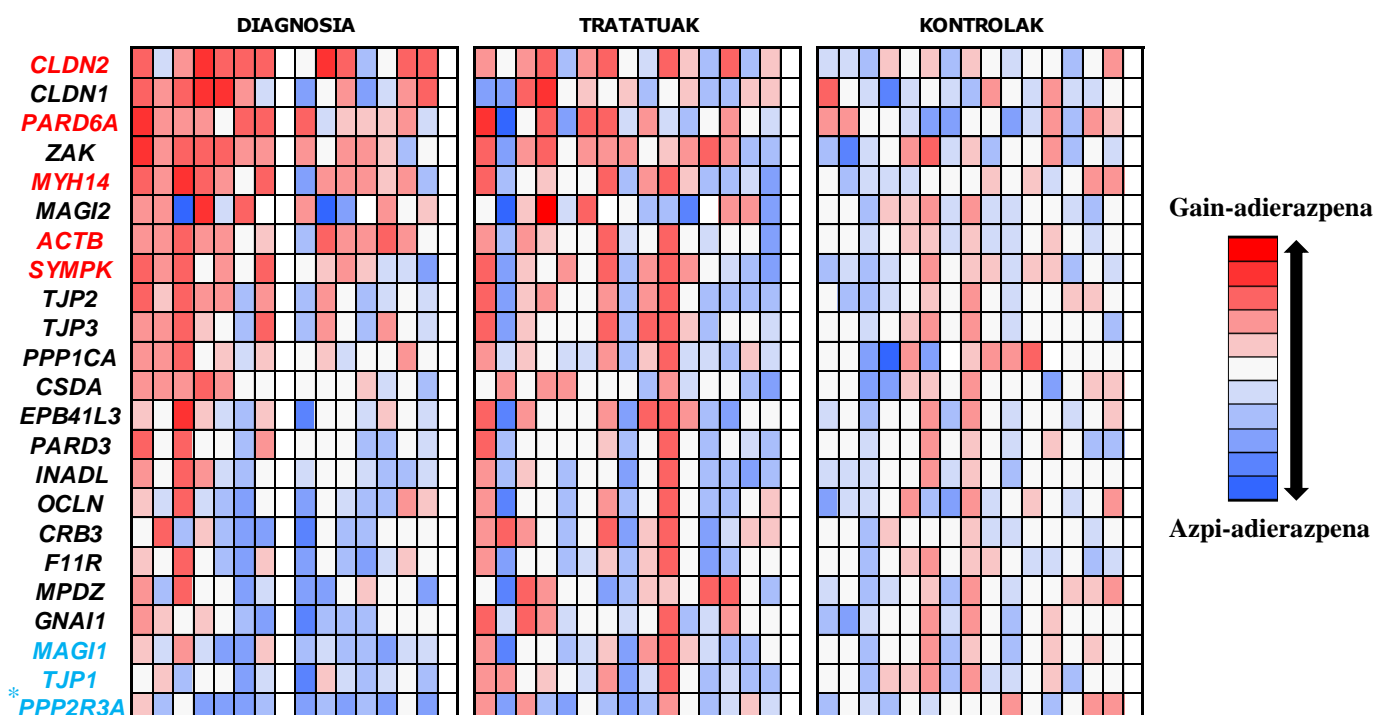
Adierazpen analisirako, bibliografian oinarriturik TJ bidezidorrean parte hartzen duten 23 gene hautatu ziren eta 16 zeliakoen (bi egoera ezberdinetan; diagnosian eta gutxienez 2 urtez glutenik gabeko dieta bat jarraitu ostean) eta 16 ez gaixoen duodenoko biopsietan gene hauen adierazpena aztertu zen (1. Irudia).

Aldaera esangarriak aurkitu ziren gaixotasun aktiboan, kontrolen adierazpen mailarekiko 5 gene gain-adierazita eta beste 3 azpi-adierazita zeudelarik (1. Irudia). Aldaera hauetako batzuk beste populazio batzuetan ere identifikatuak izan dira (Pizzuti D. et al, 2004 eta Szaka I D.N. et al, 2010). Aldiz, dietatik glutena ezabatu ondoren, gene guzti hauen adierazpenak, *PPP2R3A*-rena izan ezik, kontrolen mailara itzuli ziren. Honek, aldaera gehiengoak patogeniaren ondorio direla adierazten du, behin antigenoaren efektua ezabatzean normaltasunera itzultzen direlarik. *PPP2R3A*-ren ixilarazpena berriz, tratamenduan zeuden gaixoen biopsietan mantendu egin zen, aldaera konstitutiboa izan daitekeela iradokiz. Hala ere, orain artean egindako asoziazio ikerketetan ez da ikusi gene hau zeliakiarekiko asoziatuta dagoenik eta ikerketa genetiko eta funtzional gehiago egin beharko lirakeke zeliakiaren suszeptibilitate genetikoan inplikaturako dagoela baieztatzeko.

Adierazpen aldaerak aurkeztu zituzten geneen funtzioak aztertzean, funtzio ezberdineko proteinak transkribatzen dituztela ikusi zen, bai elean parte hartzen dutenak, baita seinalizazio osagarrietan inplikaturakoak ere, besteak beste, zelulen polarizazioan eta proliferazioan. Beraz, bidezidorrean orokorrean eragiten duten aldaerak dira.

Gene hautagaien arteko koadierazpen analisiak ere egin ziren, behatutako aldaerek gene arteko elkarrekintzetan eragina zuten egiaztatzeko. Gaixotasun aktiboan, hainbat geneek, beste geneekiko zituzten elkarrekintza gehienak galdu egiten zituzten, tratatuetan eta kontroletan aurkeztutako koadierazpen patroia galduz (Jauregi-Miguel A. et al., 2014). Honek guztiak glutenaren irenketak TJ bidezidorraren desregulazioa eta desantolaketa eragiten duela isladatzen du.

1. irudia. Lotura hertsiekin loturiko gene hautagaien adierazpena



Lotura hertsiekin erlazonaturiko 23 geneen adierazpena 16 CD gaixoen (diagnosian eta gutxienez bi urtez glutenik gabeko dietaren ostean), eta 16 heste hanturarik gabeko kontroletan. Zutabeek pazienteetatik hartutako laginak adierazten dituzte. Gorritik urdinerako eskalak gene ezberdinen gain-/azpi-adierazpen gradientea adierazten du. Diagnosian adierazpen esangarria ($p < 0.05$) zuten geneen izenak koloreztatuta agertzen dira, gorritz gain-adieraziak eta urdinez azpi-adieraziak. Asteriskoak, tratamenduan ere adierazpena esangarriki aldatuta agertzen zela adierazten du.

3.2 Gliadinaren kitzikapena C2BBe1 heste epitelioko monogeruzetan

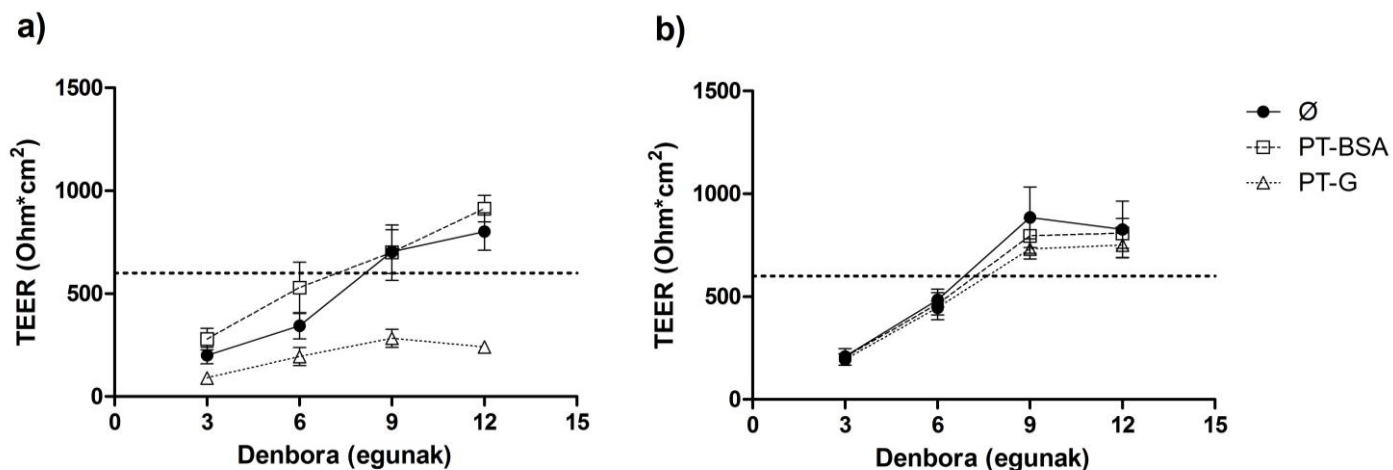
Eritasun zeliakoan, gliadinak eta beste hainbat ingurune-faktoreek (patogeno bakteriano inbasiboak adibidez) TJ osagaietan eraldaketak sor ditzakete, heste epitelioko osotasuna kaltetuz. Mekanismoa ez da oraindik ondo ezagutzen eta hau argitzeko ikerketa funtzionalak egitea beharrezkoa da.

Modelo zelularrak, asoziatutako gene hautagaien inplikazio funtzionala ikertzeko tresna oso erabiliak dira. C2BBel zelulak, koloneko minbizi batetik eratorritako giza zelulak dira eta hauen kulturek giza hesteko epitelioaren ezaugarri morfologiko eta biokimiko antzekoak aurkezten dituzte. Zelula kulturak filtro baten gainean hazten direnean, diferentziatu egiten dira eta heste epitelioaren antzera, zelulen artean TJ egiturak eratu eta monogeruzak sortzen dituzte. Egitura hauen osotasuna kuantifikatzeko, monogeruzaren erresistentzia elektriko transeptelialaren (TEER) neurketa oso erabilia da. TEER balioaren hazkundeak monogeruza zelularren konfluentzia azkarra adierazten du eta C2BBel zelulen kasuan, monogeruza $600\text{ohm}\cdot\text{cm}^2$ balioan eratzen dute.

Ikerketa honetan, patogenian ematen den lotura hertsien suntsiketa hobeto ulertzeko asmotan, C2BBel modelo zelularrean gliadinak TJ egituren eraketan duen eragina aztertu zen. Horretarako, zelulak filtrodun intsertoetan erein eta bi asteetan zehar tripsinaz eta pepsinaz digeritutako gliadinaz (PT-G) eta BSA-z (PT-BSA, kontrol negatiboa) kitzikatu ziren. Kitzikapena bi egoera ezberdinetan egin zen; a) zelulak hasieratik kitzikatu ziren, hots, ereinketa momentutik eta b) zelulak TJ egiturak eratu eta monogeruza sortu zuten momentutik kitzikatu ziren ($\text{TEER} > 600\text{ohm}\cdot\text{cm}^2$) (2. Irudia).

Lehenengo esperimentuan, kontrolak (kitzikapenik gabeko zelulak) eta kontrol negatiboak (PT-BSA) 9. egunerako monogeruza sortzea lortu zuten bitartean, gliadinaz kitzikatutako zelulek (PT-G) esperimentu osoan zehar TEER balore baxuak mantendu zituzten, monogeruza sortzeko gai ez zirela adieraziz. 2. Esperimentuan aldiz, zelulek monogeruza sortu eta hurrengo egunetan zehar TEER baloreak mugaren gainetik egonkor mantendu ziren. Honek guztiak, gliadinak TJ egituren eraketa guztiz hondatzen duela iradokitzen du, monogeruzen osotasuna erabat kaltetuz. Kalte hau aldiz ez da baieztatu monogeruzak behin sortuak daudenean.

2. irudia. C2BBel zelulen kitzikapena



C2BBel zelulek lortutako TEER balioak denboran zehar, 3 egoera ezberdinetan: kitzikatu gabe hazitakoak (Kontrolak), pepsinaz eta tripsinaz digeritutako BSAz kitzikatuak (PT-BSA) eta pepsinaz eta tripsinaz digeritutako gliadinaz kitzikatuak (PT-G). Kitzikapenaren hasiera bi momentu ezberdinetan egin zen, a) ereinketa momentuan, b) behin monogeruza eratuta zegoenean. Marra ez jarraiak, monogeruza eratuta egoteko zelulek adierazi behar duten TEER balore minimoa markatzen du. Errore barrek batuz bestekoaren errore tipikoa adierazten dute.

4. Ondorioak

Eritasun zeliakoan, gliadinaren irenketak gehiegizko erantzun immunea pizten du eta ondorioz, heste meheko ehunean kalteak sortzen dira. Beste prozesu biologikoen eta genetikoen inplikazioa adierazten duten geroz eta ebidentzia gehiago daude, besteak beste, heste epitelioaren iragazkortasun aldatua. Prozesu honetan lotura hertsiek funtsezko papera dutela iradoki da baina funtzionamendua oraindik ez da ezaguna. Gure emaitzek, TJ egituren disfuntzioan bitartekari diren prozesu zelularrak eta molekularrak ezagutzeko informazio berria argitaratzen dute, patogeniaren garapenean eragina izan dezaketen hainbat faktore nabarmenduz.

Alde batetik, lotura hertsietan parte hartzen duten geneek heste epitelioaren sunsaketan inplikaturik daudela ikusi dugu. Gene hautagai batzuen gain-/azpi-adierazpenak eta koadierazpen patroiaren alterazioak mekanismo erregulatuak komun bat dagoela eta hau gaixotasun aktiboan aldatuta eta kaltetuta dagoela adierazten dute. Alterazio gehienak, glutenik gabeko dieta baten ostean normalizatu egiten dira, prozesuaren itzulgarritasuna baieztatuz. Hala ere, *PPP2R3A* genearen ixilarazpen konstitutiboak, gaixotasunean TJ bidezidorrak jasaten dituen kalteak oinarri genetikoa ere baduela iradokitzen du.

Bestalde, modelo zelularrean egindako esperimenduek, gliadinak lotura hertsien eraketa zapuzten duela baieztatu dute, barrera epitelialaren osotasuna erabat kaltetuz. Hala ere, gliadinak TJ egituretan duen eragina zehazteko analisi funtzional sakonagoak beharrezkoak dira.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa honetan, TJ bidezidorra eritasun zeliakoan kaltetuta dagoela eta kalte honetan gliadinak funtsezko papera duela ikusi dugu. Dena den, aurkitutako alterazioak mRNA adierazpenaren mailakoak dira eta ez dute zertan proteina mailan gertatzen ari dena islatu behar. Beraz, hurrengo pausua, aldaera hauek barrera epitelialaren sunsipenean duten ekarpena zehaztea da. Horretarako proteina mailako analisi funtzionalak beharrezkoak dira, bai zelula kulturetan baita heste ehunetan ere.

Horretaz gain, asoziazio azterketen bidez *PPP2R3A* genea suszeptibilitate genetikoa inplikaturik dagoela baieztatu beharko litzateke, eta ondoren analisi funtzionalen bidez patogeniaren garapenean funtsezko funtziorik duen frogatu.

6. Erreferentziak

SEEC (2014): "La expresión de los genes tight junction en las monocapas celulares del epitelio intestinal". Congreso Nacional de la Enfermedad Celíaca, Ahozko komunikazioa, Valentzia..

Bjarnason I. eta Peters TJ. (1984): "In vitro determination of small intestinal permeability: demonstration of a persistent defect in patients with coeliac disease." *Gut* 1984;25:145–50.

Bjarnason I., Marsh M.N., et al. (1985): "Intestinal permeability in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis". *Gut* 1985;26:1214–9

Castellanos-Rubio A., Santin I., et al. (2010): "Long-term and acute effects of gliadin on small intestine of patients on potentially pathogenic networks in celiac disease". *Autoimmunity* 2010;43:131–9.

Ciccocioppo R, Finamore A, et al. (2006). "Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease". *Am J Clin Pathol* 2006;125:502–11.

Houlston, RS. eta Ford D. (1996): "Genetics of coeliac disease". *QJM* 1996;89:737–43.

Jauregi-Miguel A, Fernandez-Jimenez N, et al. (2014). "Alteration of tight junction gene expression in celiac disease." *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014 Jun;58(6):762-7.

- Ménard S., Lebreton C. et al. (2012): “Paracellular versus transcellular intestinal permeability to gliadin peptides in active celiac disease” *Am J Pathol.* 2012 Feb;180(2):608-15.
- Pizzuti D, Bortolami M, et al. “Transcriptional downregulation of tight junction prote in ZO-1 in active coeliac disease is reversed after a gluten-free diet.” *Dig Liver Dis* 2004;36:337–41.
- Schulzke JD, Bentzel CJ, et al. (1998): “Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue”. *Pediatr Res* 1998;43:435–41.
- Szaka’l DN, Gyorffy H, et al. (2010). “Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease.” *Virchows Arch* 2010;456:245–50.
- Trynka G., Hunt K.A., et al. (2011): “Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease”. *Nat Genet* 2011;43:1193–201.
- Tsukita S, Furuse M, et al. (2001): “Multifunctional strands in tight junctions.”. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:285–93.
- Wapenaar MC., Monsuur AJ., et al. (2008): “Associations with tight junction genes PARD3 and MAGI2 in Dutch patients point to a common barrier defect for coeliac disease and ulcerative colitis” *Gut.* 2008 Apr;57(4):463-7.

7. Eskerrak eta oharrak

Lan hau nazioarteko artikulu batetik (Jauregi-Miguel A. et al., 2014) eta kongresu nazional batetik (SEEC, 2014) eratorria da. Ikerketa hau ISCIII (PI10/310) ikerketa proiektuaren bitartez finantzatu zen. Egileek SGikerrek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, EGEF eta EGIF) emandako laguntza teknikoa eta gizatiarra eskertzen dute.