



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

**Toll-like hartzaileen bidezidorraren
adierazpen analisia eritasun
zeliakoan,**

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

796-800 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.i.111>

ANTOLATZAILEA:



BABESLEAK:



eman ta zabal zazu



LAGUNTZAILEAK:



Toll-like hartzaileen bidezidorraren adierazpen analisia eritasun zeliakoan

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

¹*Immunogenetika laborategia, Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalia Fisiologia Saila, Euskal Herriko Unibertsitatea, Leioa, Euskal Herria, Espainia
irati.romero@ehu.eus*

Laburpena

Eritasun zeliakoa (CD) glutenaren eraginez genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan ematen den gaixotasun autoimmunea da. Toll-like hartzaileek (TLR) inflamazio autoimmunea emateko beharrezko elementuak aktibatzen dituzte. Ikerketa honetan TLR bidezidorraren adierazpen azterketa egin da eritasun zeliakoan. Gaixotasun aktiboan bidezidorra aldatuta ikusi da, eta bidezidorrean zehar aurkitutako alterazio maila ezberdina dela eta, hau hartzaileetatik ur-behera dagoela iradokitzen da.

Hitz gakoak: Toll-like hartzailea, TLR, eritasun zeliakoa

Abstract

Celiac disease (CD) is an autoimmune disease that develops in genetically susceptible individuals due to ingested gluten. Toll-like receptors (TLR) activate essential components necessary to develop an autoimmune inflammation. In this study the expression of the TLR pathway has been analyzed in celiac disease. Untreated patients showed an altered pattern, and different degrees of alteration among the pathway suggest a probable alteration downstream of the receptors.

Keywords: Toll-like receptor, TLR, celiac disease

1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (CD, MIM: 212750) %leko maiztasuna duen gaixotasun kroniko eta autoimmunea da, genetikoki suszeptibleak diren indibiduoetan ematen dena gariaren glutenaren eta zekale eta garagarraren beste proteina batzuen intolerantzia dela eta. Heste meharraren endekatzea eragiten du, linfzito intraepitelialen infiltrazioa, kripten hiperplasia eta biloxken atrofia sortuz. Gainera, zenbait autoantigorputzen agerpena ere ematen da, anti-endomisio (EMA) edo anti-transglutaminasa (TGA) antigorputzena esaterako (Green eta Cellier, 2007).

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

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Gaixotasun zeliakoa suszeptibilitate genetikoa duten pertsonak dietako glutenaren proteinekin kontaktua dutenean ematen da. Hesteko proteasek ezin dituzte glutenaren proteinak guztiz endekatu, eta gliadina peptidoak lumenean geratzen dira. Glutenaren peptidoek epitelioa zeharkatzen dute eta transglutaminasak deamidatu egiten ditu HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 molekulentzat afinitatea handituz. Horrela, sistema immune adaptatiboan, glutenarekiko espezifikoak diren CD4+ T zelulen proliferazioa estimulatzen da inflamazioa sustatzen duten zitokinak ekoiztuz eta B zelulen hedatzea eraginez. Bestalde, gliadina peptidoek erantzun immune innatoa ere aktibatzen dute *MICA* genearen gainadierazpena indusituz hesteko epitelioan. Linfzito intraepitelialetan, aldiz, *MICA*-ren hartzailea den *NKG2D*-ren aktibazioa sustatzen da, zitotoxitate antigeno-espezifikoa bultzatuz (Green eta Cellier, 2007).

Bestetik, Toll-like hartzaileak (TLR) inflamazio autoimmunea emateko beharrezkoak diren immunitate innatoaren eta T zelulen aktibazioaren ezinbesteko elementuak dira (Mills, 2011). Hartzaile hauek patogenoak ezagutu eta seinalizazio intrazelularra aktibazten dute sistema immune innatoko zeluletan eta T zeluletan, horrela zitokinen ekoizpena bultzatuz. Hartzaile hauek seinalizazio intrazelularra aktibatzeke duten gaitasuna ikusirik eta gaixotasun zeliakoaren patogenezian immunitate

innatoak duen garrantzia dela eta, gliadina TLR baten ligando zuzena izan litekeela proposatu da (Palová-Jelínková et al., 2013). Hori dela eta, TLR bidezidorra osatzen duten geneak eritasun zeliakoa pairatzeko kandidatu funtzionaltzat kontsideratu beharko lirake. Gainera, gliadina TLR baten ligando zuzena dela testatuko balitz, eritasun zeliakoaren zein beste gaixotasun batzuen patogenesiaren ulermenean eragin positiboa emango litzateke. Azterketa hau, eritasun zeliakoan TLR bidezidorra aztertzen duen lehen ikerketa sistematikoa, datozen ikerketetarako funtsezko oinarria da.

Ikerketa honetan TLR bidezidorrean egon daitezken desregulazioak karakterizatu nahi izan dira bidezidorra osatzen duten geneen adierazpen analisi baten bidez.

3. Ikerketaren muina

28 gene kandidaturen adierazpena aztertu da 16 gaixo aktiboren biopsietan, glutenik gabeko dieta daramaten 16 pazienteren biopsietan eta zeliakoak ez diren 15 kontrolen biopsietan. Datuak aurretik gure laborategian aztertutako beste 23 geneen emaitzekin bateratu dira guztira 51 gene kandidaturen adierazpen analisia burutuz.

3.1 Zenbait zitokinen ekoizpenaren emendatzea

IFN- γ zitokina proinflamatorioa da, erantzun immune innatoko zelulak segituan aktibatzen dituena. Ikerketa honetan zitokina hau adierazgarriki gain-adierazten da gaixotasuna aktibo duten pazienteetan, tratamendua jarraitzen dutenek kontrolek duten adierazpen maila berreskuratzen dutelarik (1. irudia). Beraz, gaixo aktiboetako *IFNG* mRNA maila altua bat dator gaixotasunaren prozesu inflamatorioarekin (Forsberg et al., 2007).

IL-6 zitokina proinflamatorioa ere gain-adierazita ikusi da tratamendua jasotzen ez duten gaixoetan (1. irudia). Toll-like hartzaileek molekula patogenoak ezagutzen dituztenean T zelulek eta makrofagoek interleukina hau kanporatzen dute erantzun immunea estimulatu dadin. Zenbait gaixotasunetan prozesu autoimmune bat garatzen du.

Zitokina proinflamatorioen gain-adierazpena ikusi bada ere, ikerketa honetan anti-inflamatorioa den *IL10* genearen gain-adierazpena ere ikusi da gaixo aktiboetan (1. irudia). Azken hau ezinbestekoa da sistema immunearen erregulazioan. Honek gaixoetan hantura neutralizatzeko saiakera bat adierazi lezake, inflamazioaren aurrean nahikoa indar ez duen saiakera bat (Forsberg et al., 2007).

3.2 Kemokinen gainadierazpena

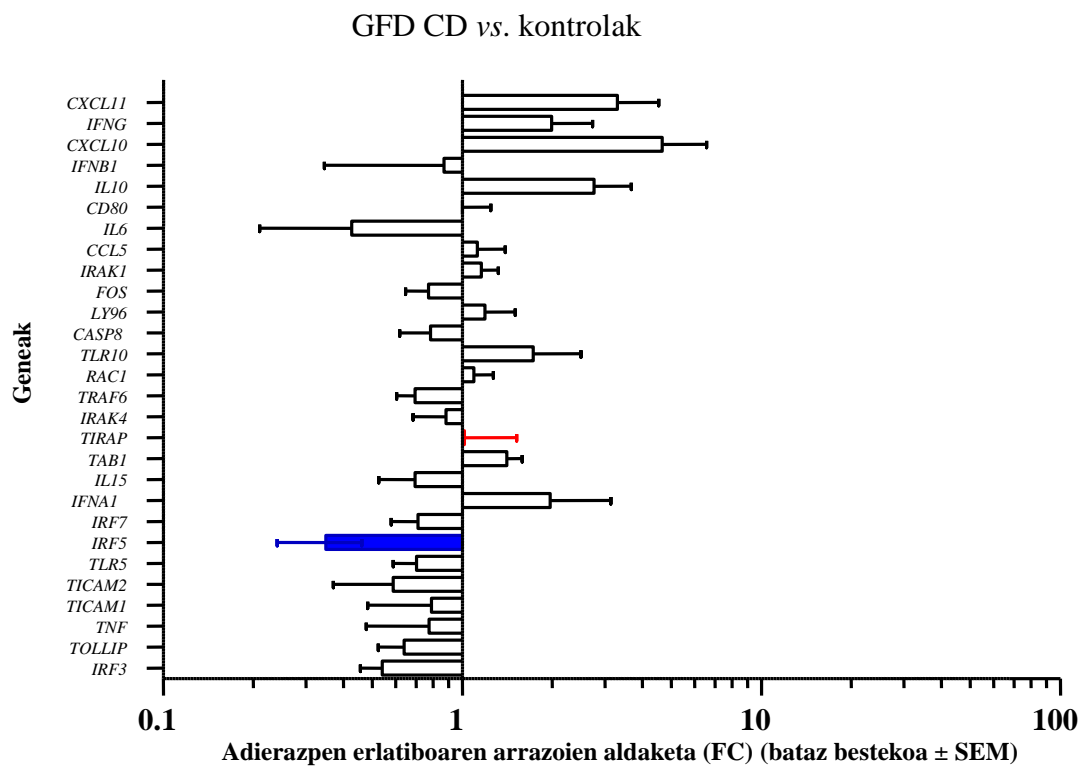
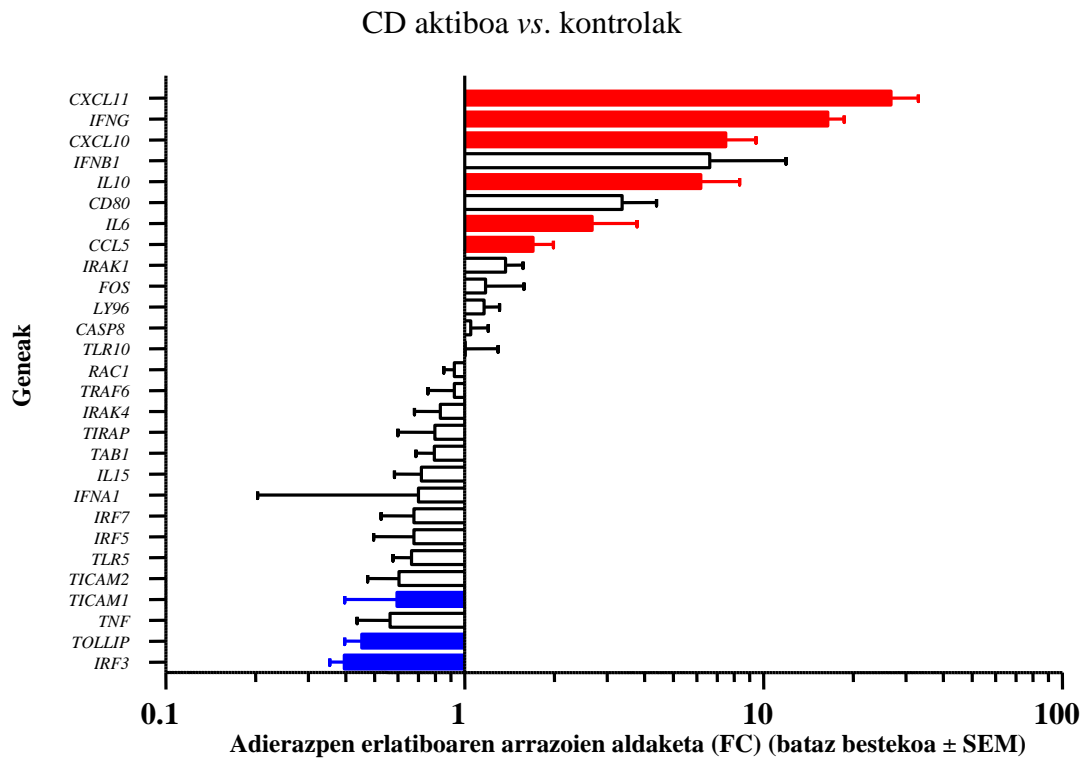
Ikerketa honetan aztertutako kemokinetan (*CXCL11*, *CXCL10*, *CCL5*) gain-adierazpena ikusi da gaixo aktiboetan, tratatutako gaixoetan kontroletan ematen diren adierazpen maila antzekoak lortzen diren bitartean (1. irudia). Honek kemokina hauek gaixotasunean ematen den hantura prozesuan eta sistema immuneko zelulen erakarpenean eragin lezaketela adierazten du.

Aurreko ikerketa batzuetan *CXCL11* eta *CXCL10* gain-adierazita topatu ziren eritasun zeliakoan, kemokina hauen ekoizpenaren eta gaixoetan glutenaren kontsumoaren artean erlazio bat konfirmatuz (Bondar et al., 2014). Bestalde, guk dakigula, aurretik ez da *CCL5*-ren ekarpena aztertu eritasun zeliakoan. Hala ere, proteina hau beste gaixotasun autoimmune batzuekin asoziatu da, bai genetikoki zein funtzionalki (Zhernakova et al., 2006).

3.3 Erregulazio negatiboaren alterazioa

TLR bidezidorraren seinalizazioa inhibitzen duen *TOLLIP* genearen adierazpena aztertzean, hau azpi-adierazita ikusi da gaixo aktiboetan (1. irudia). Hau aurreko lan batean ere ikusi zen (Kalliomäki et al., 2012), eritasun zeliakoan tolerantzia galera bat iradokiz.

1. irudia. 28 gene kandidaturen adierazpen erlatiboa gaixoen biopsietan. Desberdintasun adierazgarriak gorriz (gain-adierazpena) eta urdinez (azpi-adierazpena)



3.4 Alterazio maila ezberdinak hartzaile, bidezidor muina eta proteina koestimulatzailerak, zitokinak eta interferoiak kodetzen dituzten geneetan

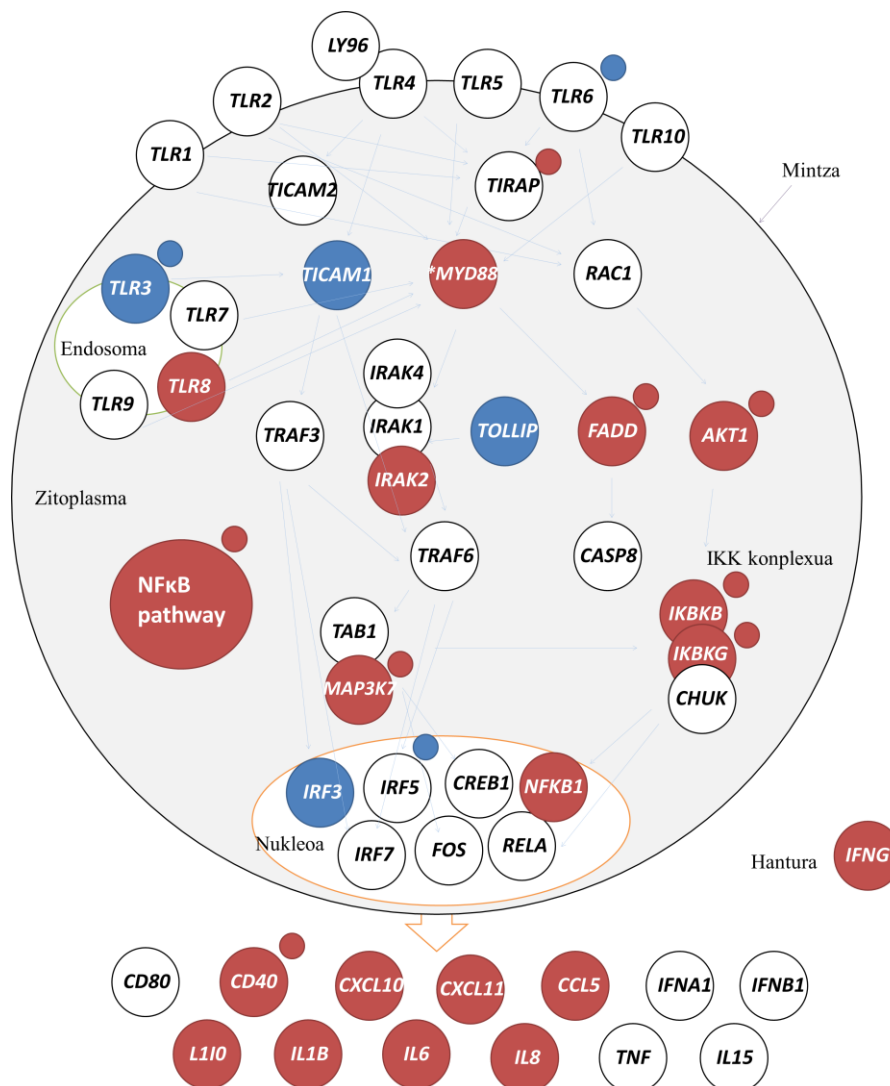
TLR bidezidorra osotasunean aztertzeke helburuaz 28 geneen datuak aurretik aztertutako 23 geneekin bateratzean, alterazio maila desberdinak ikusi dira hartzaileen, bidezidor muinaren, eta proteina koestimulatzailerak, zitokinak eta interferoiak kodetzen dituzten geneen artean (2. irudia), hartzaileetatik ur-behera alterazio posible bat erakutsiz. Hala ere, jakina da erantzun immune innatoak ez duela epe luzerako eraginik, erantzun adaptatiboa da epe luzera eragiten duena eta baliteke ikusitako alterazioetan bidezidor innatoaz gain bidezidor adaptatiboaren eragina egotea.

3.5 Alterazioak TLR intrazelularretan

Aztertutako 10 Toll-like hartzaileetatik bik (TLR3 eta TLR8), biak hartzaile intrazelularrak, adierazpen mailan alterazio adierazgarriak aurkeztu dituzte gaixo aktiboetan (2. irudia). Beraz, azterketa honetan adierazgarriki aldatuta agertu diren TLR bakarrak intrazelularrak izan dira, nukleotidoak ezagutzeko arduradunak.

TLR3 hartzaileak kate bikoitzeko RNA birala (dsRNA) du ligandotzat, TLR8 hartzaileak, aldiz, kate bakarreko RNA birala (ssRNA). Bestalde, eritasun zeliakoa pairatzen duten pazienteetan birusen osagai baten antzekoa den peptido baten aurkako antigorputzak aurkitu dira. Gainera, gliadinaren sekuentziak digestio aparatuko adenobirus batekin homologia izan lezakeela ere proposatu da (Moossavi, 2014). Hala ere, gutxi dakigu TLR3 eta TLR8 hartzaileek gaixotasunean izan dezaketen eraginaz.

2. irudia. Zelula baten errepresentazioa aztertutako geneek kodetzen dituzten proteinen kokapenaren arabera antolatuta. Gorriz gain-adieraziak eta urdinez azpi-adieraziak. Zirkulutxoak duten geneak konstitutiboki aldatuta daude



4. Ondorioak

Zenbait geneetan ikusitako alterazio adierazgarriek eritasun zeliakoan ematen den hantura prozesua baieztatzen dute, eta TLR bidezidor alteratu bat iradokitzen dute gaixoetan. Gainera, hartzaileen, bidezidor muinaren, eta proteina koestimulatzailerak, zitokinak eta interferoiak kodetzen dituzten geneen artean aztertutako alterazio maila desberdinak, hartzaileetatik ur-beherako alterazio posible bat erakutsi lezake. Hala ere, proteina mailako analisiak burutzea ezinbesteko lana da kokapen mailan gertatutako alterazioak ulertu ahal izateko.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Zelula kulturak eta inhibitzaileak erabiliz *in vitro* azterketak egin TLR hartzailearen bat gliadinaren hartzaile zuzena den ikertzeko.

Gliadinak epe laburrean TLR bidezidorrean duen eraginaren azterketa gliadinarekin inkubatutako kulturetan.

Gliadinaren eraginaren azterketa enterozitoen erantzun immune innatoan.

6. Erreferentziak

- Bondar, C., et al. (2014), Role of CXCR3/CXCL10 Axis in immune Cell Recruitment into the Small Intestine in Celiac Disease, *PloS one*, 9(2), 89068.
- Forsberg, G., et al. (2007), Concomitant increase of IL-10 and pro-inflammatory cytokines in intraepithelial lymphocyte subsets in celiac disease, *International immunology*, 19(8), 993-1001.
- Green, P.H.R. eta Cellier, C (2007), Celiac disease, *N. Engl. J. Med.*, 357, 1731-43.
- Kalliomäki, M., et al. (2012), Expression of microbiota, Toll-like receptors, and their regulators in the small intestinal mucosa in celiac disease, *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 54(6), 727-732.
- Mills, K.H. (2011), TLR-dependent T cell activation in autoimmunity, *Nature Reviews Immunology*, 11(12), 807-822.
- Moosavi, S. (2014), Gliadin i san uncatalogued Toll-like receptor ligand, *Journal of Medical Hypotheses and Ideas*, 8(1), 44-47.
- Palová-Jelínková, L., et al. (2013), Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1 β via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF- κ B Signaling Pathway and an NLRP3 Inflammasome Activation, *PloS one*, 8(4), e62426.
- Zhernakova, A., et al. (2006), Genetic variants of RANTES are associated with serum RANTES level and protection of type 1 diabetes, *Genes and immunity*, 7(7), 544-549.

7. Eskerrak eta oharra

- Ikerketa hau ISCIII (PI10/310) ikerketa proiektuaren bitartez finantzatu zen.
- Lan hau Biologia Molekularra eta Biomedikuntza Unibertsitate Masterreko “Expression analysis of Toll-like receptor pathway in celiac disease” master amaierako lanetik eratorria da.
- Egileek SGikerrek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, EGEF eta EGIF) emandako laguntza teknikoa eta gizatiarra eskertzen dute.