



IKER  
GAZTE  
NAZIOARTEKO  
IKERKETA EUSKARAZ

## IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a  
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:  
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

### ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

**2 motako diabetesari asoziatu-  
riko RNA ez-kodetzaile batek 2  
transglutaminasa genearen  
adierazpena erregulatzen du  
pankreako beta zeluletan**

*Itziar Gonzalez-Moro, Maialen  
Sebastian-Delacruz, Henar Rojas-  
Márquez, Ane Olazagoitia-  
Garmendia, Jon Mentxaka Salgado,  
Luis Manuel Mendoza, Aina Lluch,  
Francisco José Ortega, Ainara  
Castellanos-Rubio eta Izortze Santin*

181-187 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.24>



## 2 motako diabetesari asoziatuiko RNA ez-kodetzaile batek 2 transglutaminasa genearen adierazpena erregulatzen du pankreako beta zeluletan

González-Moro, I.<sup>1,2</sup>, Sebastián-delaCruz, M.<sup>1,2</sup>, Rojas-Márquez, H.<sup>1</sup>,  
Olazagoitia-Garmendia, A.<sup>1,2</sup>, Mentxaka-Salgado, J.<sup>1</sup>, Mendoza, L.M.<sup>1</sup>,  
Lluch, A.<sup>3</sup>, Ortega, F.J.<sup>3</sup>, Castellanos-Rubio, A.<sup>1,2,4,5</sup>, Santin, I.<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>UPV/EHU, <sup>2</sup>Biocruces Bizkaia Health Research Institute, <sup>3</sup>IDIBGI, <sup>4</sup>CIBERDEM,  
<sup>5</sup>Ikerbasque.

itziar.gonzalezm@ehu.eus

### Laburpena

*LOC107987281* izeneko RNA luze ez-kodetzailea (lncRNA) 2 motako diabetesarekin bat datozen hainbat parametroekin asoziatua dago. Pankreako beta zeluletan *LOC107987281* nagusiki nuklearra dela ikusi genuen, transkripzioaren erregulazioan jardun dezakeenaren seinale izan daitekeelarik. Emaizta esperimentalek aditzera ematen dute lncRNA honek *TGM2* gene kodetzailearen adierazpena kontrolatzen duela. *TGM2* geneak intsulinaren jariatzean duen funtzioa kontutan izanik, eta lncRNAREN eta 2 motako diabetesarekin (T2D; ingelesez *type 2 diabetes*) erlazionatutako zenbait parametroen artean dagoen asoziazioa ikusita, *LOC107987281* RNAk 2 motako diabetesarekin lotura izan dezakeela ondoriozta daiteke.

Hitz gakoak: TGM2, 2 motako diabetesa, lncRNA, pankreako beta zelula.

### Abstract

*A long non-coding RNA (lncRNA) called LOC107987281 is linked to several parameters related to type 2 diabetes. In pancreatic beta cells, LOC107987281 is preferentially expressed in the nuclei, suggesting a potential role in transcriptional regulation. Experimental data evoke this lncRNA is able to regulate the expression of TGM2 coding gene. Considering the function of TGM2 gene, this regulation seems to be relevant for proper insulin secretion and beta cell function in a T2D context, given the association of LOC107987281 with the aforementioned T2D related parameters.*

*Keywords: TGM2, Type 2 diabetes, lncRNA, beta cells*

### 1. Sarrera eta motibazioa

Giza 2 transglutaminasa (TGM2) 686 aminoazido dituen entzima monomerikoa da, 20. kromosoman kokaturiko *TGM2* geneak kodetzen duena. Transamidazio erreakzioak katalizatzen dituen entzima honek G-proteina modura jardun dezake. Nahiz eta ehun gehienetan modu konstitutiboan adierazten den, bere transkripzioa estuki erregulatuta dago, kasu askotan hanturazko zitokina eta hazkuntza faktoreen bidez (Nurminskaya eta Belkin, 2012). Entzima hau giza pankreako irletan adierazten da eta karraskarietan intsulinaren jariatzean parte hartzen duela ikusi da.

TGM2ren funtzio nagusia  $Ca^{2+}$  menpeko proteinen arteko erretikulazioa gauzatzea da, glutamina aminoazidoen bitartez. Elkargurutzatutako proteinek, lotura itzulezin isopeptidiko horren bidez, masa molekular handiko produktuak eratzen dituzte eta zelula kanpoko matrizean, zelulen atxikipenean, proliferazioan, apoptosian eta beste prozesu anitzetan funtzio garrantzitsua betetzen dute (Nurminskaya eta Belkin, 2012). Horrela, ez da harriztekoa TGM2 funtzio akasduak egoera patogenikoak sortaraztea; izan ere, TGM2 zenbait gaixotasunekin

inplikatu da, minbiziarekin eta gaixotasun autoimmuneekin, besteak beste (Rahavirta et al, 2019).

TGM2 2 motako diabetesaren garapenarekin (T2D) erlazionatu da. 2 motako diabetesa gaixotasun endokrino bat da zeinean bi prozesu patogeniko ematen diren: alde batetik, pankreako beta zelulen intsulinaren ekoizpen eta jariapen desegokia, eta bestetik, ehun periferikoetan intsulinarekiko erresistentziaren agerpena (Chatterjee et al, 2017). Munduan zeharreko bizimodu sedentarioen eta gizentasunaren areagotze larri progresiboaren ondorioz T2Daren prebalentzia azken urteotan izugarri hazi da, eta erritmo handian areagotzen jarraitzea aurreikusten da (Chatterjee et al, 2017). Nahiz eta gaixotasun multifaktoriala izan, asoziazio eta lotura ikerketen arabera, faktore genetikoek berebiziko garrantzia dute bere garapenean. Zorigaitzez, badirudi osagai genetiko horretan polimorfismo edo bariante ohikoek eragin apala dutela banan-banan aztertzean, polimorfismo arraroagoek izan dezaketen garrantzia nabarmenduz. TGM2k karraskarien beta zeluletan glukosak eragindako intsulinaren jariapenean (GSIS; ingelesez *glucose-stimulated insulin release*) parte hartzen duela ikusi da. Izan ere, arratoien pankreako irlatxoak TGM2aren inhibitzaileekin inkubatzek GSIS nabari murriztea eragiten du (Bungay et al, 1986). Are gehiago, *TGM2* genearen etenaldiak GSIS inhibitzen du, *TGM2*<sup>-/-</sup> diren arratoiak glukosarekiko intolerante bihurtzen direlarik (Bernassola et al, 2002).

Bestalde, T2D edo MODY (ingelesez; *maturity onset diabetes of the young*) duten pazienteetan TGM2 proteinaren kontserbazio altuko aminoazidoetan mutazio heterozigotoak identifikatu dituzte. Mutazio horiek TGM2ren transamidazio aktibitatea murrizten dutela ikusi da *in vitro* gauzaturiko esperimentuetan (Porzio et al, 2007). Gainera, arratoiaren intsulinoma zelula lerroetan (INS-1E), mutazio hauek glukosak eragindako intsulinaren jariapena murrizten dutela ikusi da (Salter et al, 2012).

Emaitza hauek *TGM2* geneak intsulinaren jariapenean, eta ondorioz, pankreako beta zelulen ohiko funtzioan daukan garrantzia erakusten dute, *TGM2* genearen erregulazio ondo ulertzea ezinbestekoa izanik. Berriki, zenbait zelula lerrotan gauzaturiko ikerketetan, *TGM2* genearen adierazpenarekin korrelazio zuzena duen RNA luze ez-kodetzaile (lncRNA; ingelesez *long non-coding RNA*) bat (*LOC107987281*) identifikatu da (Minotti et al, 2018). *LOC107987281* lncRNA, *TGM2*ren lehenengo introitik transkribatzen da eta 1000 nukleotidoz osatua dago (Minotti et al, 2018). LncRNA honek nukleotido bakarreko polimorfismo (SNP: ingelesez *single nucleotide polymorphism*) bat dauka bere lehenengo exoian, *TGM2* gene kodetzailean intronikoa dena.

Horrela, gure ikerketaren hipotesia, *LOC107987281*ren funtzioa aldatu dezaketen polimorfismoek *TGM2*aren adierazpena aldatu eta intsulinaren jariapenean eta T2Daren garapenean eragina izan dezaketela da.

## 2. Ikerketaren helburuak

Sarreran azaldutakoa abiapuntutzat hartuta, gure ikerketaren helburu nagusia *LOC107987281* RNA ez-kodetzailearen karakterizazio funtzionala burutzea da, 2 motako diabetesaren garapenean izan dezakeen ekarpena argitu nahian.

Asmo honekin, bi helburu espezifiko ezarri ditugu. Alde batetik, *LOC107987281* genean dagoen polimorfismoak T2D garatzeko arriskuan duen ekarpen espezifikoa determinatzea. Honetarako, giza laginetan SNPa eta T2Dren patogeniarekin asoziatuturiko zenbait parametroen arteko asoziazio ikerketa sortu dugu.

Beste aldetik, *LOC107987281* lncRNA eta *TGM2*aren erlazioa aztertzea pankreako beta zeluletan. Horretarako, *LOC107987281* lncRNAren adierazpena modulatu dugu isilarazpen-eta gainadierazpen-tekniken bitartez, eta *TGM2*aren adierazpena zehaztuko dugu.

### 3. Ikerketaren muina

#### 3.1. LOC107987281 lncRNA T2D-arekin asoziatuta dago

Lehendabizi, *LOC107987281*aren introian dagoen rs2076380 polimorfismoa analizatu zen 557 pertsonatako kohorte batean. Horren ostean, polimorfismoa eta T2Darekin erlazionatuta dauden zenbait parametroen arteko asoziazio-ikerketak burutu zen.

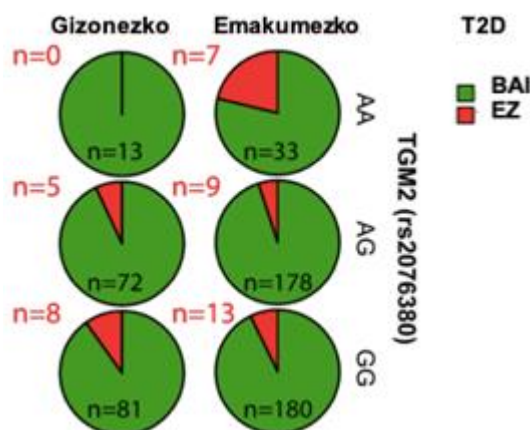
Gizonen laginen artean (n=166) emaitza esangarririk ikusi ez genuen arren, emakumeetan (n=391) polimorfismoa hainbat parametroekin modu esanguratsuan asoziatuta zegoela ikus daiteke; hala nola, glukosa maila, intsulina maila barauan, 75gr glukosa irentsi eta 120minutu osteko intsulina maila eta intsinarekiko erresistentzia (HOMA-IR) (1.taula).

**1. taula. LOC107987281an dagoen rs2076380 polimorfismoaren eta diabetesarekin erlazionatutako zenbait parametroen arteko asoziazio ikerketaren emaitzak kohorteko emakumezkoetan.**

rs2076380	AA (n=33)		AG (n=178)		GG (n=180)		ANOVA
	Bataz-bestekoa	Desbideraketa estandarra	Bataz-bestekoa	Desbideraketa estandarra	Bataz-bestekoa	Desbideraketa estandarra	
Glukosa (mg/dl)	106,0	30,4	95,2	16,5	93,8	19,7	0,005
INTSULINA barauan	31,8	20,0	21,0	12,4	19,3	11,9	0,001
INTSULINA (glukosa + 120min)	113,6	110,4	113,3	93,9	80,0	72,0	0,010
HOMA-IR	7,0	13,0	3,8	4,1	3,4	6,1	0,016

1. taulan ikusi daitekeen gisara, rs207380 polimorfismoan AA genotipo duten emakumeek intsulina jariapen altuagoa izateaz gain, intsinarekiko erresistentzia adierazten duen HOMA-IR parametroa altuagoa eta odoleko glukosa maila ere altuagoa dute, AG heterozigotoak edo GG homozigotoak diren emakumeekin alderatuta.

- 1. Irudia. Aztertutako kohortean T2D duten norbanakoen proportzioa, rs2076380 genotipoaren arabera.** AA genotipoa duten emakumeen artean T2Daren intzidentzia AG edo GG duten emakumeen artean baino altuagoa da, %21, %5 eta %7ko intzidentziarekin, hurrenez hurren.

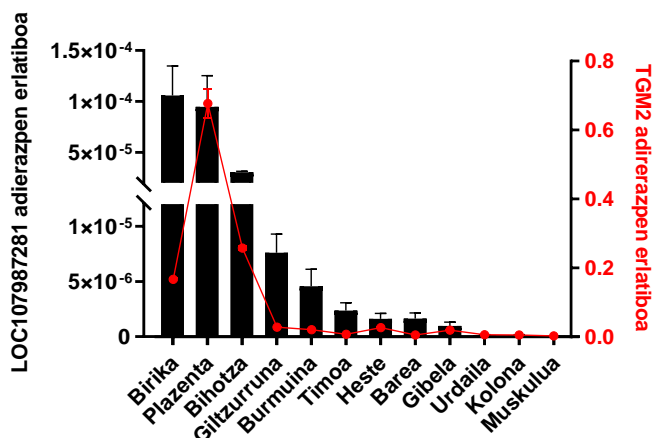


#### 3.2. LOC107987281 lncRNA eta TGM2 gene kodetzailea giza ehun desberdinetan adierazten dira

Behin *LOC107987281* eta T2Daren arteko asoziazioa frogaturik, RNA ez kodetzailearen azterketari ekin genion. Lehendabizi, *TGM2* gene kodetzailearen eta *LOC107987281* gene ez-kodetzailearen adierazpena aztertu genuen 12 giza-ehunetan. Bigarren irudian ikus daitekeen moduan, bai lncRNA baita *TGM2* genearen adierazpen absolutuak oso baxuak ziren aztertutako ehun guztietan. Hala ere, bi geneen adierazpen-maila altuena, birika, plazenta eta bihotzean

detektatu zen. Spearmanen korrelazio-analisiak giza ehun hauetan *LOC107987281* eta *TGM2* geneen adierazpena korrelazionatuta dagoela erakutsi zuen (Spearmanen  $R = 0,87$  (0,59-0,9);  $p < 0,001$ ).

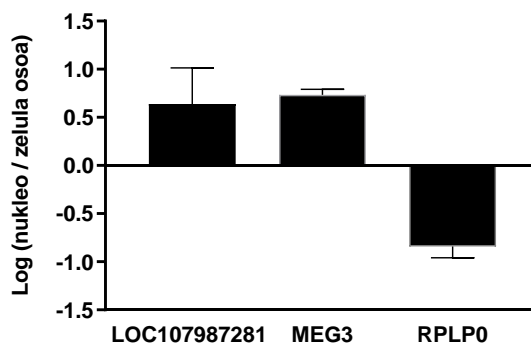
**2. irudia. *LOC107987281* eta *TGM2* geneen adierazpenak 12 giza ehun desberdinetan.** Zutabe beltzetan *LOC107987281* geneari dagozkien adierazpen-balioak ageri dira. Puntu gorriek, *TGM2* genearen adierazpen-balioak adierazten dituzte. Geneen adierazpena Q-PCRaren bitartez zehaztu zen, *HPRT* gene konstitutiboaren bitartez normalizatuz. Emaitzak hiru erreplika esperimentalen batezbestekoa  $\pm$  SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira.



### 3.3. *LOC107987281* genearen ikerketa funtzionala EndoC-βH1 zeluletan

Lehenik eta behin, *LOC107987281* mRNAk pankreako beta zeluletan duen kokapena ikertu genuen, kokapenak lncRNAk eduki dezakeen funtzioaren inguruan informazioa ematen baitu. Horrela, nuklearrak diren lncRNAk transkripzioaren erregulazioarekin erlazionatuta egon daitezkeen bitartean, zitoplasman daudenak, RNAREN egonkortasunean edo proteinen garraioan parte hartu dezakete. Pankreako beta zelulen frakzio nuklearra isolatu zen zelula-osoaren zatikiarekin konparatu ahal izateko. Bi frakzio hauetan lncRNAaren adierazpena aztertu zen, eta 3. irudian ikus daitekeen modura, *LOC107987281* lncRNAren kokapena nagusiki nuklearra zela ikusi zen.

**3. irudia. EndoC-βH1 zeluletan *LOC107987281* genearen kokapen zelularra.** Q-PCRaren bitartez frakzio nuklearrean eta zelula erauzkin osoan, *LOC107987281*, *MEG3* (kontrol nuklearra) eta *RPLP0* (kontrol zitoplasmatikoa) aztertu ziren. Emaitzak (nukleo/zelula osoa) ratioaren logaritmo gisa adierazten dira. Emaitzak hiru esperimentu independenteen batezbestekoa  $\pm$  SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira.

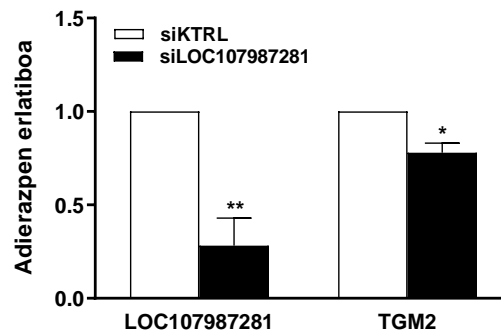


### 3.4. Pankreako beta zeluletan LOC107987281 lncRNAk TGM2ren adierazpena kontrolatzen du

Hurrengo pausua, beta zeluletan *LOC107987281* isilarazpena egin eta *TGM2* genearen adierazpena neurtzea izan zen. Isilarazpena gauzatzeko siRNA molekula bat erabili genuen. siRNAk RNA molekula txikiak dira zeintzuk RNA itura lotu egiten diren, nukleotido osagarritasuna dela eta, RNA horren adierazpena blokeatuz. Kontrol gisa, giza genomako gene bakar batekin osagarritasuna ez duen siRNA molekula bat erabili genuen (siKTRL). *LOC107987281* isilaraztean, *TGM2* gene kodetzailearen adierazpenean murrizpen esangarria ikusi zen. siLOC107987281 siRNArekin isilarazpen eraginkorra lortu zen (%70ko isilarazpena); eta honen ondorioz, *TGM2* genearen adierazpena %23 inguru txikiagotu zen (4. irudia).

### 4. irudia. EndoC-βH1 zeluletan LOC107987281 eta TGM2 geneen adierazpen erlatiboak lncRNA itua isilarazterakoan.

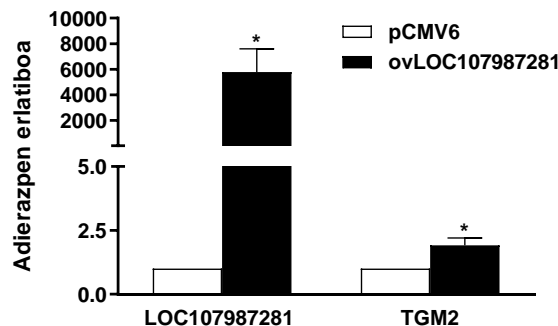
Isilarazpena gauzatzeko siLOC107987281 izendatu dugun siRNA molekula transfektatu zen. Geneen adierazpena Q-PCRaren bitartez zehaztu ziren, *HPRT* gene konstitutiboaren bitartez normalizatuz. Emaitzak hiru esperimentu independenteen batezbestekoa ± SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01 Student t-testaren arabera.



*LOC107987281* isilarazpena aztertzeaz gain, honen gainadierazpena egitea erabaki zen. lncRNA gainadierazteko plasmidoa (ovLOC107987281) diseinatu eta ekoiztu zen pCMV6 deritzon adierazpen bektorea moldatuz. Kontrol modura pCMV6 plasmido hutsa erabili genuen. ovLOC107987281 plasmidoa erabilita lncRNA 5000 aldiz gainadieraztea lortu zen. *LOC107987281* gainadieraztean, *TGM2* genearen adierazpena bikoizten zela ikusi zen (5. irudia).

### 5. irudia. LOC107987281 lncRNA gainadierazpenak EndoC-βH1 zeluletako TGM2 genearen adierazpenean duen eragina.

Gainadierazpena ovLOC107987281 plasmidoaren transfekzioaren bidez lortu zen. Kontrol modura, pCMV6 plasmido hutsa erabili egin zen. Geneen adierazpena Q-PCRaren bitartez zehaztu zen, *HPRT* gene konstitutiboaren bitartez normalizatuz. Emaitzak hiru esperimentu independenteen batezbestekoa ± SEM (batazbestekoaren errore estandarra) bezala adierazi dira. \*p < 0.05 Student t-testaren arabera.



#### 4. Ondorioak

Oro har, *LOC107987281* izeneko RNA luze ez-kodetzaileak 2 motako diabetesaren garapenean eragina izan dezakeela iradokitzen dute gure emaitzek. Gure datuen arabera, lncRNA honen lehenengo exoian dagoen SNP bat, T2Daren patogenesiarekin bat datozen hainbat parametroekin (intsulinarekin jariatzea, intsulinarekiko erresistentzia eta odoleko glukosa maila) asoziatuta dago. Asoziazio genetikoak T2D eta SNParen artean soilik emakumeetan detektatu dugu. T2Daren intzidentzia handiagoa da emakumeetan gizonetan baino, eta horren arrazoiak argi ez dauden arren, badirudi sexu-hormonek eragina izan dezaketela. Izan ere, zenbait baldintzetan estradiolak (emakumeetan dagoen sexu-hormona) pankreako beta zelulen funtzioan eragin negatiboa izan dezaketela ikusi da. Zentzu horretan, eta T2D gaixotasun konplexua dela kontuan izanik, SNParen eta emakumeen berezko ezaugarri biologikoen arteko interakzioak beta zelulen funtzioan eta gaixotasunaren garapenean eragin dezaketela pentsa daiteke. *LOC107987281* giza genomak *TGM2* gene kodetzailearekin gainjartzen da eta zenbait ikerketek ikusi dute *TGM2* intsulinarekin jariatzean parte hartzen duela. Ildo honetatik, zentzuzkoa da pentsatzea *LOC107987281*ek intsulinarekin jariatzearen erregulazioarekin zerikusia duela.

Gure datuetan oinarriturik, lncRNA hau pankreako beta zelulen nukleoetan adierazten da, eta ondorioz, geneen transkripzioaren erregulazioan parte hartzen duela pentsa daiteke. Izatez, gure isilarazpen- eta gainadierazpen-esperimentuek *LOC107987281* lncRNAk *TGM2* genearen adierazpena kontrolatzen duela adierazten dute. Azterketa funtzional sakonagoak beharrezkoak dira lncRNA honen funtzio zehatza ezagutzeko eta pankreako beta zeluletan intsulinarekin jariatzearen erregulazioarekin duen eginkizuna azaltzeko.

#### 5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

Ikerketa lan honen bitartez 2 motako diabetesarekin lotura eduki dezakeen lncRNA baten azterketa burutu dugu. *LOC107987281* RNA ez-kodetzaile hau *TGM2* gene kodetzailearen erregulazioan aritzen dela antzeman dugu, baina lncRNA honek *TGM2*ren adierazpena nola erregulatzen duen aztertzeke dago. *TGM2* geneak intsulinarekin jariatzean zeresana badaukala kontuan hartuta, zentzuzkoa litzateke *LOC107987281* lncRNA intsulinarekin jariatzean edota askapenean inplikaturik egotea. Horrela, etorkizunean lncRNA honen jardura-mekanismoa aztertzeaz gain, intsulinarekin jariatzean zein jariatzean duen inpaktua aztertuko dugu.

Bestalde, kontuan izanik *LOC107987281* honek T2Darekin asoziatuta dagoen polimorfismo bat duela, alelo bakoitzak T2Daren garapenean duen kontribuzioa zehazteko esperimentuak burutuko ditugu, lncRNAren adierazpen alelo-espezifikoak modulatu.

#### 6. Erreferentziak

- Bernassola, F. et al. (2002), Role of transglutaminase 2 in glucose tolerance: knockout mice studies and a putative mutation in a MODY patient. *FASEB Journal*, 16, 1371-1378.
- Bungay, P.J. et al. (1986), A role for transglutaminase in glucose-stimulated insulin release from the pancreatic  $\beta$ -cell. *The Biochemical Journal*, 235 (1), 269-278.
- Chatterjee, S. et al. (2017). Type 2 diabetes. *Lancet*, 389 (10085), 2239-2251.
- Eizirik, D.L. et al. (2009), The role of inflammation in insulinitis and  $\beta$ -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5, 219-226.
- Minotti, L. et al. (2018), A long non-coding RNA inside the type 2 transglutaminase gene tightly correlates with the expression of its transcriptional variants. *Amino Acids* 50, 421-438.
- Nurminskaya, M.V. et al. (2012) Cellular functions of tissue transglutaminase. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 294, 1-97.

- Porzio, O. et al. (2007), Missense mutations in the TGM2 gene encoding transglutaminase 2 are found in patients with early-onset type 2 diabetes. Mutation in brief no. 982. Online. *Human Mutation* 28 (11), 1150-1150.
- Rauhavirta, T. et al. (2019) Transglutaminase 2 and Transglutaminase 2 Autoantibodies in Celiac Disease: a Review. *Clinical Reviews in Allergy and Immunology*, 57, 23–38.
- Salter, N.W. et al. (2012). Functional characterization of naturally occurring transglutaminase 2 mutants implicated in early-onset type 2 diabetes. *Journal of molecular endocrinology*, 48(3), 203–216.
- Sileno, S. et al. (2014), A possible role of transglutaminase 2 in the nucleus of INS-1E and of cells of human pancreatic islets. *Journal of Proteomics*, 96(100), 314-327.

## 7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa proiektu hau Diabetesaren Ikerketarako Fundazio Europarrak (EFSD/JDRF/Lilly Programme on Type 1 Diabetes Research) eta Espainiako Gobernuko Zientzia, Berrikuntza eta Unibertsitate Ministerioak (PID2019- 104475GA-I00 eta PGC2018-097573-A-I00) finantzatu dute.