



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

**MAGI2-ren aldaera genetikoaren
asoziazioa eta adierazpen
alterazioa eritasun zeliakoan**

*Amaia Jauregi Miguel, Izortze
Santin, Irati Romero Garmendia,
Koldo Garcia Etxebarria, Iñaki
Irastorza, Ainara Castellanos Rubio
eta Jose Ramon Bilbao*

128-133 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.04.17>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



MAGI2-ren aldaera genetikoaren asoziazioa eta adierazpen alterazioa eritasun zeliakoan

Amaia Jauregi-Miguel¹, Izortze Santin², Irati Romero-Garmendia¹, Koldo Garcia-Etxebarria¹,
Iñaki Irastorza³, Ainara Castellanos-Rubio^{1*}, Jose Ramon Bilbao^{1*}

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

²*Endokrinologia eta Diabetes ikerketa taldea, BioCruces Ikerketa Institutua eta 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*

amaia.jauregim@ehu.eus

Laburpena

Lotura hertsia (LH), zeluletan agertzen diren zelularteko loturak dira. Eritasun zeliakoan (EZ), heste meharreko LH egiturak erabat apurtuta daude eta ondorioz zelularteko fluxua emendatu egiten da, irentsitateko glutenaren barneraketa erraztuz. Ikerketa honen helburua, zeliakian LH-en galera funtzionalaren eragile genetikoak identifikatzea eta karakterizatzea izan da. Lehendik LH-en bidezidorrarekin erlazionatuta dagoen eskualde genomiko bat zeliakiarekin asoziatuta dagoela baieztatu dugu gaixo-talde berri batean. Asoziazioaz gain, eskualdean kokaturiko *MAGI2* eta *RP4-587D13.2* geneen adierazpena gutxitua dago gaixoetan. Gainera, analisi funtzionalen arabera, alterazio hauek LH funtzionalitateari eragin diezaioke.

Hitz gakoak: Eritasun zeliakoa, lotura hertsia, *MAGI2*, *RP4-587D13.2*

Abstract

In Celiac disease (CD), there is a loss of intestinal barrier function due to structural alterations in the Tight Junction (TJ) network, the most apical unions between epithelial cells. The association of TJ related gene variants points to an implication of this network in disease susceptibility. In the current study, we replicated the association of rs6962966, located in an intron of TJ-related MAGI2 gene and upstream of RP4-587D13.2 long non-coding RNA (lncRNA). We found that both, MAGI2 and RP4-587D13.2, are significantly downregulated in duodenal biopsies of active and treated CD patients. These findings show that the associated region is functionally altered in disease and suggest that RP4-587D13.2 and MAGI2 may be regulating the celiac disease related TJ alterations.

Keywords: Celiac disease, tight junctions, MAGI2, RP4-587D13.2

1. Sarrera eta motibazioa

Eritasun zeliakoa (EZ), gariaren glutenarekiko zein zekale eta garagarrean agertzen diren antzeko proteinekiko intolerantziaren eraginez garatzen den enteropatia autoimmune kronikoa da. Glutenaren gliadina proteinak, genetikoki suszeptibleak diren pertsonetan erantzun immune akasuna sortzen du, hesteetako mukosan lesioak eraginez. Horren ondorioz, elikagaien xurgapena nabarmen murrizten da hestean eta gaixoei, besteak beste, pisu galera, anemia, beherakoak eta masa muskularraren gutxitzea jasaten dute. Europar jatorrizko populazioan, %1eko maiztasuna du eta egun, tratamendu eraginkor bakarra biziarteko glutenik gabeko dieta hertsia da.

2. Arloko egoera eta ikerketaren helburuak

Eritasun konplexua da zeliakia, ingurune-faktoreek eta faktore-genetikoek parte hartzen dutelarik. Horregatik, nahiz eta arrisku genetiko garrantzitsua ezaguna izan, Giza Antigeno Leukozitarioaren zenbait aldaera (ingelesez Human Leucocyte Antigen edo HLA), alegia, haien ekarpena ez da nahikoa eritasunaren garapena azaltzeko (Houlston R.S. *et al.*, 1996).

Genoma osoko asoziazio azterketek eta ondoko analisisiek HLA ez diren eta zeliakiarekin asoziatuak dauden beste hainbat eremu genomiko identifikatu dituzte (van Heel et al., 2007; Dubois et al., 2010; Trynka et al., 2011; Garcia-Etxebarria et al., 2016). Bertako geneak zeliakiaren erantzule funtzionalak izan daitezkeela iradoki da eta ikerketa ugari egin dira hauen inguruan. Dena den, asoziatuak aldaera gehienak (nukleotido bakarrek aldaerak edo SNP), iradokitako gene kodetzaile hauetatik kanpo kokatzen direla ikusi da eta honek, genomaren erregulaziorako sistema konplexuaren atzean dauden elementu ez-kodetzaileen garrantzia azpimarratu du (hala nola aldaera estrukturalak eta epigenetikoak). Horien artean, RNA ez-kodetzaile luzeak (lncRNA), >200 base-pareko luzera duten eta proteina kodetzen ez duten RNA molekulak, interes handia piztu dute, geneen adierazpenaren erregulatzaile garrantzitsuak direla ikusi baita eta berriki, EZaren garapenean partaide direla baieztatu da (Castellanos A. et al., 2016).

Bestalde, ezaguna den sistema immunitarioaren erantzun bortitzez gain, eragin txikiagoz baina gaixotasuna garatzeko beharrezkoak diren beste bidezidor biologikoen (eta beste hainbat arrisku genetikoek) garrantzia azpimarratu da eta besteak beste, zelularteko loturak ikertu dira (Castellanos-Rubio A. et al., 2010). Zelularteko loturak ehunen osotasuna mantentzen laguntzen dute. Egitura apikalenak, lotura hertsiek (LH), zelulen artean gerriko estu eta jarrai bat eratzen dute, eta haien bidez kontrolatzen da zelularteko fluxua, kanpo ingurunearekiko hesi selektibo gisa jokatzuz (Tsukita S. et al., 2001). EZdun gaixoei LHen morfologia eraldatua eta hesteetako iragazkortasuna emendatua daukate, gliadinaren zelularteko fluxu libre baimenduz eta sistema immunitarioaren erantzuna areagotuz (Schulzke J.D. et al., 1998; Ciccocioppo R. et al., 2006; Jauregi-Miguel A., et al., 2014). Disfuntzio horrek oinarri genetikoak izan dezakeela iradoki da, alde batetik gaixotasunaren hasierako faseetan agertzen delako eta bestetik, glutenik gabeko dieta jarraitzen duten sintomarik gabeko gaixoei kalteak irauten dutelako (Bjarnason I., et al. 1984; Bjarnason I., et al. 1985). Hau horrela, LHen bidezidorrarekin erlazionatuta dauden geneak gaixotasunaren susceptibilitaterako hautagai potentzialak direla ondorioztatzen da.

Ikerketa honen helburua, zeliakian gertatzen den LHen bidezidorraren funtzio galeraren erantzule genetikoak identifikatzea eta karakterizatzea izan da eta horretarako, asoziazio analisiak eta analisi funtzionalak egin dira.

3. Ikerketaren muina

3.1 *MAGI2* genearen aldaera introniko bat zeliakiarekin asoziatuta dago

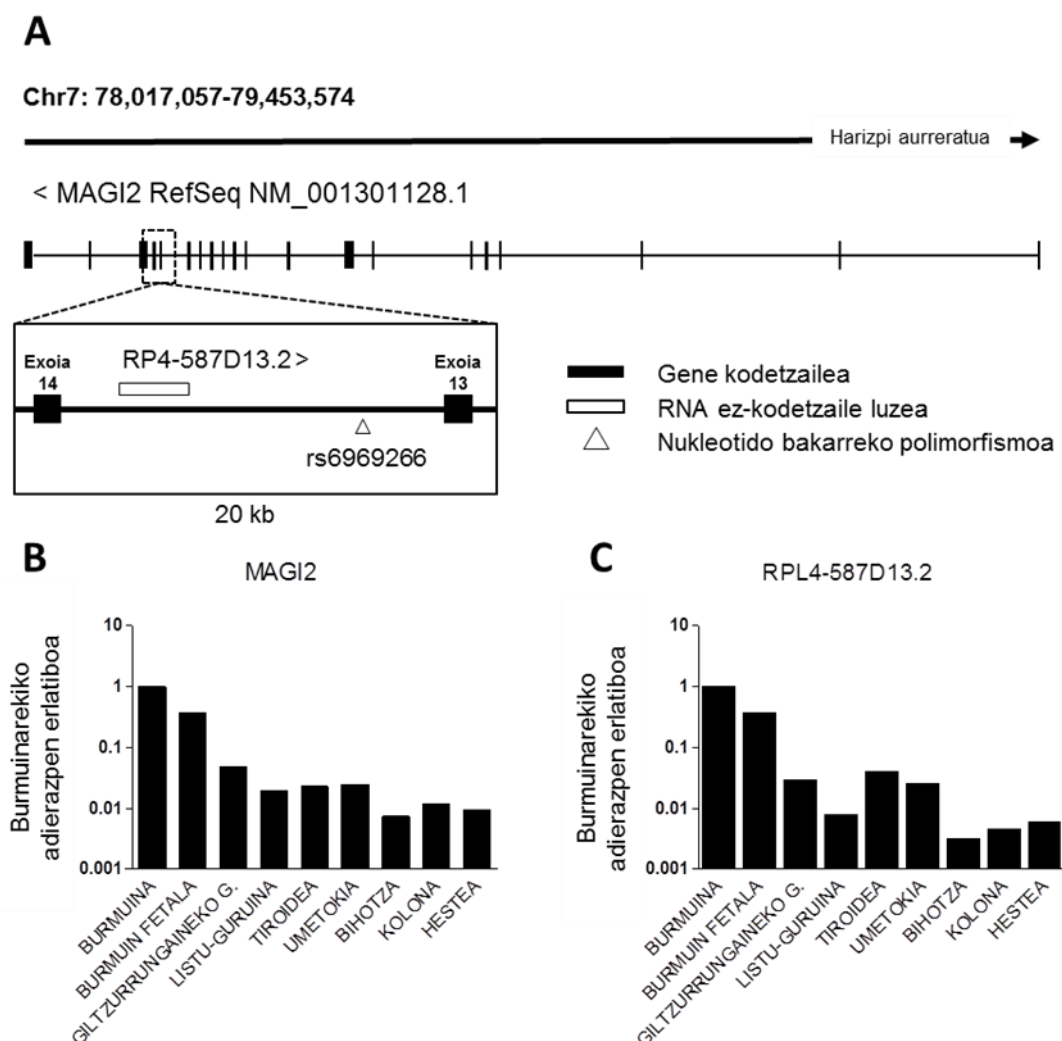
MYO9B, *PARD3* eta *MAGI2* geneetako hainbat SNP hesteetako gaixotasunetan ematen den iragazkortasun emendatuarekin asoziatu dira (Wapenaar MC. et al, 2008). Gene horiek LHen bidezidorrarekin partaide direnez, aldaera hauek zeliakian ohikoa den LHen disfuntzioaren eragile ote diren aztertu nahi izan dugu. Horretarako, *MAGI2*-ko 3 SNP, *PARD3*-ko 2 SNP eta *MYO9B*-ko 3 SNP genotipatu ziren 270 eri zeliakoen (kasuak) eta 91 kontrol ez zeliakoen DNA laginetan, eta asoziazio analisia burutu zen. *MAGI2* geneko introi batean kokatuta dagoen rs6962966*A aldaera EZ gaixotasunarekin asoziatuta dagoela ikusi genuen (P balioa = 0,0029; OR =1,88 [%95 KT 1,24-2,87]), hau da, genomako gune honetan G edo A nukleotidoa ager daiteke populazioan eta gure emaitzen arabera, A aldaeraren maiztasuna altuagoa da gaixoei kontrolatzen baino. Honek, aldaera hori EZaren garapenearekin erlazionatuta egon daitekeela baieztatzen du, aurretik Holanda eta Erresuma Batuko populazioetan ikusitakoa berretsiz (Wapenaar MC. et al, 2008). *PARD3* eta *MYO9B* geneen kasuan aldiz, ez dugu asoziaziorik aurkitu zeliakiarekin, aldaera horiek hesteetako beste hanturazko gaixotasunarekin lotuta badaude ere (Chen YQ. et al., 2016).

SNParen asoziazioa egon arren, jarraipen azterketarik ez da oraindik burutu eta ez dago frogatuta aldaera horrek *MAGI2* genearen funtzioan edota beste elementu erregulatzaileran batean eraginik duenik. *MAGI2* genearen inguru genomikoa aztertzean (1. irudia) *MAGI2* genetik 3,8 kb-tara zentromero aldera, RP4-587D13.2 funtzio biologiko ezezaguneko RNA luze

ez-kodetzailea (lncRNA) dagoela ikusi genuen. Azken urteotan genoma ez-kodetzaileak erregulazio genomikoan duen garrantziaz jabetuta, hura ere aztertzea erabaki genuen.

LncRNA honen funtzio biologikoa ezezaguna denez, gizakiaren organo ezberdinetan bere adierazpena aztertu genuen. *MAGI2* genearen antzera, RP4-587D13.2 aztertutako organo guztietan adierazten da, burmuinean adierazpen maila nabarmenki altua izanik (1. irudia). Jakina da *MAGI2* geneak funtzio ezberdinak dituela neuronetan, botoi sinpatikoetan moldatzaile gisa edota neuritoen hedapenaren erregulatzaile gisa, esaterako (Hisata S., *et al.*, 2007; Nagashima S., *et al.*, 2015). Hala ere, ehun ez neuronaletan ere LHen bidezidorreko partaide modura zelula estrukturan osotasuna mantentzeko funtsezkoa dela ikusi da. Bestaldetik, *MAGI2* genearen eta RP4-587D13.2 lncRNA-ren adierazpen joera antzekoa izateak bien funtzioak erlazionatuta egon daitezkeela iradokitzen digu eta beraz, RP4-587D13.2 LHen bidezidorraren erregulazioaren partaide izan daiteke.

1. irudia. A) EZarekin asoziatutako rs6962966 SNParen inguru genomikoa. SNP hautagaiaren inguruko 20 kb-ko eskualdea ere irudikatzen da. B eta C) *MAGI2* genearen eta RPL4-587D13.2 lncRNA-ren adierazpen profila 9 giza organotan. Balioak adierazpen maila altuena duen ehunarekiko (burmuina) erlatibizatu dira.

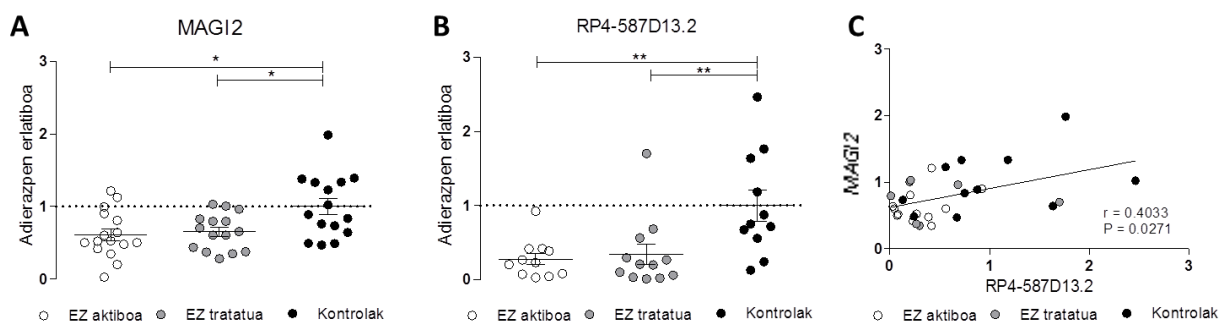


3.2 *MAGI2* eta RP4-587D13.2 adierazpenak gutxituak daude EZan

Gure emaitzek, rs6962966*A aldaera zeliakiarekin asoziatuta dagoela baieztatu dute eta beraz, gune horretan dauden *MAGI2* genearen eta RP4-587D13.2 lncRNAren funtzioa gaixotasunean aldatua dagoen ikertu dugu. Horretarako, bi elementuen adierazpena aztertu genuen 16 EZ gaixoen eta 16 kontrol osasuntsuen heste mukosan. Gaixoak bi egoera ezberdinetan aztertu ziren: batetik diagnostikoaren unean (EZ aktiboan) eta bestetik, glutenik gabeko dietaz (GGD) tratatu ostean (EZ tratatua). Bai RP4-587D13.2-ren zein *MAGI2*-ren adierazpena baxuagoa da gaixoetan kontrol osasuntsuetan baino (p balorea = 0,017 eta 0,048, hurrenez hurren) (2. irudia). Gainera, gaixoak glutenik gabeko dietaz tratatu eta hesteetako atrofia sendatu ostean ere, azpiadierazpena mantendu egiten da (p baloreak = 0,023 eta 0,007 RP4-587D13.2 eta *MAGI2*rako, hurrenez hurren) (2. irudia). Hau horrela, ez dirudi eskualde genomikoaren adierazpen aldaketak glutenaren irenketak eragindako erantzun immunitarioaren ondorio direnik. Gure emaitzek pazienteek erakutsitako eskualde genomikoaren alterazioa berezkoa dela adierazten dute, inplikazio genetikoak iradokiz. Gainera, kasu honetan ere, *MAGI2* eta RP4-587D13.2 koadierazita daude (p balorea = 0,027), gaixotasunean biek antzera jokatzuz (2. irudia). Azken honek, bi elementuen funtzioa erlazionatuta dagoela eta ziurrenik prozesu biologiko berdinak erregulatzen dituztela iradokitzen du.

Hasiera batean aldaketa hauek asoziatutako rs6962966 SNParen ondorio zirela pentsatu bagenuen ere, heste mukosako lagin hauen genotipaketak erakutsi zuen adierazpenaren alterazioa ez datorrela A aleloaren presentziarekin bat.

2. irudia. A) *MAGI2* genearen eta B) RPL4-587D13.2 lncRNA-ren adierazpen mailak gaixoen (EZ aktibo eta EZ tratatu) eta kontrol osasuntsuen heste mukosan. Adierazpen balioak kontrolen batz bestearikiko erlatibizatu dira. Grafikoetan lagingen batz bestekoa eta batez bestekoaren errore tipikoa erakusten dira. Asteriskoek adierazpen aldaketa esanguratsuak irudikatzen dituzte (* p balioa 0,01 eta 0,05 artean; ** p balioa 0,001 eta 0,01 artean). C) *MAGI2* eta RPL4-587D13.2 adierazpen mailen arteko korrelazioa. Erregresio linealaren r eta P balioak erakusten dira.

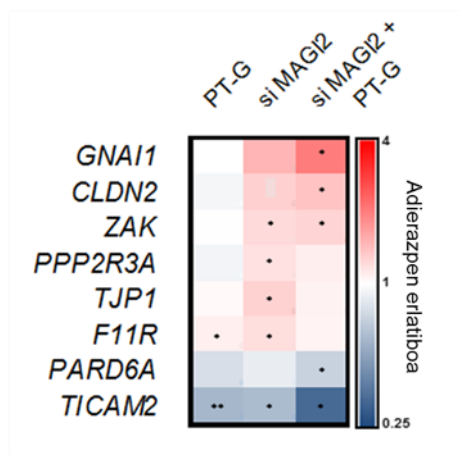


3.3 *MAGI2*-ren isilarazpenak LH bidezidorreko geneen alterazioa eragiten du

EZ gaixoetan ikusitako adierazpen aldaketek eragin biologiko bat duten aztertu nahi izan genuen hurrena. *MAGI2* genea LHen bidezidorreko parte denez, honen adierazpen baxuak LH bidezidorraren funtzionalitatean eragina izan zezakeela hipotetizatu genuen. Interferentzia RNA txikiak edo siRNAk, gene baten funtzioa aztertzeke eta gaixotasunaren garapenean izan dezakeen eginkizuna ikertzeke tresna oso aproposak dira. Metodo horren bidez, *MAGI2* genearen adierazpena isilarazi genuen *in vitro*, hesteko zelula lerro baten kulturatan, eta *MAGI2*-ren isilarazpenak LHen bidezidorreko gainontzeko geneen adierazpenean zuen eragina neurtu genuen. Gainera, gaixoen heste meharreko egoera erreproduzitzeko helburuarekin, glutenaren irenketak gene hauen adierazpenean izan dezakeen eragina ere neurtu genuen. Horretarako, *MAGI2* genea isilarazita zuten zelulak, gliadinaz kitzikatu ziren 4 orduz, urdailean dauden pepsina eta tripsina entzimez digeritutako gliadinaz (PT-G) hain zuzen. Isilarazpen eta kitzikapen guztien ostean, 22 geneko multzoaren adierazpena neurtu zen, denak LHen bidezidorrarekin erlazionatutakoak.

3. irudian ikus daitekeen moduan, 22 geneetatik 8k aldaketak jasan zituzten isilarazpenen eta kitzikapenen ostean. Orokorrean, *MAGI2* genearen isilarazpenak gliadinaren kitzikapenak baino eragin handiagoa izan zuen, bere funtzioa LHen bidezidorraren osotasunerako garrantzitsua dela adieraziz. Bestalde, gliadinaren efektuak *MAGI2*ren isilarazpenak sortutako adierazpen aldaketak areagotu zituen. Eredu zelular hau zeliakiaren eredu baliogarritzat hartzen badugu, baliteke *MAGI2*ren azpiadierazpena LH bidezidorraren osotasunean eragiten egotea eta glutenaren irenketak alterazio horiek indartzea.

3. irudia. LHen bidezidorreko gene hautagaien adierazpen profila tratamendu zelular ezberdinen ostean. Adierazpen balioak isilarazi eta kitzikatu gabeko zelula kontrolen batzuekiko erlatibizatu dira eta kolore eskala baten arabera irudikatu. Zutabeka tratamenduak eta lerroka aldaketa esanguratsuak jasan dituzten gene hautagaiak. Asteriskoek adierazpen aldaketa esanguratsuak irudikatzen (*p balioa 0,01 eta 0,05 artean; **p balioa 0,001 eta 0,01 artean).



4. Ondorioak

Laburbilduz, zeliakian adierazpena aldatuta duen eta asoziatuta dagoen eskualde genomiko bat identifikatu dugu, gaixotasunaren garapenean zerikusia izan dezakeena. Gaixoetan ikusitako eskualde honetako RP4-587D13.2ren eta *MAGI2* genearen berezko azpiadierazpenak, LHen egituren funtzionalitatean eragiten duela iradokitzen du. LHen egituren desantolaketa honek, gaixoen hesteetako iragazkortasunaren emendioa eragingo luke, irentsitako glutenarekiko erantzuna emendatuz.

5. Etorkizunerako planteatzeko den norabidea

Etorkizunean, asoziatutako eskualde genomikoa hobeto karakterizatu nahiko genuke. Alde batetik, RP4-587D13.2 eta *MAGI2* genearen arteko erlazioa baieztatu nahi dugu, lncRNAren gainadierazpenak *MAGI2*an duen eragina aztertuz. Bestalde, analisi funtzional sakonagoak egin ahal izateko, CRISPR teknikaren bidez RP4-587D13.2 eta *MAGI2* mutaturak duten zelula-lerroak sortu eta LHen bidezidorrean gertatzen diren aldaketak ikertuko ditugu, eskualde honen erregulazio mekanismoak identifikatzeko.

6. Erreferentziak

- Bjarnason I., *et al.* (1984), In vitro determination of small intestinal permeability: demonstration of a persistent defect in patients with coeliac disease, *Gut*, 25,145–50.
- Bjarnason I., *et al.* (1985), Intestinal permeability in patients with coeliac disease and dermatitis herpetiformis, *Gut*,26,1214–9.
- 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.
- Castellanos-Rubio, A., *et al.* (2016), A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease, *Science*, 352,91-5.
- Chen YQ., *et al.* (2016), Lack of Association between MYO9B Gene Polymorphisms and Susceptibility to Coeliac Disease in Caucasians: Evidence from a Meta-Analysis, *Immunol Invest.*, 45, 396-405.
- Ciccocioppo R., *et al.* (2006), Altered expression, localization, and phosphorylation of epithelial junctional proteins in celiac disease, *Am J Clin Pathol*, 125, 502–11.
- Dubois, P., *et al.* (2010), Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression, *Nat. Genet.*, 42, 295-302.
- 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.
- Hisata S., *et al.* (2007), Rap1-PDZ-GEF1 interacts with a neurotrophin receptor at late endosomes, leading to sustained activation of Rap1 and ERK and neurite outgrowth, *J Cell Biol.*, 27, 843-60.
- Houlston RS., *et al.* (1996), Genetics of coeliac disease, *QJM*, 89, 737–43.
- Jauregi-Miguel A., *et al.*, (2014), Alteration of tight junction gene expression in celiac disease, *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*, 58, 762-7.
- Nagashima S., *et al.* (2015), MAGI2/S-SCAM outside brain. *J Biochem.*,157, 177-84.
- Schulzke JD, *et al.* (1995), Epithelial barrier and ion transport in coeliac sprue: electrical measurements on intestinal aspiration biopsy specimens. *Gut* 1995;37:777–82.
- Schulzke JD., *et al.* (1998), Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue, *Pediatr Res* 43, 435–41.
- 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.
- Tsukita S., *et al.* (2001), Multifunctional strands in tight junctions, *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2, 285–93.
- van Heel, D.A., *et al.* (2007), A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the región harboring IL2 and IL21, *Nat. Genet.*, 39, 827-9.
- Wapenaar MC., *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*, 57, 463-7.

7. Eskerrak eta oharrak

Ikerketa hau ISCIII (PI13/01201) ikerketa proiektuaren bitartez finantzatu da. Egileek SGikerrek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, EGEF eta EGIF) emandako laguntza teknikoa eta gizatiarra eskertzen dute.