

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

# **LOTURA HERTSIETAKO GENE HAUTAGAIEN IKERKETA FUNTZIONALA ERITASUN ZELIAKOAN**

**Amaia Jauregi Miguel**

Leioa, 2017





Lan hau Amaia Jauregik jasotako Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Unibertsitate eta Ikerketa Saileko Beka Predoktoral (BFI-2013) eta Eusko Jaurlaritzako Osasun sailak (2011111034) eta Instituto de Salud Carlos III-Espainiako Berrikuntza eta Zientzia Ministeritzak (PI13/01201) diruz lagundutako proiektuen bitartez burutu da. SGIkerrek (UPV/EHU, MICINN, GV/EJ, EGEF eta EGIF) emandako laguntza teknikoa eta lana eskertzen da.

## LABURDURAK

### ARGITALPEN ORIGINALEN ZERRENDA

### PROIEKTUAREN JUSTIFIKAZIOA ETA GARRANTZIA

#### 1. SARRERA

##### 1.1. Eritasun zeliakoa

1.1.1. Ezaugarri klinikoak eta diagnostikoa

1.1.2. Epidemiologia

1.1.3. Tratamendua

##### 1.2. Eritasun zeliakoaren Genetika

1.2.1. HLA eremua eta eritasun zeliakoa

1.2.1.1. HLA eremua

1.2.1.2. Suszeptibilitate geneak eta arrisku genetikoa

1.2.2. HLA eremutik kanpoko arrisku genetikoa

##### 1.3. Eritasun zeliakoaren patogenesia

1.3.1. Glutena

1.3.2. Transglutaminasa

1.3.3. Immunitate-sistema egokitzalea

1.3.4. Berezko immunitate-sistema

1.3.5. Bidezidor patologiko potentzialak

##### 1.4. Lotura hertsien bidezidorra

1.4.1. Lotura hertsien egitura

1.4.2. Lotura hertsia eritasun zeliakoan

#### 2. HELBURUAK

#### 3. MATERIALAK ETA METODOAK

##### 3.1. Materialak

3.1.1. Pazienteak

3.1.1.1. Onarpen etikoa

3.1.1.2. Pazienteak eta biopsia laginak

3.1.2. DNA laginak

3.1.3. Epitelioko zelula lerroak

##### 3.2. Metodoak

- 3.2.1. RNA, DNA and proteinen erazuketa
- 3.2.2. Geneen adierazpena
  - 3.2.2.1. Gene hautagaiak eta entseguak
  - 3.2.2.2. Alderantzizko transkripzioa edo cDNAren sintesia
  - 3.2.2.3. Adierazpen analisia: qPCR
- 3.2.3. Genotipaketa
- 3.2.4. Zelula kulturen baldintzak eta tratamenduak
  - 3.2.4.1. Zelula kulturen baldintzak
  - 3.2.4.2. Gliadinaren prestaketa eta zelulen kitzikapena
- 3.2.5. siRNA bidezko transfekzioa
- 3.2.6. Western-blot teknika
- 3.2.7. Iragazkortasun azterketak
- 3.2.8. Proliferazio mailaren neurketa
- 3.2.9. Zauri-sendatze entsegua
- 3.2.10. CRISPR-Cas9 genoma editatzeko teknika
  - 3.2.10.1. sgRNAren *in silico* diseinua
  - 3.2.10.2. Bektorearen eraketa
  - 3.2.10.3. Bakterioen transformazioa eta hautespena
  - 3.2.10.4. Balidazio funtzionala
  - 3.2.10.5. Klonen hedapena
- 3.2.11. Emaizen analisia

#### 4. EMAITZAK

- 4.1. Lotura hertsien bidezidorraren analisia eritasun zeliakoan
  - 4.1.1. Adierazpen analisiak
  - 4.1.2. Koadierazpen analisiak
  - 4.1.3. Gliadinaren eragina lotura hertsien menpeko epitelio hesian
- 4.2. EZrekiko suszeptibilitatea emendatzen duten eta LHekin erlazionatuta dauden geneen identifikazioa
  - 4.2.1. Asoziazio analisiak
  - 4.2.2. Asoziatutako eremuaren karakterizazioa
    - 4.2.2.1. Inguru genomikoa: *MAGI2ren* eta *RP4-587D13.2ren* karakterizazioa

4.2.2.2. *MAGI2ren* eta *RP4-587D13.2ren* adierazpen analisia eritasun zeliakoan

4.2.2.3. *MAGI2ren* isilarazpenak eta gliadinaren kitzikapenak LHko geneen adierazpenean duten eragina

4.3. EZn alterazio iraunkorra aurkezten duten LH geneen edizio genetikoa

4.3.1. Gene edizioen balioztatzea

4.3.2. Anlisi funtzionalak

5. EZTABAIDA

6. ONDORIOAK

7. BIBLIOGRAFIA

8. ERANSKINAK





## LABURDURAK

AL	aingurapen-loturak
APC	(antigen presenting cell) zelula antigeno aurkezlea
CEGEC	Eritasun Zeliakoaren Genetikaren Espainiako Partzuergoa
EGFR	(epidermal growth factor receptor) hazkunde faktore epidermikoaren hartzailea
EMA	(anti-endomysium autoantibodies) anti-endomysio autoantigorputzak
EpCAM	(epithelial cell adhesion molecule) zelula epiteliaren atxikitze molekula
ESPGHAN	(European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition) Gastroenterologia, Hepatologia eta Elikadura Pediatrikoaren Europako Elkarte
eQTL	(expression quantitative trait loci) lokusaren ezaugarri kuantitatiboa adierazpenean
EZ	eritasun zeliakoa
FBS	(fetal bovine serum) behi-sero fetala
GGD	glutenik gabeko dieta
GL	gardeinadura-loturak
GWAS	(Genome Wide Association Study) Genoma Osoko Asoziazio Azterketa
HLA	(Human Leucocyte Antigen) Giza Antigeno Leukozitarioa
IELs	(intraepithelial lymphocytes) epitelio barneko infozitua
JAM	(junctional adhesion molecule) juntadurazko atxikipen molekula
KIR	(Killer Immunoglobulin-like receptor) immunoglobulina moduko hartzaile hiltzailea
LD	(linkage disequilibrium) lotura desoreka
LH	lotura hertsia
lncRNA	(long non-coding RNA) RNA ez-kodetzaile luzea
LY	lucifer Yellow
MHC	(Major Histocompatibility Complex) Histokonpatibilitate Konplexu Nagusia
NFkB	(Nuclear kappa B transcription factor) Nukleoko Kappa B transkripzio faktorea
OR	(odds ratio) aukera-arrazaia
PCR	(polymerase chain reaction) polimerasaren kate-erreakzioa
RA	(rheumatoid arthritis) artritis erreumatoidea
RPLPO	(large ribosomal protein) erribosomako proteina handia
RT-qPCR	(real-time quantitative reverse transcription PCR) denbora errealeko PCR kuantitatiboa
SD	(standard deviation) desbideraketa estandarra
SNP	(Single Nucleotide Polymorphism) Nukleotido Bakarreko Polimosfismoa
T1D	(type 1 diabetes) 1 motako diabetesa
TEER	transepithelial electrical resistance
TF	(transcription factor) transkripzio faktorea
TG2	(transglutaminase) transglutaminasa
TGA	(transglutaminase autoantibodies) anti-transglutaminasa autoantigorputzak
TLR	(toll-like receptor) toll moduko hartzailea

## **ARGITALPEN ORIGINALEN ZERRENDA**

Jauregi-Miguel A, Fernandez-Jimenez N, Irastorza I, Plaza-Izurieta L, Vitoria JC, Bilbao JR. Alteration of tight junction gene expression in celiac disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2014 Jun;58(6):762-7.

Jauregi-Miguel A, Santin I, Romero-Garmendia I, Garcia-Etxebarria K, Sebastian M, Irastorza I, Castellanos-Rubio A, Bilbao JR. The Tight Junction adapter protein MAGI2 locus is involved in celiac disease. (Prestatzen)

## **PROIEKTUAREN JUSTIFIKAZIOA ETA GARRANTZIA**

Eritasun zeliakoa (EZ), prebalentzia altuko gaixotasun immunitario kronikoa da. Eritasun horren desagerpenerako ezinbestekoa izango da prebentzioa, eta helburu horrekin, diagnostiko goiztiarra baimenduko duten aurreikuste tresna eraginkorrak garatu behar dira. Denboraren eskalan, sintoma klinikoan agerpena eritasunaren garapen prozesuaren egoera aurreratu kontsidera daiteke. Eritasun aktiboaren fase horren aurretik, predispozizio genetikoa duten indibiduoetan hesteetako iragazkortasun emendatua eta erantzun immunitarioak eragindako heste-ehunaren suntsipenaren adierazle diren markatzaileak antzeman daitezke. Haien adibide izan daitezke tTGren (ehunetako transglutaminasa) aurkako zirkulazioko autoantigorputzak.

Hau dela eta, eritasunarekiko suszeptibilitatearen atzean dauden geneen identifikazioa ezinbestekoa da. Alde batetik, EZren garapenean eragina duten mekanismo patogenikoak ulertzeko eta beste aldetik, eritasuna pairatzeko arriskua duten indibiduoak identifikatzea ahalbidetuko luketen markatzaile genetikoak lortzeko. Markatzaile horiek lortuz gero diagnostiko aurreko predikzioa burutzea posible izango da, erantzun autoimmunitarioa hasi baino lehen, eta horrek prebentzio saiakuntzak burutzeko hautagaien aukeraketa erraztuko luke.

Eritasun autoimmunitario konplexu horren Genetika ulertzeko helburuarekin, eritasun zeliakoan potentzialki patogenikoa den lotura hertsien bidezko hesteetako iragazkortasunaren azterketa burutu da, ikerketa genetiko eta funtzionalen bidez partaide genetiko funtzionalak identifikatuz.



# **1. Sarrera**



## 1. Eritasun zeliakoa

Glutenarekiko sentikorra den enteropatia (MIM 212750) edo eritasun zeliakoa (EZ) gaixotasun kroniko eta inflamatorioa da, eta bere ezaugarriak nabarmenena heste meharreko biloxken zapaltzea da, dietan hartutako gariaren glutenarekiko zein zekale eta garagarrean agertzen diren antzeko proteinekiko intolerantzia dela medio.

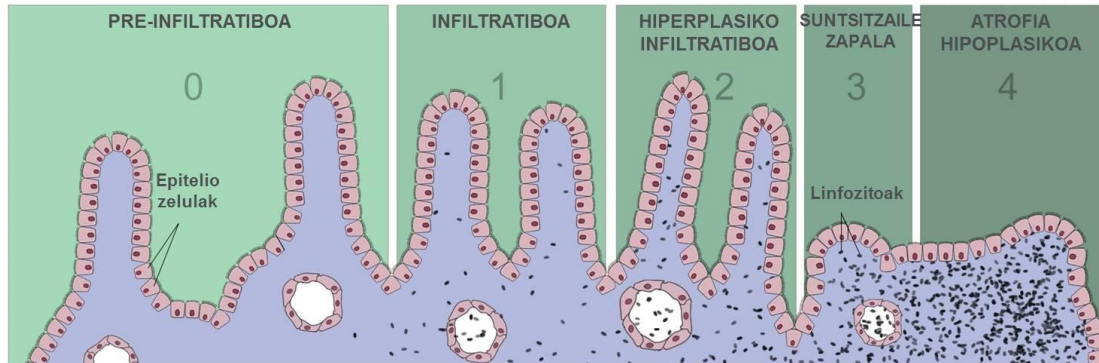
### 1.1. Ezaugarri klinikoak eta diagnostika

Dietan hartutako glutenaren eragin kaltegarriak 1950era arte antzeman ez ziren arren [1], EZren agerpen klinikoen lehenengo irudi orokorrak 60 urte lehenago ikusi zuen argia [2]. Tratatu ezean, honako sintomak aurkeztu ohi ditu EZk: batetik, heste meharrari dagozkion ezaugarriak, hala nola, beherakoa, distentsio abdominala edota goragalea, eta bestetik, malabsortzioak eragindakoak, garapenari dagozkionak (pisu baxua, gantzik eza, ilearen fintasuna) edo urritasun psikomotorrari dagozkionak (giharren ahultzea...), besteak beste [3]. EZri bestelako zenbait sintoma atipiko ere egotzi izan zaizkio. Horien artean asaldura neurologikoak, hortzetako esmalteko akatsak, antzutasuna, osteoporosia, giltzadura mailako sintomak eta gibealeko entzimen kontzentrazio altuak dira nabarmenenak [4].

Ikuspuntu histologikotik, suszeptibilitatea duen pertsonak glutendun dieta hartzen duenean, heste meharraren mailaz mailako endekatzea gertatzen da. Prozesu horren emaitza biloxken atrofia eta kripten hiperplasia ezaugarri dituen hestearen lesioa izaten da (1. irudia). Glutenak eragindako hesteko mukosaren kaltearen maila eta larritasuna Marsh-Oberhuber sailkapenean dago definituta; horren arabera, heste osasuntsu eta normala Marsh 0 mailan dago eta mukosaren atrofia hipoplasikoa Marsh IV-ean [5]. Laburbilduz, gaixotasunaren hasieran epitelio barneko linfuzitoen infiltrazioa ikus daiteke (Marsh I). Ondoren, kripten hiperplasia gertatzen da (Marsh II) biloxken tamaina mantendu arren. Estadorik aurreratuean (Marsh III), kripten hipertrofiaz gainera, lamina propria hanpatuta dago eta biloxken atrofia partziala, ia osoa edo osoa gertatzen da (1. irudia). Hesteko gertaerez gain, EZn glutenaren menpeko diren

hainbat autoantigorputz ere agertzen dira, anti-endomisiko (ingelesez *anti-endomysium autoantibodies* edo EMA) edo anti-transglutaminasa (ingelesez *anti-transglutaminase autoantibodies* edo TGA) kasu [6].

#### GOI JEJUNOAREN MUKOSAREN IMMUNOPATOLOGIA



1.irudia: Glutenak induzitutako aldaketak estadio ezberdinetan, Marsh sailkapenaren arabera. [www.theglutensyndrome.net](http://www.theglutensyndrome.net) orrialdetik moldatua.

Ezaugarri patologiko horiek kontuan hartuta, Gastroenterologia, Hepatologia eta Elikadura Pediatrikoaren Europako Elkarteak (ingelesez *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition* edo ESPGHAN) irizpide diagnostikoak finkatu ditu. Orain dela gutxi arte, kriterio horiek heste meharreko biopsietako kalte histologiko eta emaitza serologiko positiboetan oinarritu dira (azken horiek ezinbesteko izan ez badira ere) [7], baina badira bost urte irizpide diagnostiko berriak onartu zirela. Azken horien arabera, antigorputzek eta ezaugarri klinikoek lehenetsuna dute eta duodenoaren biopsia egiteari utz dakioke baldin eta haurra sintomatikoa bada eta bere IgA motako TGA mailak normaltasunaren atalasea baino 10 aldiz altuagoak badira. Giza Antigeno Leukozitarioaren (ingelesez *Human Leukocyte Antigen* edo HLA) genotipoa aztertzea ere oso baliagarria izan daiteke, EZ oso ezohikoa delako arrisku alelo genetikorik gabe [8].

### 1.2. Epidemiologia

Aurreko mende bukaerara arte, EZ ezohiko gaixotasuntzat hartzen zuen komunitate zientifikoak, europar jatorriko pertsonak modu ia esklusiboan pairatzen zutelaren zehaztasunak. Test serologiko berrien hedatzeak EZren maiztasunaren estimazio zehatzagoak ekarri ditu eta EZ mundu osoan banatuta



dagoela eta %1eko maiztasuna duen gaixotasun arrunta dela ikusi da [9, 10]. Dena den, eskualdeen artean maiztasunen ezberdintasun zabalak daude, Europan barne (Alemanian maiztasuna %0,3koa den bitartean Finlandian %2,4koa da) [11, 12].

Mendebaldeko dieta modernoaren hedapenarekin batera, glutendun zerealak eta bereziki garia, munduko leku guztietara iritsi dira eta EZ Osasun Publikoko arazo bihurtu da, baita garapen bidean dauden herrialdeetan ere [13], oso arrunta izanez Afrika iparraldean [14] eta Ekialde hurbilean [15]. Gainera, dietaren mendebaldartzea, gariaren ekoizpenean eta prestaketan aldaketak, gaixotasunarekiko kontzientzia, edota faktore guztien konbinazioa EZren maiztasunaren emendioa eragiten ari dira [16-18]. Adibidez, zenbait ikerlanek iradoki dutenez, EZren haurtzaroko agerpenaren maiztasuna haziz joan da 1980 eta 1990eko hamarkadetan zehar, eta hazkunde hori umeen elikadura irizpideekin erabat lotuta dagoela ikusi da [19]. Bestetik, diagnostikoek helduengan ere gora egin dute informazioa eskuragarri dagoen lurraldeetan. Genetikoak ez diren arrisku faktoreen artean urtaroen araberako patriiak dituzten faktoreak eta zenbait infekzio biriko aipatu izan dira [20].

Genero ikuspuntutik, emakumeek gizonak baino maizago pairatzen dute (proportzioa 3:1 arrazoiria iristen da garai emankorrean dauden gaixoen artean) [21].

### **1.3. Tratamendua**

Egun, tratamendu eraginkor bakarra biziarteko glutenik gabeko dieta (GGD) hertsia da, gari, zekale eta garagarraren produktuak dietatik ezabatuz [3, 22]. Sintomen hobekuntza edo desagertzea, egun edo aste batzuen buruan gertatzen da eta markatzaile serologikoen eta duodenoaren atrofiaren normalizazioa aldi berean ikus daitezke maiz [23]. Nolanahi ere, GGD zorrotza betetzea ez da erraza eta bizi kalitatea gutxitzen du [24]. Tratamendua modu zorrotzean jarraitzen ez bada konplikazioak ager daitezke, hala nola, garaiera baxua, desnutrizioa, osteoporosia, gaixotasun autoimmunitario sekundarioak, minbiziak eta zailtasunak haurdunaldian [25]. Gainera, gaixoen proportzio txiki batek ez dio tratamenduari ondo erantzuten eta EZ errefraktarioa garatzen du,

hau da, nahiz eta GGD hertsian egon, sintoma iraunkor edo errepikakorrak agertzen dituzte eta heste hantura eta biloxken atrofia kronikoa izaten dute [26]. Hori guztiagatik, seguruak, eraginkorrak eta eskuragarriak diren terapia alternatiboen garapena ezinbestekoa da.

EZren patologiarri buruzko ezagutza handitzen joan den heinean, GGDren ordezeko edo osagarri izan daitezkeen terapia berriak sortu dira [27]. Hainbat droga garapen eta azterketa fase ezberdinetan daude, larazotido azetatoa eta latiglutenasa, besteak beste. Lehenak lotura hertsia (LH) erregulatzen ditu, gliadinak heste epitelioa zeharkatzea saihestuz, eta bigarrenak, hainbat entzimen nahasturaren bidez glutenak eragiten dituen kalte patologikoak ekidin bide ditu. *Lamina propria* gertatzen den prozesu immunologikoa indargabetuko lukeen txerto baten garapena ere martxan dago jada [28].

## 2. Eritasun zeliakoaren Genetika

EZren herentzia patroia oraindik ezezaguna bada ere, Genetikak gaixotasun honekiko suszeptibilitatean parte hartzen duela aspalditik jakina da. Familietan egindako prebalentzia ikerketak eta bereziki, bikiak konparatu dituztenak, berebizikoak izan dira ingurumen faktoreen eta faktore genetikoek ekarpenak zenbatekoak diren estimatzeko. Azterlan horien arabera, Genetika funtsezkoa da EZren hasieran zein garapenaren fase guztietan.

Orokorrean, komunitate zientifikoak EZren agerpenean bat datozen biki monozigotikoen proportzioa %75-86koa dela onartzen du. Biki dizigotikoen kasuan, aldiz, kopuru hau nabarmenki jaisten da, %16-20ra arte, hain zuzen. Biki mota bien konkordantzia desberdintasunek EZren osagarri genetikoak estimatzen lagundu dute eta orain arte bestelako gaixotasun autoimmunitarioetan behatutakoa baino pisuzkoagoa dela argi utzi dute. Adibidez, 1 motako diabetesean (ingelesez *Type 1 Diabetes* edo T1D) osagarri genetikoak baxuagoa da (biki monozigotiko eta dizigotikoen konkordantzia %30ekoa eta %6koa, hurrenez hurren) [29]. Gainera, anai-arreben eta biki dizigotikoen arteko konkordantzia ratioak oso antzekoak dira EZn eta beraz, ingurumen faktoreek ekarpen minimoa dutela ondoriozta daiteke.

Laburbilduz, azken urtetan jasotako ebidentziek EZk osagarri genetiko oso garrantzitsua duela eta gaixotasunaren heredagarritasuna (faktore genetikoei egotzi ahal zaien EZ pairatzeko arriskuaren proportzioa, ingurumen faktoreei egotzi ahal zaienarekin alderatuta, beti ere) %87 ingurukoa dela aditzera eman dute [30]. Arrisku genetikoaren parterik handiena HLA-DQ2 edota HLA-DQ8 aleloren presentziari dagokio. Dena den, eta gaixotasunaren patogenesisian HLA molekula horien papera oinarrizkoa bada ere, herentziari egiten dioten ekarpena ez da oso handia. HLA lokus klasikoek ekarpena arrisku genetikoaren %23a dela kalkulatu da, eta berriki aurkitu diren 5 HLA aldaeren %18ko ekarpenarekin batera [31], EZrekiko arriskuaren %40a azaltzen dute. Beraz, HLA lokusetik kanpo eragin txikiko lokus ezezagun ugari beharrezkoa direla ondorioztatu da.

## **2.1. HLA eremua eta eritasun zeliakoa**

### **2.1.1. HLA eremua**

HLA da gizakian Histokonpatibilitate Konplexu Nagusiak (ingelesez *Major Histocompatibility Complex* edo MHC) hartzen duen izena; 6p21 eremu kromosomikoko superlokusean dago eta immunitate-sistemarekin zerikusia duten gene ugari dauzka. HLA geneek giza zelula gehienetan adierazten diren proteina antigeno-aurkezleak kodetzen dituzte. Horiek ezinbestekoak dira molekula exogeno eta endogenoen artean bereizteko.

HLA geneek gaixotasun autoimmunitario eta inflamatorio askotan parte hartzen dute, eta malaria edo hiesa bezalako eritasun infekziosoak pairatzeko arriskua emenda dezakete ere. Hala ere, gene talde zabal horrek eragindako suszeptibilitatea azaltzen dituzten faktore genetiko zehatz eta mekanismo patogeniko gehienak ezezagunak izaten segitzen dute egun, eremuko konplexutasun genetiko handia dela eta. Izan ere, HLAk genoma osoko gene dentsitaterik altuena eta adierazpen maila goratua ditu [32].

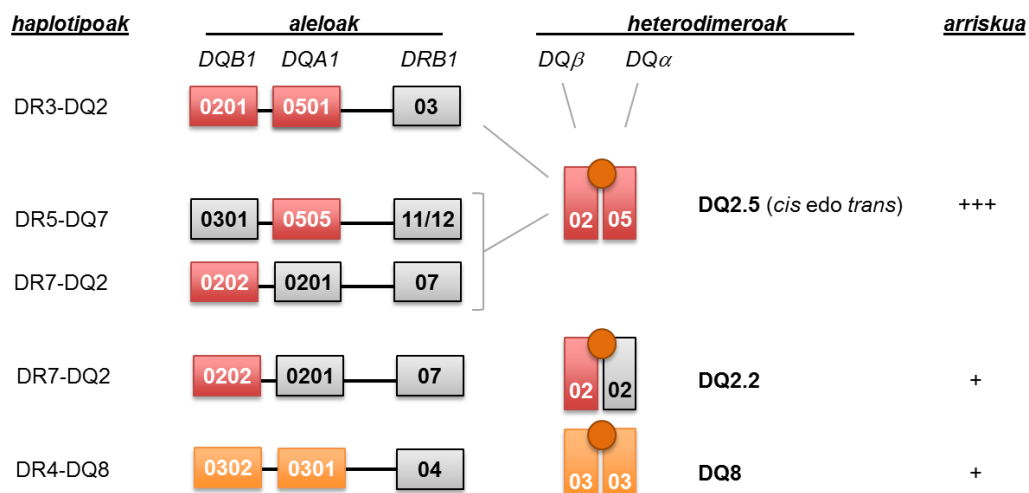
### **2.1.2. Suszeptibilitate geneak eta arrisku genetikoa**

Lehen esan bezala, HLA suszeptibilitate eremurik garrantzitsuena da eta gaixotasunaren osagarri genetikoaren %40 inguru (%23 aldaera klasikoak eta

%18 berriak) azaltzen du. HLA eta EZren arteko lehenengo asoziazioaren ebidentziek 1973an ikusi zuten argia [33]. Eremuko lotura desoreka (LD) indartsua dela eta, lehenengo azterketek HLA-A1, HLA-B8 eta HLA-DR3 identifikatu zituzten aldaera etiologiko modura, baina beranduago publikatutako ikerlanek modu zuzenean inplikaturiko faktoreak HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 kodetzen dituzten II klaseko HLA geneak direla erakutsi dute (2. irudia). HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 aldaerak lotura desorekan daude HLA-DR3 eta HLA-DR4rekin, hurrenez hurren, eta hori dela eta, askotan, arrisku aleloek HLA-DR3-DQ2 eta HLA-DR4-DQ8 haplotipoen izenak hartzen dituzte [34].

HLA-DQ heterodimeroen funtzio nagusia T zelulei antigeno exogenoak (EZren kasuan glutena) aurkeztea da. Polimorfismo genetikoek heterodimeroen lotura gunea aldarazten dute, bertara modu eraginkorrean lotu daitezkeen peptidoen multzoan eraginez. EZn, eremuko asoziaziorik indartsuena HLA-DQ2rekikoa da eta gaixoen %90ak HLA-DQ2.5 heterodimeroaren kopia bat dauka gutxienez (heterodimeroaren  $\alpha$  eta  $\beta$  kateak kodetzen dituzten HLA-DQB1\*02 aleloek osatuta).

HLA-DQ2 eramaileak ez diren gaixo gehienek HLA-DQ8 daramate eta ondorioz, gutxienez, DQA1\*03:01 eta DQB1\*03:02 aleloak kodetzen dituen haplotipoaren kopia bat [4]. Pazienteen proportzio txiki bat HLA-DQ2 zein HLA-DQ8rako negatiboa da, baina kasu gutxi hauetan ere, gaixoak HLA-DQ2 molekula kodetzen duten aleloetako baten eramaileak direla ikusi da (HLA-DQA1\*05 edo HLA-DQB1\*02) [35, 36].



2. irudia: HLA lokusaren eta EZren arteko asoziazioa. HLA-DQ2 molekula EZ garatzeko arrisku faktorerik garrantzitsuena da. Gaixo zeliako gehienek HLA-DQ2.5 heterodimeroa adierazten dute, HLA-DQA1\*05 ( $\alpha$  katea) eta HLA-DQB1\*02 ( $\beta$  katea) aleloek kodetuta. Alelo hauek cis eran ager daitezke, DR3-DQ2 haplotipoan, edo trans eran, DR5-DQ7 eta DR7-DQ2.2 heterozigotoetan. HLA-DQ2.2 dimeroak, HLA-DQA1\*02:01 eta HLA-DQB1\*02:02 aleloek kodeturiko HLA-DQ2ren aldaerak, hain zuzen, gaixotasuna garatzeko arrisku txikia ematen du. DQ2 negatiboak diren paziente gehienek DR4-DQ8 haplotipoak kodetzen duen HLA-DQ8 adierazten dute. (Abadie et al., Annu Rev Immunol (2011) artikulutik moldatuta [37]).

EZrekiko suszeptibilitate mailaren eta HLA-DQ2.5 heterodimero kopuruaren arteko harremana ere ikusi da. Bi HLA-DR3-DQ2 haplotipoaren eramaile homozigotoak batetik, eta DR3-DQ2/DR7-DQ2 heterozigotoak bestetik, HLA-DQ2.5 mailarik altuenak adierazten dituzten indibiduoak dira eta beraz, EZ pairatzeko arriskurik handiena ematen duten genotipoen eramaileak [38-40]. Zentzu horretan, aipagarria da EZ errefraktarioa duten pazienteek (GGDren aurrean erantzuten ez dutenak, hain zuzen) maizago agertzen dutela HLA-DR3-DQ2 haplotipoa homozigosian (%44-62) beste gaixo zeliakoekin alderatuta (%20-24). HLA-DQ8 molekulekin ere, dosiaren menpeko antzeko efektua ikusi izan da.

DQ molekulak kodetzen dituzten geneez aparte, HLA eremuak baditu immunitate-sisteman parte hartu eta EZ pairatzeko arriskua emenda dezaketen beste gene asko ere. MHC eskualde osoan egindako mapaketa zehatz batean HLA-DQ geneen bi alboetara arrisku aldaera berriak identifikatu ziren, telomero aldera I klaseko HLA eskualdean eta zentromero aldera HLA-DPB1 genean. Lehen esan bezala, aldaera berri hauek EZn suszeptibilitate genetikoaren % 18a azaltzen dute [31].

Nahiz eta HLA geneek berebiziko ekarpena egin suszeptibilitate genetikoari, zeliakoa ez den populazioaren %20-30ak HLA-DQ2 aldaera aurkezten du eta beraz, HLA geneak garrantzitsuak izan arren gaixotasuna garatzeko nahikoak ez direla esan daiteke [41].

## 2.2. HLA eremutik kanpoko arrisku genetikoa

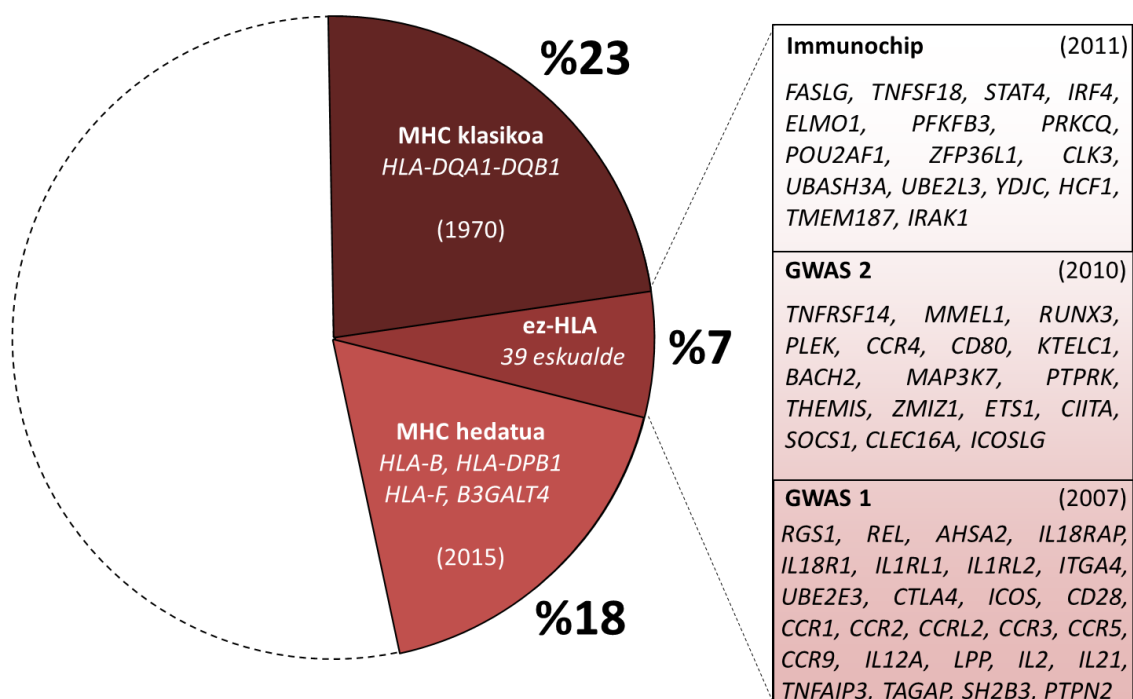
HLAk osagai genetikoaren %40a soilik azaldu dezakeenez, esfortzu handia egin da HLA eremutik kanpo egon daitezkeen eta EZren Genetika konplexua argitzen lagundu dezaketen suszeptibilitate geneen bilaketan. Hasiera batean bi estrategia erabili ziren helburu honetarako: 1) afektatutako familietan lotura ikerketak eta 2) populazioaren baheketan oinarritutako asoziazio ikerketak. MHC lokusean izan ezik, lotura ikerketen emaitzak kontraesankorrak izan dira. Hala ere, HLAz (CELIAC1) gain, hiru eskualde kromosomiko agertu ziren ikerketa baten baino gehiagotan EZri lotuta: 5q31-33 (CELIAC2), 2q32 (CELIAC3; *CD28*, *CTLA4* eta *ICOS* T linfzito erregulatzailerak zituenak) eta 19p13 (CELIAC4; *MYO9XB* miosinaren genea zuena) [42].

Azken hamarkadan, errendimendu handiko teknologien garapenak genoma osoko asoziazio (ingelesez *Genome Wide Association* edo GWA) azterketak ahalbidetu ditu, gaixotasun konplexuen azterketa genetikoak bideratzeko modua erabat aldatuz. GWA azterketak, markatzaile genetiko asko DNA lagin multzo handietan (kasu-kontrol) aztertzeko tresna oso baliagarriak dira, batez ere gaixotasun zehatzekin asoziatutako aldaera genetikoak aurkitu eta aztertzeko helburuarekin. Ikerketa horiek bereziki erabilgarriak dira populazioan arruntak diren eritasun genetiko konplexuetan eragina duten nukleotido bakarreko polimorfismoak (ingelesez *Single Nucleotide Polymorphism* edo SNP) aztertzen ditugunean, EZren kasuan bezala.

EZn bi GWA azterketa burutu dira, bat 2007an eta bestea 2010ean. Guztira, 5.000 kasu eta 10.000 kontrol inguru aztertu ziren eta HLA eremutik kanpo dauden 26 eskualde gaixotasunarekin asoziatutako daudela ikusi zen [43, 44]. Urtebete beranduago, Immuchip izeneko plataformaren bidez 12.000 kasu eta 12.000 kontrol genotipatu ziren. Kasu honetan, immunitatearekin erlazionatutako 10 gaixotasun ezberdinetan asoziatuta dauden 186 lokusen mapaketa fina burutu zen. Azken hurbilketa horretan, EZri asoziatutako 13 eskualde berri identifikatu ziren [45].

Guztira, HLAtik kanpoko 39 eskualde genomiko asoziatu dira EZrekin. Asoziatutako SNP guztiak polimorfismo arruntak dira (alelo txikiaren

populazioko maiztasuna >%5) eta gaixotasuna garatzeko arriskuan eragin apala dute (OR: 1,2-1,5). Aldiz, ez da baieztatu arriskuan eragina duten aldaera arraroen inplikaziorik, *NCF2* geneko rs17849502 aldaera ez-sinonimoa izan ezik, arriskuaren handipen txiki batekin asoziatu baita [46]. Eskualde horietako 19 eremuetan gene hautagaiak nabarmendu diren arren, asoziatutako 3 SNP besterik ez daude exoi baten barnean, eta proteina trunkatzeko ahalmena dute. Gene hautagai horietako batzuk aukeratu dira asoziatutako SNPak 5' edo 3' inguruko eremu erregulatzailean daudelako (3. irudia).



**3. irudia: Aurrerapenak EZren Genetikan. ImmunoChip ikerlanaren ostean, gaixotasuna garatzeko arriskuan parte hartzen duten 40 lokus identifikatu dira. Dena den, asoziazio hauen kausa diren aldaera espezifikoak ezezagunak izaten jarraitzen dute. Horrela, azterketa funtzionalak beharko dira asoziazio lan erraldoi hauen aplikazioak zeintzuk izan daitezkeen argitzeko.**

GWA eta jarraipen azterketak suszeptibilitate lokusak identifikatzeko estrategia arrakastatsuak izan diren arren, aurkitutako aldaerek gaixotasunaren ekarpen genetikoaren proportzio txikia azaltzen dute, arriskuan parte hartzaile diren lokus gehienak identifikatzeko geratzen direlarik. Gainera, LD indartsuaren eraginagatik, identifikatutako SNPak ez dira gaixotasunaren benetako eragile izango, zehatzago behatu behar diren eremu asoziatuen markatzaileak baizik.

Bestalde, asoziatutako SNP gehienak (%80 inguru) sekuentzia kodetzaileetatik kanpo kokatuta daude (gune erregulatzailerik edo gene arteko eremuetan) eta horregatik, euren funtzioa geneen adierazpenaren erregulazioarekin loturik dagoela ondorioztatu da. Hau dela eta, EZrekin asoziatutako aldaerak, mRNA edo proteinen adierazpen mailak erregulatzeko dituzten lokusetan (ingelesez *expression Quantitative Trait Loci* edo eQTL) kokatuta daudela proposatu da.

RNAren sekuentziaziorako edo RNAseq teknika berriak eskualde ez-kodetzaileetako transkriptoak identifikazioa baimendu du [47]. RNA ez-kodetzaile luzeak (ingelesez *long non-coding RNA* edo lncRNA) 200 nukleotido baino gehiagoko RNA molekula luzeak dira eta ez dute proteina kodetzeko ahalmenik. Haien funtzioa, geneen adierazpena erregulatzeko dela proposatu da, horretarako mekanismoak oraindik guztiz argitu ez diren arren. Gaixotasun autoimmunitarioekin asoziatutako eremu genomikoen adierazpen analisien arabera, lncRNA ugari dago bertan, GWA azterketen emaitzak interpretatzeko ezinbestekoak izango direla iradokiz. Gainera, lncRNAtan dauden zenbait SNPen eQTL efektua frogatu da [48]. Horren adibide funtzionala da EZrekin asoziatutako rs917997 SNPa daraman LNC13 lncRNA. LNC13ak NFkB bidezidorrerako hainbat gene gako erregulatzeko ditu eta SNParen arrisku aleloak LNC13ren funtzioa eraldatzen du gene horien adierazpena emendatuz [49].

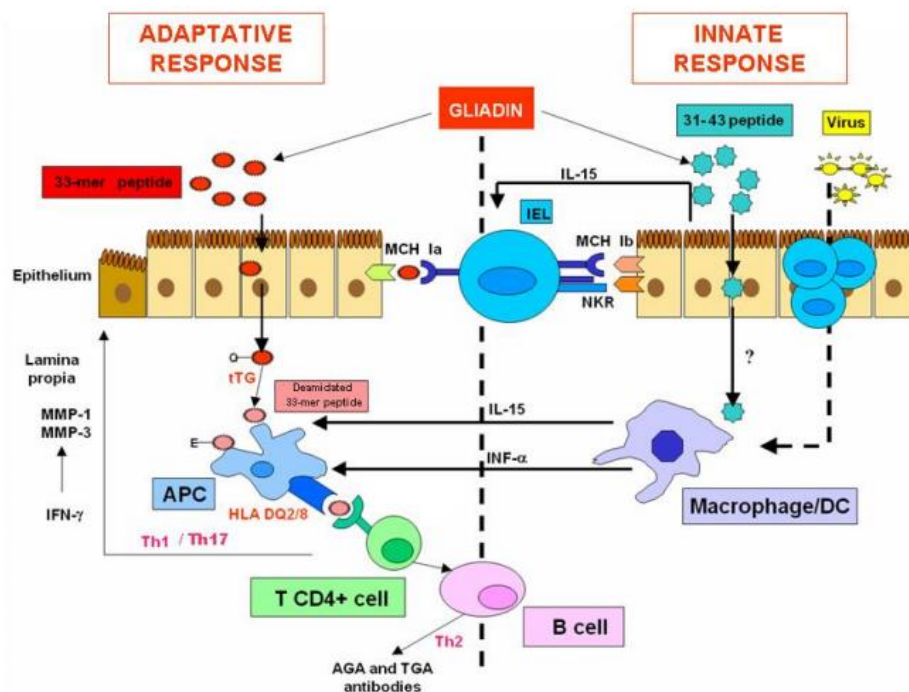
Laburbilduz, EZren Genomika guztiz ulertu gabe jarraitzen dugu, eta gutxi gorabehera, arrisku genetikoaren erdia da ezaguna. Beraz, genomaren erregulazio sistema konplexuan partaide diren elementuak identifikatzeko daude eta atea irekitzen diete etorkizunean burutuko diren beste hainbat ikerketei, non ikertzaileek azterketa sakonak burutu beharko dituzten aldaera mota desberdinak (hala nola aldaera estrukturalak eta epigenetikoak) zein genoma ez kodetzaile zabala aztertzeko. Asoziatutako polimorfismoen ondorio biologikoak ulertzea zeregin konplexua eta zaila da eta badirudi hori ebaztetik urrun gaudela oraindik [50].



### 3. Eritasun zeliakoaren patogenesisia

Azken urteetan aurrerapen handiak egin dira EZren garapenean parte hartzen duten mekanismoen ezagutzan eta honen ondorioz, egun, EZ da HLArekin erlazionaturiko gaixotasunen artean hobekien ezagutzen duguna. Hala ere, zenbait prozesu patogeniko oraindik azaltzeke daude.

T zelulek EZn parte hartzen dutela aspalditik da ezaguna: gliadinaren peptidoek epitelia zeharkatzen dute, eta *lamina propria* iristean, ehunetako transglutaminasak (TG2) desamidatu egiten ditu. HLA-DQ2 edota HLA-DQ8 hartzaileak zelula antigeno aurkezleak (ingelesez *Antigen Presenting Cell* edo APC), desamidatutako peptidoak CD4+ T zelula patogenikoei aurkezten dizkiete eta horren ondorioz, *lamina propria*ren infiltrazioa, kripten hiperplasia eta biloxken atrofia eragingo dituen Th1 erantzuna abiaraziko da [51]. Dena den, azken hamarkadetako hainbat azterlanek erakutsi dutenez, berezko immunitate-sistemak ere berebiziko garrantzia, eta badirudi gliadina gai dela T zelulen menpeko ez den erantzuna aktibatzeke [52, 53] (4. irudia).



4. irudia: Eritasun zeliakoaren mekanismo patogenikoak: adar immunitario egokitzaila eta berezkoak. (Castellanos-Rubio et al. (2010) [54]).

### 3.1. Glutena

Glutena alkoioletan disolbagarria diren glutenina monomeroen eta prolaminan aberatsak diren gliadina polimerikoen nahastura da eta gari, zekale eta garagarrean aurki daiteke. EZ suszeptibilitate genetikoa duten indibiduoek pairatzen dute eta dietako glutenaren proteinekiko kontaktuaren ondorioz garatzen da. Hesteko proteasek ez dira proteina horiek guztiz endekatzeko gai eta 10-15 aminoazidoko peptidoak geratu ohi dira hesteko lumenean. Proteina zati horiek transglutaminasaren substratu egokiak dira, eta entzima horrek desamidatu egiten ditu, HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 molekulekiko beraien afinitatea areagotu eta CD4+ T zelulek gidatzen duten Th1 erantzuna sustatzen direlarik. Gliadinatik eratorritako peptidoen artean,  $\alpha$ -gliadinaren 33-meroa (33 aminoazidoko polipeptidoa) identifikatu den T zelulen kitzikatzaile immunogenikoa da.

Bestalde, glutenak CD8+ T zelulen erantzuna ere ekar dezake, HLArekiko independentea den mekanismo baten bidez epitelioko barneko linfuzitoen (ingelesez *intraepithelial lymphocytes* edo IEL) populazioa emendatuz [28,32]. Hesteko biopsien kulturetan, zelula antigeno aurkezle primarioetan nahiz epitelioko zelula lerroetan eta monozito desberdinetan burututako zenbait *in vitro* azterketek ideia hau indartu dute, eta gliadinaren 31-43 peptidoak (31-43 arteko aminoazidoak hartzen dituen) berezko immunitate-sistema kitzika dezakeela ikusi da [51, 55].

### 3.2. Transglutaminasa

Esan bezala, ehunetako transglutaminasa edo TG2 entzimak gliadinaren peptidoen eraldaketa eragiten du, peptidoen HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 molekulekiko afinitatea emendatuz [56]. Eritasun zeliakoan, glutenak TG2ren aurkako IgA klaseko autoantigorputzen (TGA) ekoizpena indusitzen du. Bi proteinen arteko glutamina-lisina lotura itzulezin eta kobalenteak katalizatzen ditu [57, 58]. Glutena prolina eta glutaminetan aberatsa da eta gainera HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 molekulekin interakzionatzeko beharrezkoak diren aminoazido negatibo gutxi ditu. Zitokinen tokiko ekoizpen masiboa eragin eta enterozitoen desberdintzapena eta proliferazioa abiarazi ahal izateko, TG2

entzimak glutenetik eratorritako peptidoak desamidatu behar ditu [59-61]. Bestetik, TG2k katalizatutako erreakzioan parte hartzen duten peptidoek eta entzimak berak, TG2-gliadina konplexuak eratzen dituzte, TGA autoantigorputzen ekoizpena bultzatuz [62].

TGA antigorputzek patogenesisian eta hesteko mukosaren ohiko lesioan parte hartzen duten argitzeke dago. EZn agertzen diren autoantigorputzek apoptosian, angiogenesisian eta heste iragazkortasunean inpaktu biologikoa dutela ikusi da eta beraz, TG2 patologian paper garrantzitsua izan dezakeela iradoki da [62, 63].

### 3.3. Immunitate-sistema egokitzailea

Immunitate-sistema egokitzaileak T zelulen bidezko immunitatea eta immunitate humoralak indutzen ditu, eta biak ala biak EZ pazienteen heste meharreko mukosan aktibatzen dira, gliadinaren estimuluz. Hesteko CD4+ T linfozitoek, APC HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 heterodimeroek aurkezten dizkieten desamidatutako gliadina peptidoak ezagutzen dituzte [64, 65]. Gliadinarekiko espezifikoak diren mukosa zeliakoko T zelulak Th1 fenotipokoak dira batez ere eta hantura sustatzen duten zitokinak ekoizten dituzte, IFN $\gamma$  kasu [66, 67]. IFN $\gamma$ -z gain, IL-18 eta IFN $\alpha$  ere gainadierazita daude [68-70]. IL6 eta TGF $\beta$ ren presentzian desberdintzatu eta interleukina 17 ekoitz dezakeen bestelako CD4+ T zelula laguntzaileen lerroa (Th17 linfozitoak) identifikatu da, eta ikusi denez, lehen IL12/IFN $\gamma$  sareari egozten zitzaizkion hainbat funtzioaren erantzulea da [71]. Th1 eta Th17 erantzunek gaixotasun aktiboan parte hartzen dute, beste zenbait gaixotasun autoimmunitario batzuetan ikusi den moduan [72-74].

### 3.4. Berezko immunitate-sistema

Berezko erantzun immunitarioa patogenoen aurkako lehen harresia da eta agente infekziosoekin topo egin osteko lehenengo estadioetan aktibatzen da. EZn, berezko immunitate-sistemak T $\alpha$  $\beta$  linfozitoekiko era independentean aurre egiten dio gliadinaren estimuluari, eta gerora sortuko den T zelulen aktibaziorako inguru proinflamatorio egokia sortzen laguntzen du. Zenbait *in vivo* azterketek erakutsi dutenez, gliadinaren 31-43 aminoazido sekuentziak

gaixotasunaren sintomak agerraraz ditzake, eta EZren kasuan, nabariak diren hainbat aldaketa behatu da biopsia kulturetan 51-53. Peptido horrek ez du T zelulen bidezko erantzunaren estimulazioa eragiten 54,55 eta beraz, pentsatzekoa da 31-43 proteina zatiaren toxizitatea berezko immunitatea aktibatzeke gaitasunari dagokiola.

Zenbait azterketek Toll-like hartzaile 4 (ingelesez *Toll-like receptor 4* edo TLR4) eta bere seinale transduktore nagusia, MyD88 inplikatu dituzte, monozitoetan, makrofagoetan eta zelula dendritikoetan zerealen proteinekiko garatzen den erantzunaren hartzaile eta eragile primario modura, hurrenez hurren [51]. Glutenak eragindako IELen berezko aktibazioak *MICA* genearen adierazpena induzitzen du hesteko epitelioan. MICA epitelialak, gainadierazitako IL15ekin batera, NKG2Dren (CD4+ nahiz CD8+ diren zenbait T zelula azpitaldetako hartzailea) aktibazioa sustatzen du IELetan, linfozitoak bitartekari modura dituen zitotoxizitate antigeno-espezifikoa bultzatuz. Azkenik, IL15ekin batera diharduen IL21 ere berezko immunitatearen gidaritzan aipagarria dela ikusi da [53, 75].

### 3.5. Bidezidor patologiko potentzialak

EZn identifikatutako gene gehienak erantzun immunitarioan parte hartzen dutela ikusi da, ez da ezagun heste ehunaren suntsipenean parte hartzen duten mekanismo sekundarioen funtzionamendua.

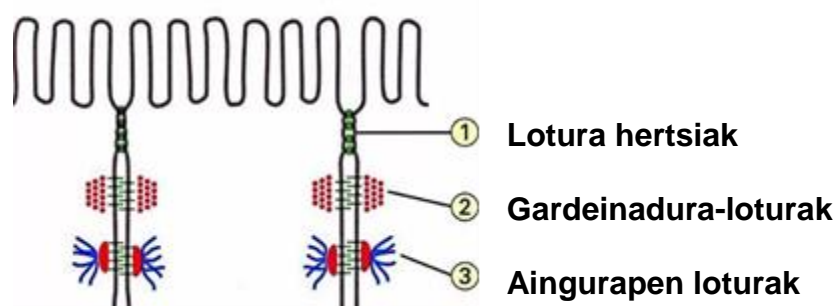
Hurbilketa genomikoek (cDNA microarrayek eta genoma osoaren adierazpen analisiek) EZ garapenean parte hartu dezaketen hainbat bidezidor konplexuen desregulazioa behatu dute. Hurbilketa horiek pazienteen duodenoko biopsietan, zein *in vitro* zelula kulturetan burutu dira, gaixotasuna egoera ezberdinetan aztertuz [76-78]. Ikerketa horien arabera, EZri loturiko bidezidor nagusienak zelula immunitarioekin (T eta B linfozitoekin eta makrofagoekin) eta antigenoaren prozesatze eta aurkezpen prozesuarekin erlazionatuta daude. Hala ere, beste hainbat bidezidor ere inplikaturik daudela ikusi da, hala nola komunikazio eta seinalizazio zelularra, ubikitina-proteasoma sistema, ziklo zelularra, apoptosia eta matrize estrazelularreko hartzaileen bidezidorrak.

Bidezidor patologiko potentzialen identifikazioa eta berreraikuntza oso garrantzitsua da EZren patogenesiaren ulermenerako eta suszeptibilitate genetikoaren erantzuleak izan daitezkeen hautagai funtzionalen identifikaziorako. Lan hau, zelularteko komunikazioaren bidezidorrean enfokatu da, lotura hertsien egituretan, hain zuzen, EZdun gaixoei aurkezten duten heste-iragazkortasun emendatuarekin erlazionatuta baitago.

#### 4. Lotura hertsien bidezidorra

Heste meharreko epitelioa zelulen geruza bakarreko ilara jarraituaz eratuta dago. Mukosarekin batera, kanpo ingurunearekin elkarrekintzan dagoen geruza malgua da eta bi funtzio nagusi ditu. Alde batetik, mikroflora, antigeno, mikroorganismo eta toxinen aurkako hesi modura funtzionatzen du eta bestetik, elikagaien, elektrolitoen eta uraren barneraketa baimentzen du [81]. Beraz, heste epitelioak iragazki selektibo gisa jokatzen du.

Heste epitelioko zelularteko loturek fluxu parazelularra erregulatzen dute eta ezinbestekoak dira barrera selektiboaren ongizaterako. Zelularteko lotura konplexuak proteinen arteko elkarrekintza itsasgarrien bidez eraten dira eta hiru egitura ezberdinez dago osatua: lotura hertsia (LH) edo *zonula occludens*, lumenetik hurbilenak daudenak (lotura apikalenak), gardeinadura-loturak (GL) edo *zonula adherens* LH azpian kokatuta eta azkenik, horien azpian aingurapen-loturak (AL) edo *macula adherens* aurkitzen dira (5. irudia). GL eta AL egiturek albo zelulen arteko lotura mekanikoa burutzen duten bitartean, LH hesi funtzionala sortu eta fluxu parazelularra erregulatzen du.



5. irudia. Epitelioko zelularteko lotura konplexuen irudikapen eskematikoa. [www.pathologystudent.com](http://www.pathologystudent.com) orrialdetik adaptatuta.

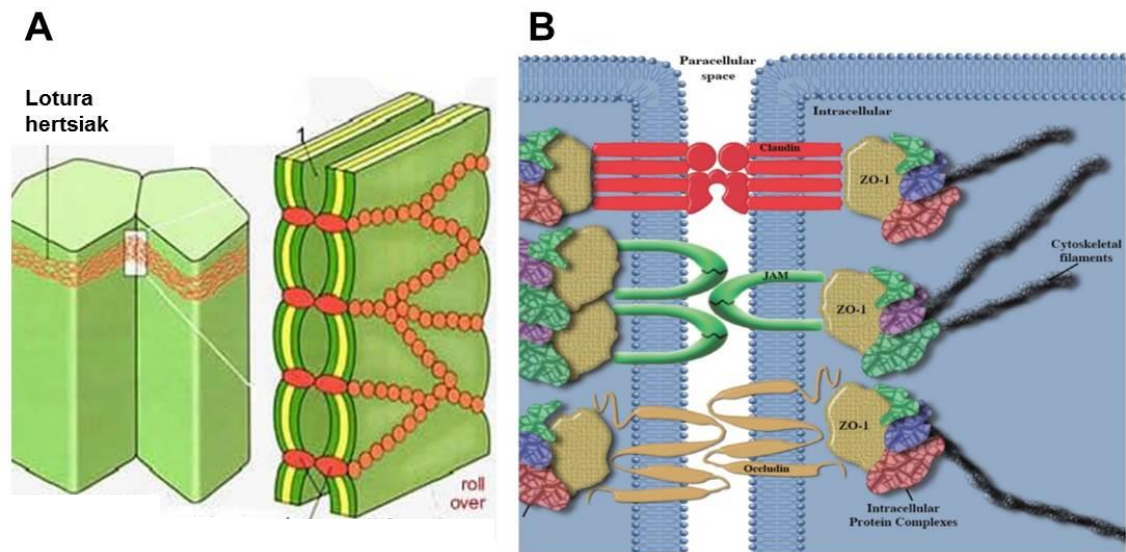
#### 4.1. Lotura hertsien egitura

LHen egitura mikroskopio elektroniko behatu zen lehenbizi. Bertan, alboko zelulak lotzen dituen eta harizpi sare bat osatuz zelula osoa inguratzen duen gerriko jarraitua ikus daiteke (6A irudia) [82]. Behaketa morfologiko eta analisi funtzionalen arabera, LHak bi funtzio nagusi ditu: ioi eta solutuen fluxua erregulatzen duen “ate funtzioa” batetik eta polaritate apiko-basala mantentzen duen “hesi funtzioa” bestetik [84]. Beraz, LHen bidez patogenoen eta bakterioen zelularteko barneraketa saihesteaz gain, mintz-proteinak alde apikalean mantentzen ditu, lumenari begira dagoen domeinuan.

Maila molekularrean, mintzeko eta zitoplasmako proteinez osatutako era askotako egitura konplexuak dira LHak (6B irudia). Mintzari dagokionez, LHak mintzean zeharreko okludina [85] eta kladina [86] proteinez daude osatuta nagusiki. Klaudinen familia 24 proteinek osatzen dute eta bi taldeetan banatzen dira: iragazkortasuna murrizten duten kladina zigilatzaileak eta iragazkortasuna emendatzen duten kladina poro-eratzzaileak [87, 88]. Klaudina eta okludinaz gain, atxikipen funtzioa duten eta hainbat prozesu (leukozitoen migrazioa adibidez) erregulatzen dituzten proteinek ere osatzen dute mintz-domeinua, trizelulina eta JAM proteinak, besteak beste [89, 90].

Mintz-domeinuaren azpian domeinu zitoplasmatikoa dago, zitoeskeletoa eta mintz-domeinua lotzen duten proteina ezberdinez osatua dagoena [91]. Proteina gehienak MAGUK familiakoak dira eta elkarrekintza ugari ezartzeko domeinuak daukate (PDZ, SH3 eta GK). Domeinu horiek medio zitoeskeletoarekiko eta mintzeko proteinekiko afinitate handia erakusten dute [92, 93]. Ondorioz, beste molekulekin elkarrekintza ezberdinak sortzen dituzte, hala nola GL egiturekin, polaritatea erregulatzen duten proteina konplexuekin edota transkripzio faktoreekin [91, 94].

Sare konplexu horren erregulazioa ezinbestekoa da LHetako mintz-proteinak antolatuta egoteko, loturen eraketa egokia izateko eta zelula barneko seinaleztapen-sistema zuzena izateko [95]. Laburbilduz, domeinu zitoplasmatikoak mintz-proteinen kokapena eta funtzioa kontrolatzen du eta beraz, heste iragazkortasuna ere.



6.irudia. Lotura hertsien a) ultrastrukturaren eta b) egitura molekularren irudikapen eskematikoa.

#### 4.2. Lotura hertsia eritasun zeliakoan

Hesteetako hanturazko gaixotasunetan heste-hesiaren suntsiketa eta iragazkortasun emendia ematen da, hainbat gaixotasunen ezaugarri ohikoa izanik, besteak beste, Crohn gaixotasuna [96], ultzeradun kolitisa [97] eta eritasun zeliakoa [98]. EZdun gaixoen %60-80 inguruk heste-iragazkortasun emendatua dute eta horren ondorioz, lumeneko antigeno eta mikrobioen barneratze ez kontrolatua jasaten dute [99, 100]. Iragazkortasun emendatuak gliadina peptidoen barneratzean parte hartu dezakeela iradoki da, gaixotasunaren garapena erraztuz baina egun, LHak gliadinaren barneratzean inplikaturik dauden ala ez eta gliadinaren peptidoak zeluletan zehar edo zelulen artean barneratzen diren ere ez zalantzan dago.

EZdun gaixoek LH kaltetuak eta heste-iragazkortasun emendatua aurkezten dute eta azken hau, LH egituren suntsiketaren ondorioa izan daiteke [101, 102]. Ultrastrukturari erreparatuta, LHren egitura sortzen duten sarearen sakonera murrizta eta harizpi kopuru urria agertzen da, gerrikoa ez-jarraitua izanik. Maila molekularrean, LHetako proteinetan aldaketa konplexuak ikus daitezke adierazpen mailan, molekulen kokapenean (lokailu funtzioa duten proteinetan bereziki) transkripzio ondorengo aldaketetan (tirosinen fosforilazioa esaterako)

eta zitoeskeletoaren antolakuntzan [103]. Dirudenez, LHen proteinen adierazpen maila eta kokapen egokiak ezinbestekoak dira molekulen funtzionamendu aproposerako eta horien alterazioak egituren desantolaketa eragiten du. EZdun gaixoen heste meharrean ezagutzen diren aldaketen artean, kladina poro-eratzailen gainadierzpena (kladina-2 eta kladina-15) eta kladina zigitzaileen, okludinen eta ZO-1 lokailu nagusiaren azpiadierazpena eta kokapen aldaketak ditugu [104-106]. Aldaketa hauetaz gain, asoaziato ikerketa batek epitelioaren polaritatea erregulatzen duten bi gene, *PARD3* eta *MAGI2*, EZrekin asoziatuta daudela ikusi zuten [107]. Honek, zelularen polaritatearekin erlazionatutako mekanismoak LHen suntsiketan inplikaturik egon daitezkeela iradokitzen digu. Gainera, zelularen polaritatearekin erlazionatuta dauden Par-3 and PP-1 proteinak LHen proteinen adierazpen alterazioarekin erlazionatu dira, kladina-2, -3, -5 eta -7 eta ZO-1rekin besteak beste, EZ aktiboan fluxu parazelularra emendatzen dutela ikusiz [104].

Alessio Fasanoren taldeak, EZren heste-iragazkortasuna modulatzeko LHen oinarritutako mekanismo bat proposatu zuen [108]. Ikerketa horien arabera, erregulazioa zonulina molekularren (*Vibrio cholerae* bakteroen ZO toxinen homologo endogenoa) bidez ematen da. Gliadinaren presentzian, hesteetako epitelio zelulek eta *lamina propria*ko makrofagoek zonulina isurtzen dute eta ondorioz, zelularteko iragazkortasunaren emendioa gertatzen da bai EZn, baita beste hainbat hanturazko gaixotasun kronikoetan ere. Egun, Innovate enpresa zonulinaren hartzaileen antagonista bat garatzen ari da, INN-202 (lehen AT-1001 edo larazotido deiturikoa). Entsegu klinikoak IIb fasean dago eta GGD tratamenduaren terapia gehigarri modura erabili nahi da [109].

Ikerketa esperimental eta klinikoaren arabera, baliteke heste-iragazkortasun emendatua gaixotasunaren garapenean inplikaturik egotea, patogenesiaren aurretik agertzen den gertaera funtsezko bat izanik [110]. Hala izatekotan, iragazkortasun emendatuak gliadinaren barneraketa erraztuko luke, immunitate-sistemaren aktibazioa eraginez. Patogenesiaren aurretiko gertaerei buruzko ezagutza murrizta denez, hainbat esperimentu burutu diren arren ezin izan da frogatu iragazkortasun emendioa arrisku faktorea denik. Animaliekin



egindako ikerketa batean heste-iragazkortasun emendatua gaixotasuna garatu baino lehenago agertzen zela ikusi zuten [111]. Gainera, bai EZ pazienteen senide asintomatikoetan [98] baita GGD tratamendu hertsian dauden pazienteetan ere hesteetako iragazkortasun emendatua ikusi da, berezko alterazioa eta gaixotasunaren aurretikoa dela iradokiz [112].

Laburbilduz, jakina da heste-hesia eta LHen egiturak kaltetuta daudela EZn eta badirudi gaixotasunerako suszeptibilitatean parte hartzen dutela. Hala ere, barreraren suntsipena bideratzen duten mekanismoak eta bertan parte hartzen duten geneen funtzioa ezezagunak dira oraindik. Horregatik, ezinbestekoa iruditzen zaigu LHen bidezidorrak EZren patogenesisian duen papera ulertzea eta ezagutzea, horretan inplikaturik dauden geneak identifikatuz eta analisi funtzionalen bidez haien funtzioak zeintzuk diren ulertuz. Ezagutza horrek,



## **2. Helburuak**



Proiektu honen bidez, lotura hertsiek eritasun zeliakoaren patogenesisian duten inplikazioa aztertu nahi da eta horretarako 3 helburu nagusi definitu dira:

- I. LHen bidezidorra EZn eraldatua dagoen zehaztea eta gliadinak alterazio horien gainean duen efektua aztertzea.
  - a. EZdun gaixoen eta kontrol ez zeliakoen heste-mukosan, LHetan partaide diren geneen adierazpen eta koadierazpen analisiak burutzea.
  - b. Heste-epitelioko zelulek eratzen dituzten LHen bidezko geruza bakarretan gliadinak duen efektua ikertzea.
- II. EZrekin asoziatutako eta LHekin erlazionatutako polimorfismeok hestehesiaren osotasunean duten eragin funtzionala karakterizatzea.
  - a. EZrekin asoziatu diren eta LHekin erlazionatuta dauden aldaeren asoziazio emaitzak populazio independente batean errepikatzea
  - b. Asoziazio eremuko geneen karakterizazio funtzionala burutu eta asoziatutako aldaerek gene hautagaien adierazpenean duten eragina zehaztea.
- III. Gaixoetan berezko adierazpen aldaketa duten LHen bidezidorreko geneek EZren patogenesisian duten zeregina aztertzea, horretarako gene hauetan aldaketa egonkorak dituzten eredu zelularrak eratzuz.



### **3. Materialak eta metodoak**





## 1. Materialak

### 1.1. Pazienteak

#### 1.1.1. Onarpen etikoa

Burutu diren azterketa guztiak, Gurutzeta Unibertsitate Ospitaleko Etika Batzordearen onespina lortu duten ikerketa proiektuen parte dira. Lagin guztiak errutinazko diagnostikoetako endoskopiaren bidez jaso dira, emaileen edota beren gurasoen baimen informatua lortu ostean.

#### 1.1.2. Pazienteak eta biopsia laginak

EZ erreklutamenduaren garaian indarrean zegoen ESPGHANen irizpideen arabera diagnostikatu zen Gurutzeta Unibertsitate Ospitaleko Gastroenterologia Pediatrikoko klinikan, horretarako anti-gliadina eta anti-endomisio (EMA) edota anti-transglutaminasa (TGA) antigorputzen determinazioa eta heste meharreko biopsiaz baliatuz.

Gliadinaren eragin kroniko edo epe luzekoak gaixo zeliakoetan duen eragina aztertzeko, 3 indibiduo talde aztertu ziren:

- EZ gaixo aktiboak (36): diagnostikatu berri diren EZ pazienteak, klinikoki gaixotasun aktiboa (EZrekin asoziaturiko antigorputzekiko positibo, hesteetako biloxken atrofia eta kripten hiperplasiarekin) eta dietan glutena hartzen dutenak.
- EZ gaixo tratatuak (36): gutxienez 2 urtetan glutenik gabeko dieta (GGD) jarraitu duten EZ paziente normalizatuak (sintomarik gabe, antigorputz negatiboak eta heste epitelio osasuntsua).
- Kontrol taldea (31): indibiduo ez-zeliakoak eta endoskopiaren momentuan hesteetako inflamaziorik ez zutenak erabili dira kontrol moduan.

Ikerketa honetan sartutako pazienteen informazio klinikoa, immunologikoa eta genetikoa 1. taulan aurkitzen da.

1.taula. Ikerketa honetan sartutako pazienteen informazio klinikoa, immunologikoa eta genetikoa.

<b>Ezaugarriak</b>	<b>Balioak</b>
Gaixoak	27
- Emakumezkoak	17
- Gizonezkoak	10
Adina diagnostikoan (hilabeteak)	23,1 ± 22,8
GGD denbora (urteak)	1,97 ± 0,37
TGA diagnostikoan (%POS)	119 ± 87,45
MARSH fasea diagnostikoan	<b>3c: 22; 3b: 5</b>
HLA haplotipoa	<b>DQ2: 20; DQ8: 1; DQ2/DQ8: 6</b>

### 1.2. DNA laginak

Asoziazio azterketetako CEGEC-en (EZren Genetikaren Espainiako Partzuergoa) bildumako 361 EZ pazienteen eta 91 kontrol ez-zeliakoen DNAk erabili dira.

### 1.3. Epitelioko giza zelulak

Ikerketa honetan erabilitako epitelioko giza zelulak American Type Culture Collection-etik eskuratu dira (ATCC, Manassas, VA, AEB). Zehazki, kolon ehunetik eratorritako C2BBe1 (Caco-2 zelulen klonak; CRL-2102), T84 (CCL-248) eta HCT116 (CCL-247) zelulak eta enbrioiko giltzurrun ehunetik eratorritako HEK293FT (CRL-1573) zelulak erabili dira.

## 2. Metodoak

### 2.1. RNA, DNA eta proteinen erauzketa

Izozturiko biopsiak plastikozko kirtenekin apurtu ziren lehenbizi. Biopsietako eta zeluletako RNA eta DNA NucleoSpin RNA eta NucleoSpin Blood kit-en bidez (Macherey-Nagel, Düren, Alemania) isolatu ziren hurrenez hurren, horretarako hornitutako protokoloa jarraituz. RNA nuklearraren frakzioa erauzteko,  $10^7$  zelulen nukleoak lisi tanpoi hipotonikoren bidez isolatu ziren. Tanpoiaren osagaiak hurrengo hauek ziren: 10 mM Hepes, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA eta %1 Triton-X (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, AEB). Zelulak 15 minutuz izotzetan inkubatu ondoren, beste 15 minutuz 2500 rpm-etan zentrifugatu eta pikor

nuklearra jaso zen. Erauzketa lehen azaldutako moduan burutu zen. RNA eta DNA laginen kontzentrazioa NanoDrop 1000 espektrometroan (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, AEB) neurtu zen eta laginak, erabili arte  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan gorde ziren.

Zelulen proteina osoa lortzeko, zelula kulturak zuzenean %5 merkaptoetanoladun Laemmli tanpoian lisatu ziren (BioRad, Hercules, CA, AEB) eta  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ -tan gorde ziren erabili arte.

## **2.2. Geneen adierazpena**

Gene hautagaien adierazpena denbora errealeko PCR kuantitatiboaren (qRT-PCR) bidez kuantifikatu zen. Biopsietatik eta zeluletatik erauzitako laginez gain, Human Total RNA Master Panel II bildumako (Clontech, Mountain View, CA, AEB) giza ehun desberdinetako RNA laginak ere aztertu ziren.

### **2.2.1. Gene hautagaiak eta entseguak**

Geneen adierazpenaren profilerako 52 gene hautagai aukeratu ziren (24 LHen bidezidorreko partaideak eta 28 hanturaren seinalizazioarekin erlazionatutako geneak) eta hurrengo irizpideak jarraitu ziren:

- a) Lehendik EZn asoziazio genetikoa edo adierazpenaren alterazioa erakutsi duten geneak [54, 104, 107].
- b) KEGG datu basearen arabera, TJ edo TLR bidezidorretan funtzio zentrala duten geneak (<http://www.genome.jp/kegg>).
- c) Literaturaren arabera, TJ bidezidorrean funtzio garrantzitsua duten geneak [95, 113].

Proteina kodetzen duten geneen azterketarako, markatu gabeko bi hasle eta FAM bidez markaturiko MGB zunda batez osaturiko TaqMan Gene Expression entsegu komertzialak erabili ziren (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, AEB) (Eranskineko 1. taula). DNA genomikoaren detekzioa saihesteko, aukera zegoen guztietan exoi-exoi lotura zeharkatzen duten zundak aukeratu ziren. Bestalde, transkripto ez-kodetzailen adierazpen azterketa SYBR green

teknikaren bidez burutu zen eta horretarako erabilitako hasleak Primer3 software-aren bidez diseinatu ziren (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) (2. taula). Hasleen espezifikotasuna baieztatzeko, BLAST bilaketak egin ziren datu base publikoen aurka.

## 2.taula. Gene ez-kodetzaileen analisirako diseinatutako hasleei buruzko informazioa (5'-tik 3'-ra)

Assaya	Anplikoaren tamaina (bp)	Alderantzizko haslea	Aurreranzko haslea
RP4-587D13.2	172	GGTGCTGGAAATTCATCAGTG	TGACCACATGACTGACACCA
RPLP0	85	GCAGCATCTACAACCCTGAAG	CACTGGCAACATTGCGGAC

### 2.2.2. Alderantzizko transkripzioa edo cDNAren sintesia

RNA totala cDNAra bihurtu zen iScript cDNA Synthesis Kita (BioRad, Hercules, CA, AEB) erabiliz eta fabrikatzailearen protokoloa jarraituz. Emaitzetan itu bakoitza maila berdinean ordezkaturata egon zedin, esperimentu bakoitzerako RNA kontzentrazio bera erabili zen. Alderantzizko transkripzioa hurrengo baldintza hauetan egin zen: hasleen hibridazioa 25 °C-tan 5 min, alderantzizko transkripzioa 42 °C-tan 30 min eta inaktibazioa 85 °C-tan 5 min. Laginak erabili arte -80 °C-tan gorde ziren.

### 2.2.3. Adierazpen analisia: qPCR

Adierazpen analisi guztiak bikoiztuta burutu ziren. Esperimentu guztietan aldi berean *RPLP0* (erribosomako proteina handia) gene endogenoaren adierazpena kuantifikatu zen eta jarritako RNA kantitatearen kontrol modura erabili zen (endogenoaren entseguak VIC-ekin markatutako MGB zunda zuen). qPCR analisietarako bi sistema ezberdin erabili ziren: lagin kopuru handien analisirako Fluidigm BioMark dynamic array sistema (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, AEB) eta lagin kopuru txikien analisirako Eco Real-Time PCR sistema (Illumina, San Diego, CA, AEB). Gene bakoitzaren adierazpen erlatiboa, Ct metodo zehatza erabilita kalkulatu zen lehenago deskribatu bezala [114]. Adierazpen emaitzak gene endogenoarekiko eta kontrol laginen batz bestearikiko normalizatu ziren hurrengo formularen bidez:

$$\text{Adierazpen erlatiboa} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Non  $\Delta\Delta\text{Ct}$ , lagin esperimental eta kontrolen arteko  $\Delta\text{Ct}$  balioen diferentzia den eta  $\Delta\text{Ct}$ , gene hautagaiaren eta gene endogenoaren arteko  $\text{Ct}$  balioen diferentzia.

Fluidigm sisteman, lehenik eta behin, cDNA lagin bakoitzaren preanplifikazioa burutu zen TaqMan PreAmp Master Mix nahastura (kat. zk. 4391128) erabiliz. Hamalau zikloko preanplifikaziorako baldintzak fabrikatzailearen gomendioen arabera zehaztu ziren. Ondoren, qPCRa burutu zen eta horretarako TaqMan Fast Advanced Master Mix nahastura (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, AEB) erabili zen, horretarako hornitutako protokoloa jarraituz. Laginak eta entseguak Assay Loading eta Sample Loading (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, AEB) errektiboetan kargatu ziren hurrenez hurren. Erabilitako ziklo baldintzak hurrengo hauek izan ziren: 95 °C, 1 min eta PCRa (35 ziklo) 95 °C, 5 sec eta 60°C, 20 sec.

Eco Real-Time PCR sisteman, gene kodetzaileen detekziorako TaqMan Universal PCR Master Mix nahastura (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, AEB) erabili zen, fabrikatzailearen argibideak jarraituz. Zikloetarako erabilitako baldintzak honako hauek izan ziren: polimerasaren aktibazioa 95 °C-tan 10 min eta PCRa (40 ziklo) 95 °C-tan 15 sec eta 60 °C-tan 1 min. Gene ez-kodetzaileen detekziorako Quantitect SYBR Green Master Mix nahastura (Qiagen, Hilden, Alemania) erabili zen eta zikloak honako baldintzetan burutu ziren: 95 °C-tan 30 sec eta PCRa (40 ziklo) 95 °C-tan 15 sec eta 60 °C-tan 1 min. Ondoren, hornitutako protokoloa jarraituz, urte-kurben analisia egin zen PCR produktuen espezifikotasuna eta identitatea egiaztatzeko.

### 2.3. Genotipoen azterketa

Genotipoen azterketa Euskal Herriko Unibertsitateko (UPV/EHU) Sekuentziazio eta Genotipo Azterketen Unitatean burutu zen Fluidigm Array (Fluidigm Corporation, San Francisco, CA, AEB) plataforma erabiliz. Literaturan argitaratutakoan oinarrituta, 3 SNP *MAGI2* genean, *PARD3* geneko 2 SNP eta *MYO9B*-ko 3 SNP aukeratu eta detekziorako hasle eta zunda espezifikoak

diseinatu ziren (3. taula). Populazioaren homogenotasuna ziurtatzeko,  $\chi^2$  estandarraren asoziazio analisia egin aurretik identitate-egoera analisia eta dimentsio anitzeko eskalatzea burutu ziren Plink 1.07 programaren bidez [115].

eQTLen analisia egiteko rs2691527 polimorfismoa genotipatu zen aurretik diseinatutako TaqMan Genotyping entsegua erabiliz (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, AEB; kat. zk. c\_2577703\_10). SNP hau aztertu zen EZrekin asoziatutako rs6962966arekin erabateko LDan dagoelako. DNA lagin bakoitzaren 10 ng Eco Real-Time PCR sisteman (Illumina, San Diego, CA, AEB) anplifikatu ziren TaqMan genotyping Mastermixa (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, AEB) erabiliz eta fabrikatzailearen protokoloa jarraituz.

## **2.4. Zelula kulturen baldintzak eta tratamenduak**

### **2.4.1. Zelula kulturen baldintzak**

Epitelioko giza zelulak 37 °C-tan eta %5 CO<sub>2</sub>-an hazi ziren, ingurune heze eta esterlean. Erabilitako medio eta osagarri guztiak Lonza (Lonza group, Basel, Suitza) erosi ziren FBS-a izan ezik (Biochrom, Cambridge, UK; kat. zk. S 0415). Azken hau, erabili baino lehen fabrikatzailearen jarraibideak jarraituz inaktibatu egin zen. Zelula mota bakoitzarentzat hazkuntza medio aproposa prestatu zen (4. taula).

Zelula kulturak %80ko konfluentziara iristean %0,25 Tripsina-EDTA (Gibco, Carlsbad, CA, AEB) bidez plakatik desitsatsi eta plaka berri batean dentsitate baxuan eroin ziren. Kriokontserbaziorako, zelulak %5 DMSO-dun (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, AEB) hazkuntza medioan berreseki eta hodiak -80 °C-tako izozkailuan, isopropanolaz betetako kutxan murgildu ziren 24 orduz, -1 °C/min izozteko. Ondoren, nitrogeno likidotan gorde ziren. Izoztutako zelulak berpizteko, zelulak 37 °C-tako ur bainuan pare bat minutuz desizoztu eta hazkuntza medioan berreseki ziren.

### 2.4.2. Gliadinaren prestaketa eta zelulen kitzikapena

Gliadina, pepsina eta tripsina erabiliz digeritu zen (PT-G) aurretik deskribatuta bezala. Laburbilduz, 500 mg gari gliadina (Sigma-Aldrich, kat. zk. G3375) 5 ml 0,2 M HCl-tan disolbatu eta 5 mg pepsinarekin (Sigma-Aldrich, kat. zk. P6887) inkubatu zen etengabeko agitazioaz (37 °C, 2h). Inkubazioaren amaieran, pH 7,4ra doitu zen NaOHz, eta nahasketa 5 mg tripsinarekin (Sigma-Aldrich, kat. zk. T9201) inkubatu zen 37°C-tan 4 orduz. Entzimak desaktibatzeke, soluzioa irakiten egon zen 30 minutuz eta ondoren 2000 g-tan zentrifugatu zen 10 minutuz. Azkenik, gainjalkina 20 µm-ko porodun mintzaren bitartez iragaziz esterilizatu zen. E-TOXATE kitaren bitartez (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, AEB) eta hornitutako protokoloa jarraituz, bakterioen kutsadurarik ez zegoela baieztatu zen. Kontrol negatibo moduan BSA (behi-sero albumina) erabli zen eta era berean digeritu zen.

### 2.5. siRNA bidezko transfekzioa

Giza *MAGI2* genearen aurkako DsiRNA (*Dicer-substrate short interfering RNAs*; Integrated DNA Technologies; kat. zk. hs.Ri.MAGI2.13.1 eta hs.Ri.MAGI2.13.2) eta iturik gabeko kontrola (Integrated DNA Technologies; kat. zk. 51-01-14-03) 10 nM-ko kontzentrazioan erabili ziren. Transfekzioa Lipofectamine RNAiMax (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, USA) erabiliz eta fabrikatzailearen gomendioak jarraituz burutu zen. Laburbilduz, siRNA eta Lipofektamina lipidoa Opti-MEM I Reduced Serum Medioan (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, AEB) diluitu eta 15 minutuz inkubatu ziren. C2BBE1 zelulak ( $5 \times 10^4$  zelula putzuko) antibitikorik gabeko medioan diluitu eta siRNA eta lipidoaren nahasketara gehitu ziren zuzenean. Gau osoko inkubazioaren ostean antibiotikodun medioa gehitu zen. Handik 48 ordutara, C2BBE1 zelulak gliadinaz kitzikatu ziren. Isilarazpenaren eraginkortasuna Western Blot teknikaren bidez baieztatu zen.

3.taula. Genotipoen azterketetarako diseinatutako Fluidigm hasleak (5'-tik 3'-ra)

Assaya	SNP izena	SNP aleloa	Alderantzizko haslea	Aurreranzko haslea
GTA0093555	rs6962966	A / G	GATATCAGCCTGGCCTCTGA	GATATCAGCCTGGCCTCTGG
GTA0093556	rs9640699	A / C	CAGTGGATTCTCTGTACAGCTATCAT	CAGTGGATTCTCTGTACAGCTATCAG
GTA0093558	rs1496770	C / T	TGTCAGTTTGATCCTCCTGATGC	AATGTCAGTTTGATCCTCCTGATGT
GTA0093550	rs10763976	G / A	CCAGATCCGTTAGCCTTTTGC	ACCAGATCCGTTAGCCTTTTGT
GTA0093551	rs4379776	C / T	CAGCTTACATAAAACTGAAGACGCG	CAGCTTACATAAAACTGAAGACGCA
GTA0093559	rs2305767	C / T	GGTGGGACGTGCATCCAG	GGTGGGACGTGCATCCAA
GTA0093552	rs1457092	C / A	GAGCTGCTGATATCCTCCTGG	GAGCTGCTGATATCCTCCTGT
GTA0093554	rs2305764	G / A	GTGAGTGTGTTTTCCCCCG	TGTGAGTGTGTTTTCCCCCA

4.taula. Lerro zelulen hazkunde-medioak. DMEM= Dulbecco's Modified Eagle's Media; FBS= Behi-sero fetala; Pen-Strep= Penizilina-Estreptomizina; NEAA= Aminoazido ez esentzialak

Zelula lerroak	Media	FBS	Pen-Strep	NEAA
<b>C2BBe1</b>	DMEM (high glucose)	%10	%1	0,1 mM
<b>T84</b>	DMEM: F-12	%10	%1	-
<b>HCT116</b>	DMEM: F-12	%10	%1	-
<b>HEK293FT</b>	DMEM (high glucose)	%10	%1	0,1 mM



## 2.6. Western Blot teknika

Baesterik esan ezean, analisi hauetan erabilitako errektibo guztiak, BioRad-en (BioRad, Hercules, CA, AEB) erosi ziren. Zeluletatik erauzitako proteina laginak 95° C-tan 10 minutuz inkubatu eta %12 SDS-PAGE bidez banatu ziren (hasieran 80 V-tan, laginek gel kontzentratzailea zeharkatu arte eta ondoren, 120 V-tan, elektroforesi frontea gelaren bukaeraraino heldu arte). Erabilitako markatzailea Precision Plus Protein All Blue Standards izan zen. Ondoren, proteinak nitrozelosazko mintzera transferitu ziren Trans-Blot Turbo Transfer aparatuaren bidez, 25V-etan, 30 minutuz. Mintza blokeatu ziren %5 gantzik gabeko esne eta 0.05% Tween 20-dun Tris-salino (TBST) tanpoian, giro tenperaturan eta agitazioan, ordubetez.

Ondoren, soluzio berean diluitutako antigorputz primarioarekin inkubatu ziren mintzak (4 °C-tan gau osoan zehar agitazioan), eta TBST-arekin hiru garbiketa egin ostean, antigorputz sekundarioarekin inkubatu ziren (ordu betez giro tenperaturan eta agitazioan). Erabilitako antigorputz primarioak untxian garatutako giza MAGI2-ren aurkakoa (anti-MAGI2; 1:500) eta kontrol endogeno modura saguan garatutako giza  $\beta$ -aktinaren aurkakoa (anti- $\beta$ -aktina; 1:1000) (ABCAM, Cambridge, UK; kat. zk. ab97343 eta ab8227, hurrenez hurren) izan ziren. Antigorputz sekundarioak, hurrenez hurren, ahuntzean garatutako untxiaren IgG-ren aurkakoa (1:5000) eta saguaren IgG-ren aurkakoa (1:10000) izan ziren (Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc; kat zk. 111-035-003 and 115-035-062). Garbiketen ostean mintzak SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substratua (Thermo Fisher Scientific, Boston, MA, USA) bidez errebelatu eta ChemiDoc MP sisteman (Biospace) bidez ikusi ziren.

## 2.7. Iragazkortasun azterketak

C2BBel zelulen geruza bakarraren ereduak erabiliz, epitelioko iragazkortasuna neurtzeko bi neurketa metodo erabili ziren: epitelio zeharreko erresistentzia elektrikoa (ingelesez *Trans-Epithelial Electrical Resistance* edo TEER) eta *Lucifer Yellow* (LY) molekularen iragazkortasun parazelularra. Horretarako, zelulak 0.33 cm<sup>2</sup>-ko azalera eta 0,4  $\mu$ m-ko poro tamaina duten intsertoetan eroin ziren ( $2 \times 10^5$  zelula intsertoko) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, AEB; kat.



Brea, CA, AEB) neurtu zen 530 nm-ko emisio-banda eta 485 nm-ko kitzikapen banda erabiliz. Garraio tanpoia kontrol huts modura erabili zen eta iragazkortasuna kuantifikatzeko LY-ren kurba estandarra egin zen, 100-tik 0.2  $\mu\text{M}$ -rako diluzi segida eginez. Iragazkortasun apiko-basalaren koefizientea ( $P_c$ ) hurrengo formularen bidez kalkulatu zen:

$$P_c = (V/(A \times C_i)) \times (C_f/T);$$

non  $V$  beheko ganbararen bolumena (ml),  $A$  mintzarean azalera ( $\text{cm}^2$ ),  $C_i$  LY molekularen hasierako kontzentrazioa ( $\mu\text{M}$ ) eta  $C_f$  bukaerakoa ( $\mu\text{M}$ ); eta  $T$  denbora tarte (s) diren.

### 2.8. Proliferazio mailaren neurketa

Esperimentu honetan erabilitako erreaktibo guztiak Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, AEB) enpresan erosi ziren. C2BBe1 heste zelulak 6 putzutako plakan  $2 \times 10^4$  dentsitatean erein eta proliferazio tasa neurtu zitzairen 4 egunetan zehar. Egun bakoitzean, zelulak 15 minutuz %4 paraformaldeidoz fixatu ziren eta urarekin ondo garbitu ondoren 20 minutuz 0.1% *crystal violet*-arekin tindatu ziren. Beste garbiketa baten ostean, zelulei lotuta geratutako *crystal violet*-a disolbatzeko zelulak %10 azido azetikoarekin inkubatu ziren 20 minutuz eta agitazioan. Disoluzioa uretan 1:4ra diluitu eta 590nm-ko uhin luzeran fluoreszentsia neurtu zen DTX880 fluoreszentsia irakurgailuan (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, AEB). Uraren fluoreszentsia oinarritzko balore modura erabili zen.

### 2.9. Zauri-sendatze entsegua

C2BBe1 zelulak (50.000) migrazioa aztertzeko plaka berezietan (Ibidi, Martinsried, Alemania; kat. zk. 81176) erein ziren. Plaka horiek, 500  $\mu\text{m}$  lodierako silikonazko horma batez banatutako bi ganbara dituzte. Zelulak konfluentziara heltzean, silikonazko horma kendu, hazkuntza medio berria jarri eta 36 ordutan zehar, mikroskopio bidez zelulei argazkiak atera zitzaizkien, 15 minuturo. Silikonazko hormak utzitako azalera librea estaltzeko denbora ImageJ software-a erabiliz kalkulatu zen.

## 2.10. CRISPR/Cas9 genoma editatzeko teknika

CRISPR-Cas9 teknika bidez epitelio zelula lerro ezberdinetan delezio-mutazioak eragin ziren gene hautagaien funtzioa ezabatzen. Prozeduraren irudikapen eskematikoa 8. irudian agertzen da.

### 2.10.1. SgRNAREN *in silico* diseinua

*INADL*, *TJP1* eta *PPP2R3A* geneen lehen exoiak moztea erabaki zen, genearen erabateko funtzio galera bermatzeko. Delezio-mutazioa eragiteko gene bakoitzaren 1. exoiarentzat sgRNA espezifikoak diseinatu ziren. Horretarako, UCSC genome browser web-arakatzaileretik exoiaren bi alboetara dagoen sekuentziaren 1000 bp lortu eta CRISPR Design Tool32 softwarean (<http://crispr.mit.edu/>) kargatu ziren. Programaren arabera, Cas9 bidez mozteko 20 bp-ko sekuentzia optimoak aukeratu ziren eta giza genomaren gainean BLAST analisiak burutu ziren mutazio ez espezifikorik ez dela egongo bermatzeko. Azkenik, sekuentzia horietarako (eta osagarriarako) espezifikotasuna duten sgRNA oligoak diseinatu ziren (Condalab) (5. Taula).

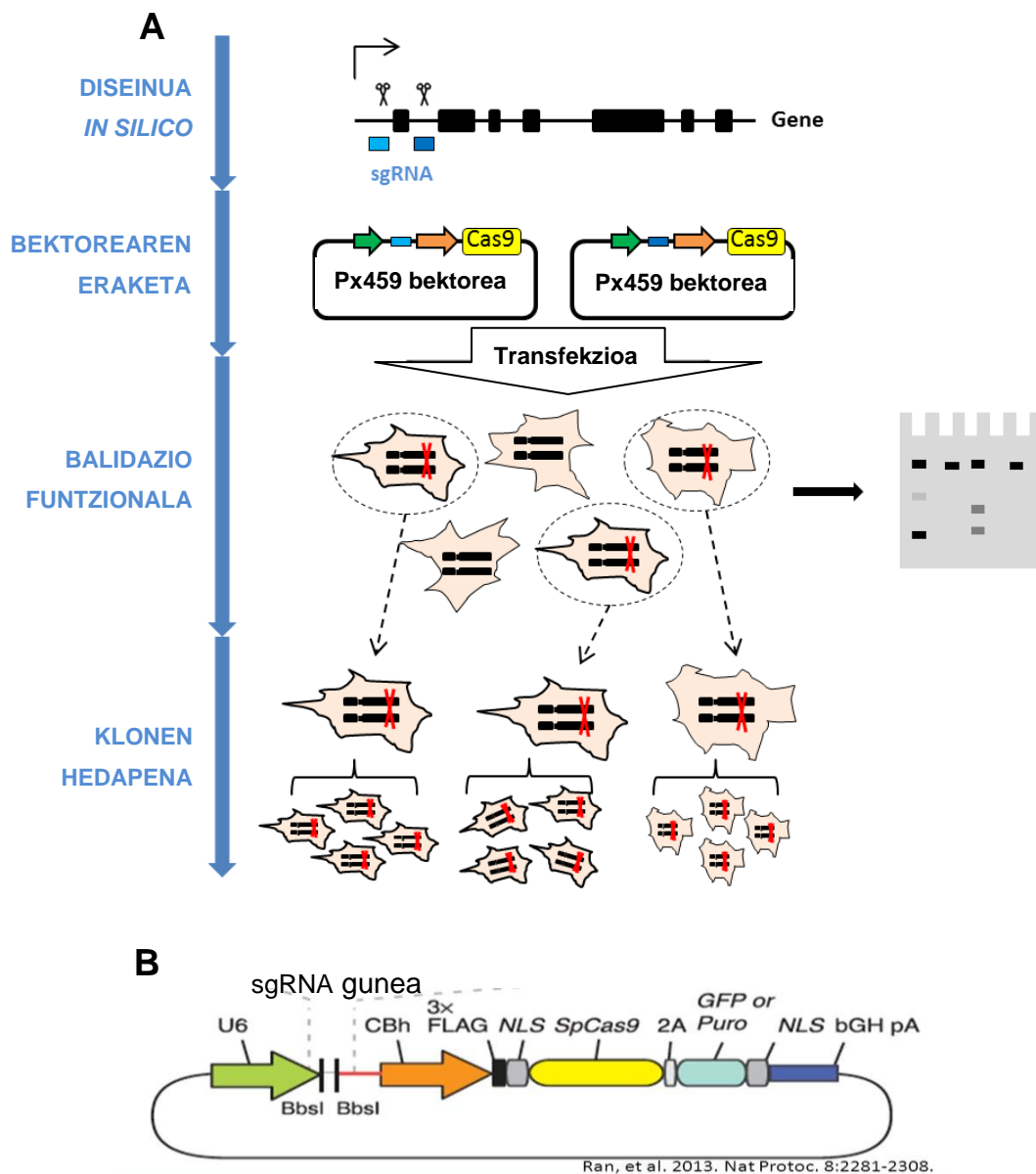
5. taula. CRISPR-Cas9 bidez gene hautagaiak editatzeko diseinatutako sgRNA oligoak

		Lokusa (hg19)	Sekuentzia	PAM	Sekuentzia osagarria	PAM
<i>INADL</i>	1	chr1: -62207158	CACCGAAAGACTTTCAGGCGGGGCG	CGG	AAACCGCCCGCCTGAAAGTCTTTC	GCC
	2	chr1: -62208992	CACCGACTTAATTCGGCCTGCGTGC	GGG	AAACGCACGCAGGCCGAATTAAGTC	CCC
<i>PPP2R3A</i>	1	chr3: +135683928	CACCGAATCTGGCGAGTGGTTATAA	GGG	AAACTTATAACCACTCGCCAGATTTC	CCC
	2	chr3: +135684886	CACCGTGGGTGCGGTGCGTTGCCT	CGG	AAACAGGCAACGCACCGCACCAGC	GCC
<i>TJP1</i>	1	chr15: +30115225	CACCGCAGGGCAGCTTGACCCGTT	CGG	AAACAACGGGTCAAGCTGCCCTGC	GCC
	2	chr15: +30112797	CACCGTCGTTAAATATTACGTTGTA	GGG	AAACTACAACGTAATATTTAACGAC	CCC

### 2.10.2. Bektorearen eraketa

sgRNA osagarrien fosforilazioa eta suberaketa T4 DNA ligazio tanpoiarekin eta T4-PNK Polinukleotido kinasarekin (New England Biolabs, Ipswich, MA, AEB) burutu zen fabrikatzaileen argibideak jarraituz. sgRNA oligo bakoitzaren 0,2 nm erabili ziren eta inkubazio denborak hurrengo hauek izan ziren: 37°C-tan 30 min, 95 °C-tan 5 min eta 25 °C-tan 1 min. Suberaketa egin ondoren, sgRNA intsertoak px459 plasmidoan (Addgene, Cambridge, MA, AEB) txertatu ziren, plasmidoaren sgRNA lotze gunean (8 irudia). Intsertoak bektorean txertatu ahal izateko plasmidoa digeritu zen lehenbizi. Horretarako, 1 µg plasmido *BpII*

entzimaz (Thermo Scientific) digeritu eta %1,5 agarosazko geletako elektroforesiaren bidez (150 V - 15 min) liseriketa testatu zen. Ondoren, Nucleospin Gel and PCR clean up kita (Macherey-Nagel) bidez, hornitutako argibideak jarraituz, digeritutako plasmidoa geletik purifikatu zen. Intsertoa, bektore digerituan txertatu zen bien hertz osagarriak T4 DNA ligasa (New England Biolabs, Ipswich, MA, AEB) bidez lotuz. Fabrikatzaileen protokoloa jarraituz, plasmidoa eta intsertoa 1:3 ratioan 2 orduz inkubatu ziren giro temperaturan.



8.irudia. A) CRISPR/Cas9 genoma editatzeko prozeduraren irudi eskematikoa. B) Px459 bektorearen irudi eskematikoa.

### **2.10.3. Transformazioa eta hautespena**

DH5 $\alpha$  bakterio kompetenteak (Thermo Fisher Scientific) 10 ng bektorearekin transformatu ziren, fabrikatzailearen protokoloa jarraituz. Errekonbinazioa eman den bakterioen hautespen positiboa egiteko, bakterioak gau osoan zehar 37 °C-tan X anpizilinadun LB-agarrean inkubatu ziren. Hazitako koloniak aukeratu eta anpizilinadun LB mediotan inkubatu ziren gau osoan zehar 37 °C-tan. Ondoren, bakterioetatik plasmidoa erauzi zen MINIprep kita erabiliz eta bertako argibideak jarraituz. Plasmidoaren klonazioa baieztatzeko, aurreko atalean azaldutako prozedura jarraituz, bektorea BP11 and BdhTi entzimez digeritu eta elektroforesi bidez intsertoaren barneraketa baieztatu zen.

### **2.10.4. Balidazio funtzionala**

100.000 zelula (C2BBel, T84, HTC116 eta HEK293FT) 100 ng bektore errekonbinatzailearekin transfektatu ziren, XTremHP DNA (Invitrogen) bidez, fabrikatzaileen protokoloa jarraituz. Gau osoko inkubazioaren ostean, transfekzioa emandako zelulen hautespen positiborako, zelulak 10  $\mu$ g/ml puromizina inkubatu ziren 48 orduetan zehar.

Transfektutako zelulen parte bat, 20 mg/ml K Proteinasadun lisi tanpoian (100 mM Tris.Cl pH8.0, 5 mM EDTA, 0.2% SDS, 200 mM NaCl) 2 orduz 60 °C-tan digeritu eta lisatua delezio-mutazioaren analisirako erabili zen. PCR arruntaren bidez, delezionatutako eskualdearen kanpoan eta barnean kokatutako hasle bikoteen bidezko amplifikazioa eginez, gel-elektroforesian delezio-mutazioa zuten zelulak identifikatu ziren.

### **2.10.5. Klonen hedapena**

Delezio-mutazioa daramaten zelulen hautespenerako, zelulak diluitu eta isolatu egin ziren, 96 putzutako plakako 5 zelula ezarriz. Zelulabakarretik hazitako kolonia hartu eta aurreko atalean azaldu bezala, delezio-mutazioaren analisirako PCR arrunta burutu zen. Delezioak adierazpen mailan egindako eragina kuantifikatzeko, RT-qPCR bat burutu zen.

### 2.11. Emaizten analisia

Taldeen arteko ezberdintasunak antzemateko analisi estatistikoak GraphPad Prism v5.0 software-a (GraphPad Software Inc, La Jolla, CA) erabili zen. Proba ez parametrikokoak erabili ziren, parekatuak (Wilcoxon proba) EZ gaixo taldeen arteko adierazpen mailak konparatzeko (EZ aktibo vs. EZ tratatu) eta ez parekatuak (Mann-Whitney proba) gaixoak kontrol ez-zeliakoekin konparatzeko. Koadierazpen analisiak Spearman korrelazio probaren bidez burutu ziren. Bero-mapak Fribourg unibertsitateko Microsoft Excelen FiRe 2.2 Macro bertsioan eraiki ziren (<http://www.unifr.ch/plantbio/FiRe/main.html>.) Bakarrik 2 muturreko p-balioa  $< 0,05$  hartu zen esangarritzat.





## **4. Emaizak**



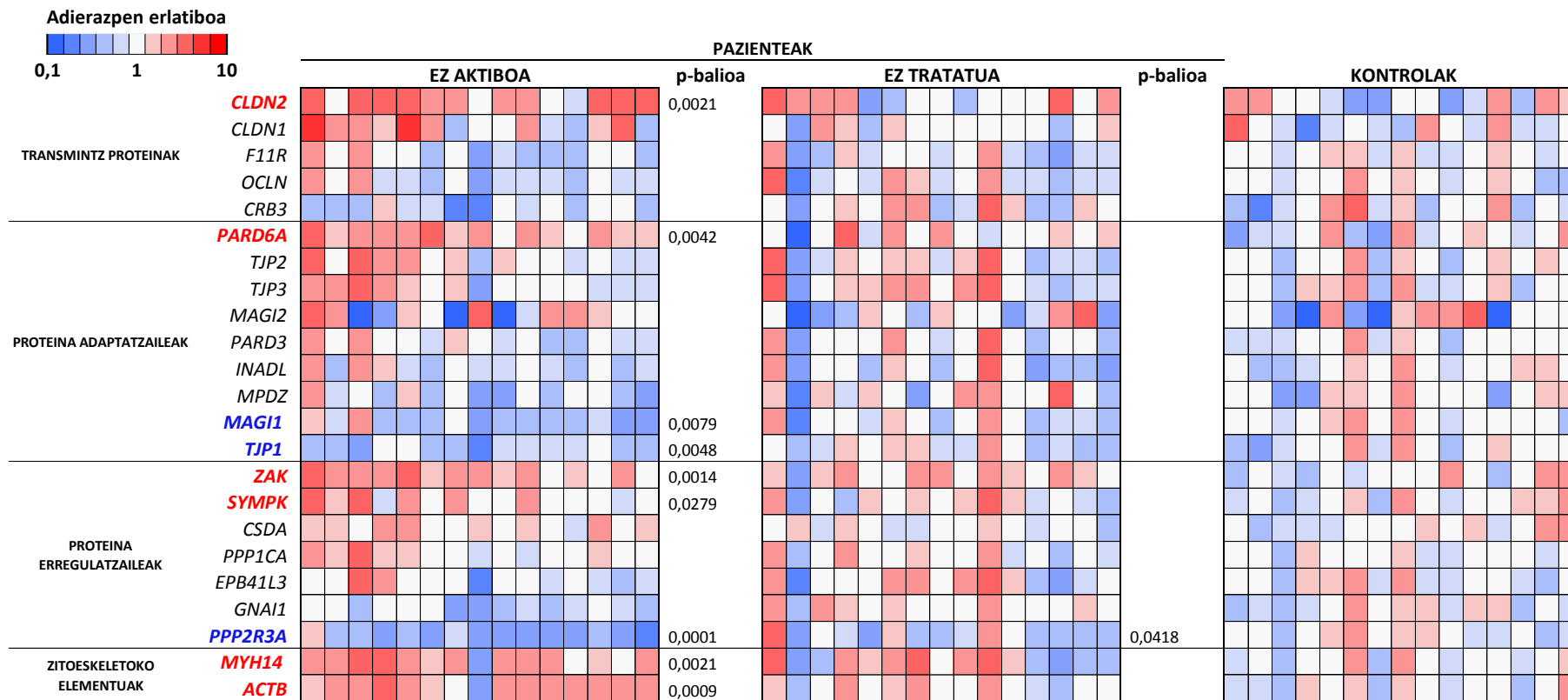
## 1. Lotura hertsien bidezidorra eritasun zeliakoan

### 1.1. Adierazpen analisiak

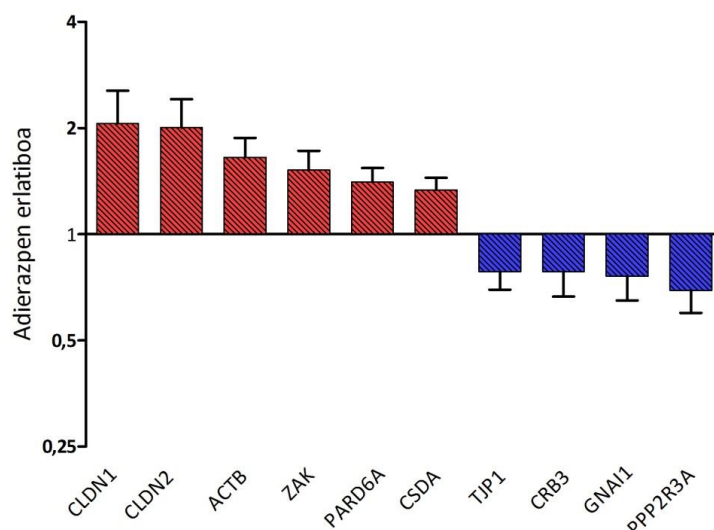
LHen bidezidorraren irudi orokorra sortzeko, gene partaideen adierazpen profila burutu zen EZ aktibo (n=15), EZ tratatu (n=15) eta kontrol ez-zeliakoen (n=15) taldeetan (9. irudia). EZ aktibo taldeko adierazpen maila kontrolekiko alderatu zenean, ikertutako 23 geneetatik 9k adierazpena aldatuta zutela ikusi zen; 6 gene gainadierazita eta 3 gene azpiadierazita (9. irudia). EZ tratatuen kasuan, GGDren ostean *PPP2R3A* genea iraun zuen aldatuta eta kontrolekiko azpiadierazita.

Gaixoen taldeen arteko adierazpen mailen konparaketa egitean (EZ aktiboa vs. EZ tratatua) lehen aipatutako 9 geneetatik 6 genek kontrolekiko alderatzean zuten joera berbera aurkeztu zuten (10. irudia). Horretaz gain, *CLDN1* eta *CDSA* geneak gainadierazita eta *CRB3* eta *GNAI1* azpiadierazita zeuden.

Adierazpen analisia berregin zen talde bakoitzeko 15 biopsia lagin gehiago gehituz (n=30). Analisi bateratu honetan, aurretik ikusitako aldaketak baieztatzeaz gain, beste hainbat alterazio identifikatu dira (6. taula). EZ aktibo taldea kontrolekiko alderatzean, ikertutako 23 geneetatik 15 genek zuten adierazpena aldatuta. EZ tratatu taldean aldiz, gene gehienak kontrolekiko balio antzekoak aurkeztu zituzten *PPP2R3A*, *INADL* eta *TJP1* geneak izan ezik. Hiru gene hauek, kontrolak baino adierazpen baxuagoa aurkeztu zuten (Datu guztiak 1. eranskinean).



9.irudia. Gene hautagaien adierazpen mailaren grafikoa. Zutabe bakoitza indibiduo bakarrari dagokio. EZ aktibo eta EZ tratatu taldeen kasuan, parekatuak direnez, indibiduo berdinen emaitzak zutabe berebean agertzen dira. Lerro bakoitzak gene hautagai bat erakusten du eta hauek funtzioaren arabera daude taldekatuta. Kolore eskalak gene eta lagin bakoitzaren kontrolen batz bestearikiko adierazpen erlatiboa adierazten du. P-balioak Mann-Whitney U testaren bidez lortu dira eta irudian, kontrolekiko alderatutako ezberdintasunak soilik aurkezten dira ( $p < 0,05$ ). Gainadierazitako geneak gorritz eta azpiadierazitakoak urdinez koloreztatu dira.



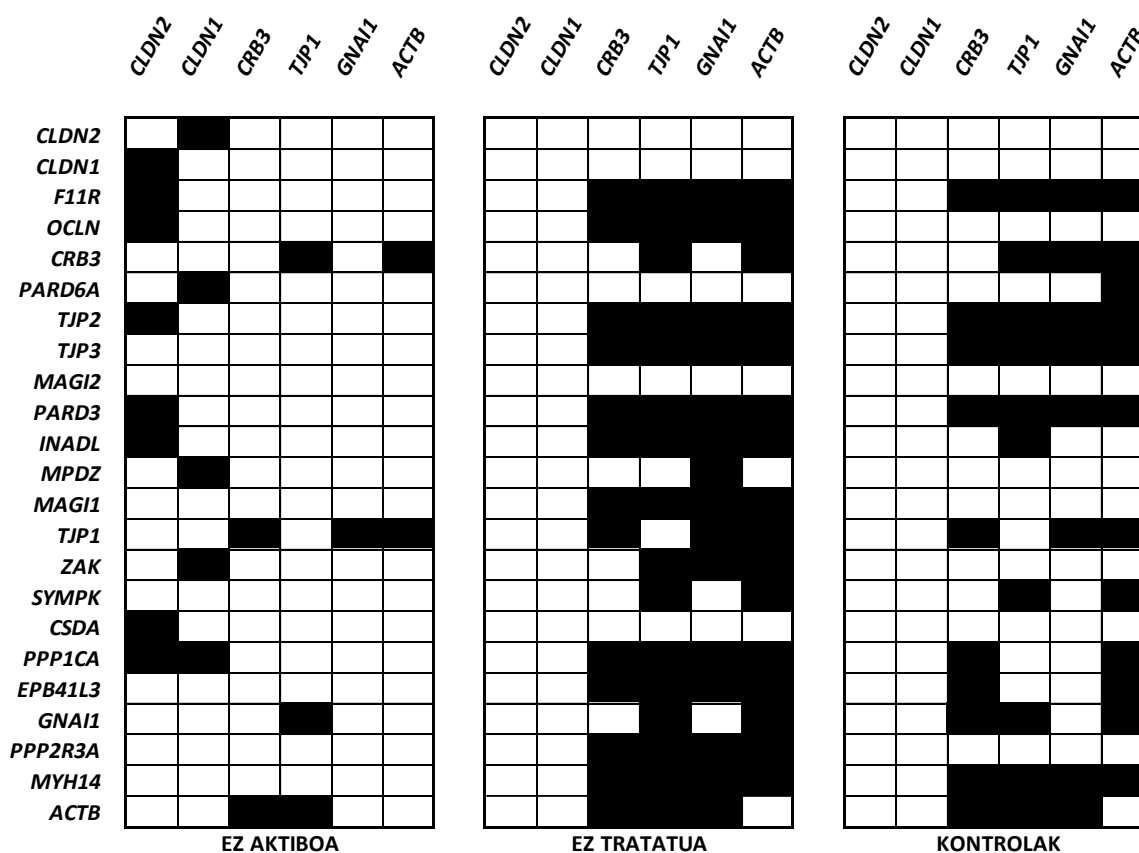
10. irudia. EZ aktibo eta EZ tratatu taldeen arteko adierazpen erlatiboa. EZ aktibo taldea EZ tratatu taldeekiko adierazpena aldatuta duten geneak aurkezten dira. (Wilcoxon signed-rank testa, p-balioa <0,05). Irudian gene bakoitzaren kontrolen batz besterekiko duten adierazpen erlatiboaren batzbestekoa eta SD adierazten dira. Kolore gorriak gainadierazpena eta urdinak azpiadierazpena irudikatzen dute.

6.taula. EZ aktibo (n=30), EZ tratatu (n=30) eta Kontrol (n=30) taldeen adierazpenaren analisi bateratua. Gene hautagaiak funtzioaren arabera taldekatu dira eta ezberdin adierazten diren geneen adierazpen erlatiboa irudikatu da soilik (P-balioa < 0,05). Gainadierazitako geneak gorri eta azpiadierazitakoak urdinez koloreztatu dira.

		EZ/ Kontrolak		EZ aktiboa /
		EZ Aktiboa	EZ Tratatu	EZ tratatua
TRANSMINTZ PROTEINAK	<i>CLDN2</i>	1,62		1,65
	<i>CLDN1</i>	1,56		1,82
	<i>F11R</i>	0,82		
	<i>OCLN</i>	0,83		
	<i>CRB3</i>			
PROTEINA ADAPTATZAILEAK	<i>PARD6A</i>	1,79		1,62
	<i>TJP2</i>			
	<i>TJP3</i>			
	<i>MAGI2</i>			
	<i>PARD3</i>			
	<i>INADL</i>	0,75	0,79	
	<i>MPDZ</i>	0,64		
	<i>MAGI1</i>	0,63		0,7
<i>TJP1</i>	0,62	0,78	0,79	
PROTEINA ERREGULATZAILEAK	<i>ZAK</i>			1,28
	<i>SYMPK</i>	1,25		1,35
	<i>CSDA</i>			1,16
	<i>PPP1CA</i>	1,31		1,23
	<i>EPB41L3</i>			
	<i>GNAI1</i>	0,77		0,68
	<i>PPP2R3A</i>	0,46	0,83	0,56
ZITOSKELETOKO ELEMENTUAK	<i>MYH14</i>	1,96		1,68
	<i>ACTB</i>	1,77		1,47

## 1.2. Koadierazpen analisiak

Adierazpen aldaketek geneen adierazpen sarean eraginik izan dezaketen argitzeko, koadierazpen analisiak burutu ziren (Datu guztiak 2. eranskinean). Emaizak erakutsi zuten, *CRB3*, *TJP1*, *GNAI1* eta *ACTB* geneek EZ tratatu eta kontrol taldeetan zuten beste geneekiko koadierazpen patroia EZ aktibo taldean galdu egiten dutela (11. irudia). Bestalde, *CLDN2* eta *CLDN1* genek EZ aktibo taldean soilik agertzen dute beste zenbait geneekiko korrelazio positiboa. EZ tratatu eta kontrol taldeetan aldiz, ez dute beste geneekiko koadierazpenik.



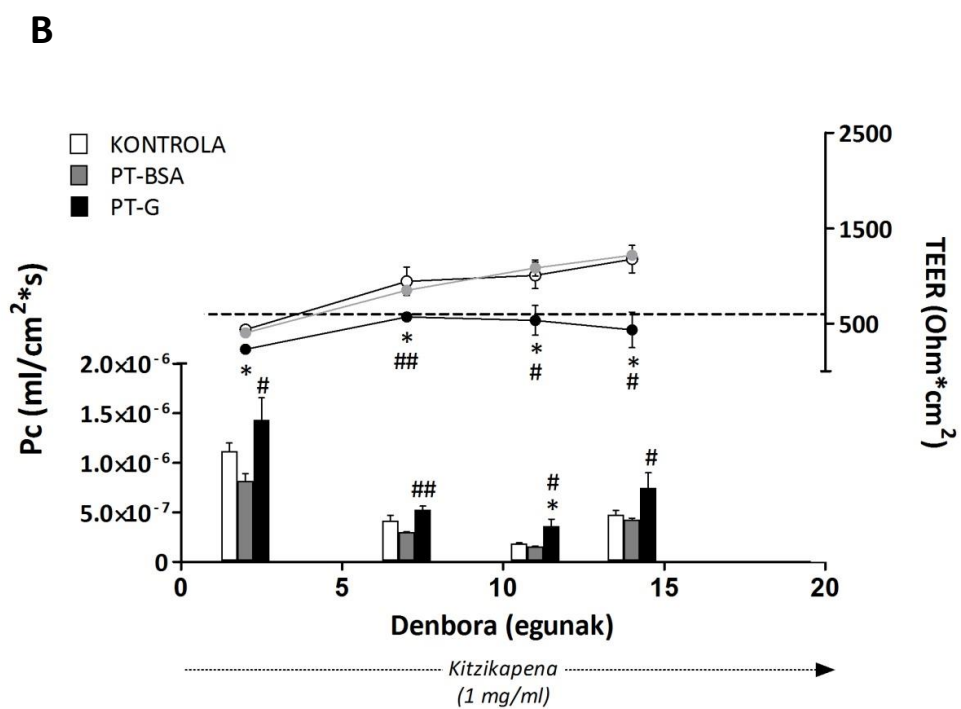
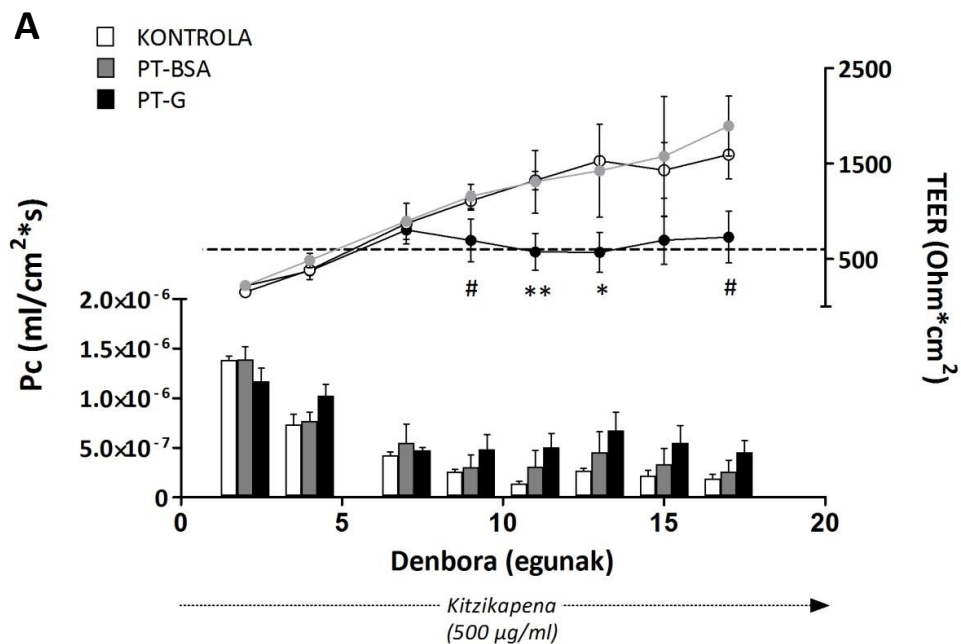
11.irudia. Gene hautagaien korrelazio matrizea. EZ aktibo, EZ tratatu eta Kontrol taldeen arteko geneen koadierazpen ereduak aurkezten dira. Lauki beltzek, dagokien bi geneen arteko korrelazioa irudikatzen dute (Spearman proba, p-balioa <0,05).

### 1.3. Gliadinaren eragina lotura hertsien menpeko epitelio hesian

Hesteetako epitelio zelulek fluxu parazelularra kontrolatzen duten geruza bakarrak eratzen dituzte. LHen erregulazioa adierazpen mailan aldatuta egoteaz gain, egitura mailan ere aldatuta dagoela erakusteko asmoetan, C2bbe1 epitelio zelulak eredu gisa erabiliz glutenaren osagai immunogenikoak (gliadinak) geruza bakarren sorreran eta osotasunean duen eragina aztertu zen.

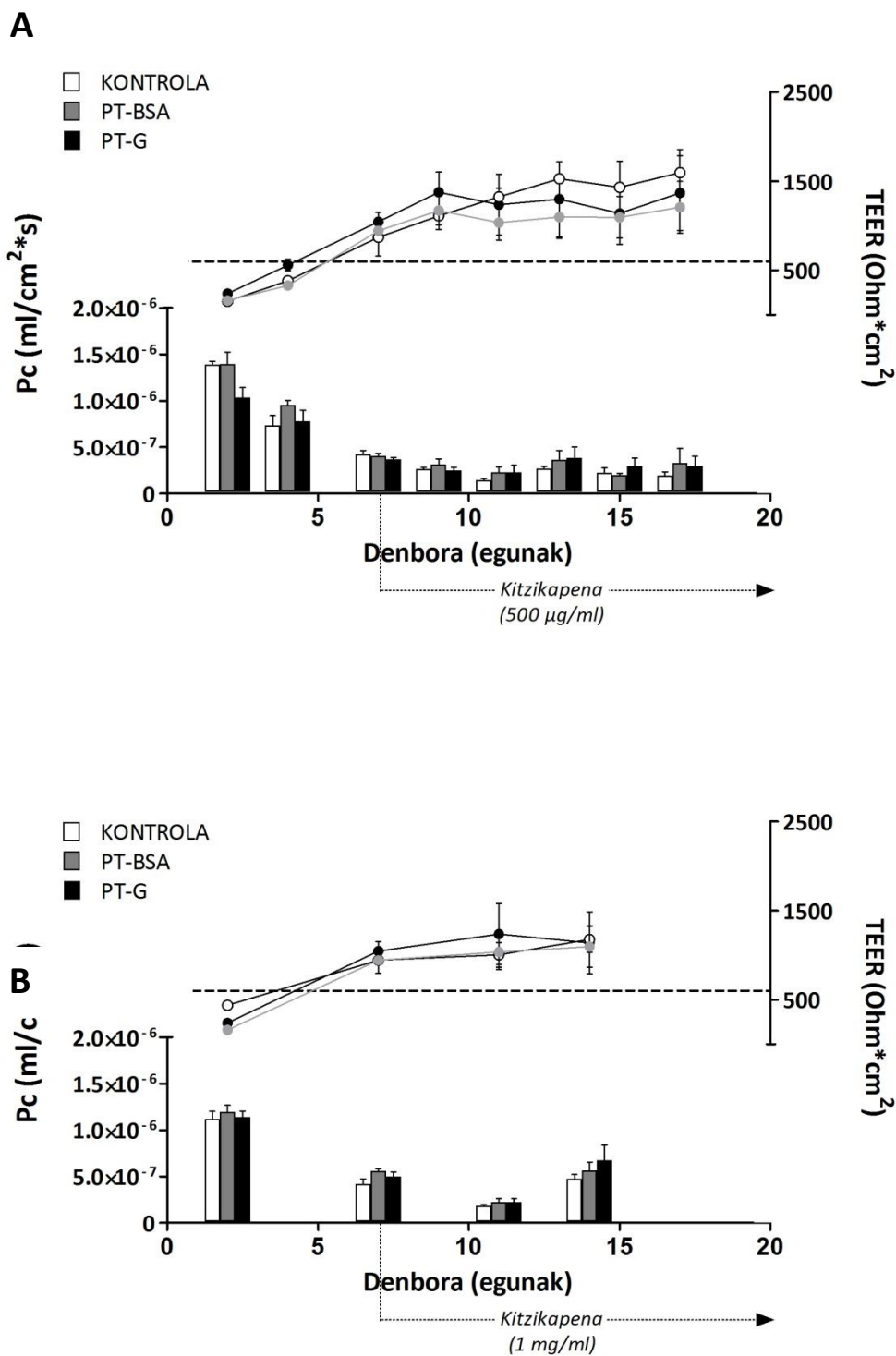
Zelulen geruza bakarrak eratzeko gaitasuna bi parametroen bidez neurtu zen: epitelioan zeharreko erresistentzia elektrikoaren (TEER) eta *Lucifer yellow* (LY) entseguaren fluxu parazelularren (12. eta 13. irudia) neurketen bidez. Kitzikapenik ezean (kontrolak), zelulek astebetean eratu zituzten geruza bakarrak, 7. egunerako atalase maila gaindituz ( $819,18 \pm 317,01 \text{ ohm} \cdot \text{cm}^2$ ). Hurrengo egunetan TEER balorea emendatzen joan zen 13. egunerarte ( $1526,8 \pm 22,83 \text{ ohm} \cdot \text{cm}^2$ ). Hortik aurrera TEER balioa  $1500 \text{ ohm} \cdot \text{cm}^2$  inguruan egonkortu zen esperimentu amaiera arte. Bestalde, geruza bakarrak eratzen zihozten heinean, iragazkortasun parazelularra gutxituz joan zen 11. egunera arte ( $1,67 \times 10^{-7} \pm 2,96 \times 10^{-8} \text{ ml/cm}^2 \cdot \text{s}$ ) eta hortik aurrera egonkortu zen.

Pepsina eta tripsinaz digeritutako gliadinak (PT-G) geruza bakarren osotasunean eragin suntsikorra ote zuen ere aztertu zen. Lehenik, PT-G kitzikapenak geruza bakarren eraketan zuen eragina aztertu zen, zelulak esperimentu hasieratik PT-Grekin (eta PT-BSA kontrol negatiboarekin) kitzikatuz (4. irudia). PT-G, geruza bakarren eraketa eteteko eta iragazkortaun parazelularra emendatzeko gai izan zen. Gainera, eragina PT-G kontzentrazioaren menpekoa izan zen. Zelulak  $500 \mu\text{g/ml}$  PT-Gz kitzikatzean, zelulak 7. egunerako geruza bakarren eraketaren atalase mailara heldu ziren ( $803,22 \pm 171,11 \text{ ohm} \cdot \text{cm}^2$ ) baina hortik aurrera TEER baloreak ez zuen gora egin eta esperimentu osoan zehar baloreak egonkor iraunez (12A irudia). Antzeko baloreak lortu ziren PT-G kontzentrazioa  $1 \text{ mg/ml}$ -ra igota (4B irudia), TEER baloreak zertxobait baxuagoak izanik 7. egunean ( $568,15 \pm 46,68 \text{ ohm} \cdot \text{cm}^2$ ) eta balore horretan egonkortuz hurrengo egunetan zehar.



**12. irudia. Gliadinaren eragina C2bbe1 heste zelulen geruza bakarren eraketan eta iragazkortasun parazelularrean.** Eskubiko Y ardatzean TEER balioak ageri dira eta ezkerrekoan LYren iragazkortasun koefizientzia (PC). PT-G eta PT-BSA bidezko kitzikapena A) 500 µg/ml-ko eta B) 1mg/ml-ko kontzentrazioetan burutu zen. TEER=600 ohm\*cm<sup>2</sup> altueran dagoen lerroak geruza bakarrek eratzeko gainditu neharreko atalase maila esan nahi du. Gezi etenak kitzikapen denbora ordezkutzen du. Laginen batz besteko balioak eta baztaz bestekoaren errore tipikoa erakusten dira. Kontrolekiko ezberdintasunak asterizko bidez eta PT-BSA kontrol negatiborekiko ezberdintasunak traola bidez adierazi dira (\* edo # p-balioa 0,01 < 0,05; \*\*edo ## p-balioa 0,001 < 0,01).





**13. irudia. Gliadinaren eragina C2bbe1 heste zelulek eratutako geruza bakarren osotasunean eta iragazkortasun parazelularrean.** Eskubiko Y ardatzean TEER balioak ageri dira eta ezkerrekoan LYren iragazkortasun koefizientzia (PC). PT-G eta PT-BSA bidezko kitzikapena A) 500 µg/ml-ko eta B) 1mg/ml-ko kontzentrazioetan burutu zen. TEER=600 ohm\*cm<sup>2</sup> altueran dagoen lerroak geruza bakarrak eratzeko gairak beharrezko maila esan nahi du. Gezi etenak kitzikapen denbora ordezkatzen du. Laginen batzuetan beste balioak eta batzuetan beste balioaren errore tipikoa erakusten dira. Kontrolerik ezberdintasunak izartxo bidez eta PT-BSA kontrol negatiborekiko ezberdintasunak traola bidez adierazi dira (\* edo # p-balioa 0,01 < 0,05; \*\*edo ## p-balioa 0,001 < 0,01).

Iragazkortasun parazelularrari dagokionez, 500 µg/ml PT-Gren kitzikapenak ez zuen kontrolekiko ezberdintasunik eragin, nahiz eta PT-Gz kitzikatutako zeluletan iragazkortasuna emendatzeko joera antzeman (12A irudia). PT-Gren kontzentrazioa bikoiztuta aldiz, iragazkortasun parazelularraren emendioa ikusi zen (12B irudia). PT-Gz kitzikatutako zelulek PT-BSA kontrol negatiboarekin inkubatutakoak iragazkortasun altuagoa erakutsi zuten, eta 11. egunean kontrolekiko ere.

Bestalde, PT-Gk dagoeneko eraturako geruza bakarretan duen eragina ere aztertu zen, horretarako zelulak 7. egunetik aurrera PT-Gz (eta PT-BSAz) kitzikatuz (13. irudia) . Kasu horretan, ez zen eraginik ikusi ez geruza bakarren osotasunean, ezta iragazkortasun parazelularrean ere eta PT-Gz kitzikatutako zelulek bai kontrolen eta bai PT-BSA kontrol negatiboan antzeko balioak zituzten. Erabilitako PT-Gren bi kontzentrazio ezberdinetan emaitza bera lortu zen.

## **2. EZrekin suszeptibilitatea emendatzen duten eta LHekin erlazionatuta dauden geneen identifikazioa**

### **2.1. Asoziazio analisiak**

Espaniako populazioko 361 pertsonen DNA laginetan (270 EZ kasu eta 91 Kontrol), lehendik EZrekin asoziatuta dauden 8 polimorfismo (*MAGI2* genean kokaturiko 3 SNP, *PARD3* geneko 2 SNP eta *MYO9B* geneko beste 3 SNP ) genotipatu eta asoziazio analisiak burutu ziren (7. taula). Gure populazioan, *MAGI2* geneko rs6962966 polimorfismoaren eta EZ arriskuaren arteko asoziazioa topatu genuen. rs6962966, kontrolen taldean Hardy-Weinberg orekan zegoen eta alelo txikiaren agerpenak EZ garatzeko arriskua 1,88 aldiz emendatzen zuela ikusi genuen. Ez zen beste aldaerarik EZ garatzeko arriskuarekin asoziatuta aurkitu, ez *MAGI2*n, ez *PARD3*n ezta *MYO9B*n ere.

## 2.2. Asoziatutako eremuaren karakterizazioa

### 2.2.1. Inguru genomikoa: *MAGI2*ren eta *RP4-587D13.2*ren karakterizazioa

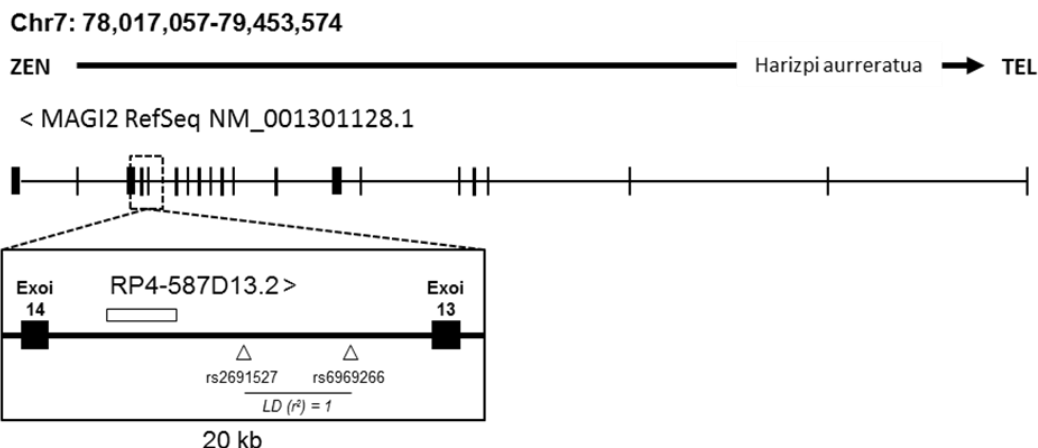
Asoziatutako polimorfismoak gaixotasunaren garapenean izan dezakeen eragina argitzeko, rs6962966 SNParen testuinguru genomikoa aztertu zen. rs6962966 aldaera *MAGI2* (mintzari loturiko guanilato kinasa) kodetzen duen genearen eremu introniko batean kokatzen. Eremu introniko horretan *RP4-587D13.2* RNA transkripto luzea ere aurkitzen da, 721 bp-ko luzera duena eta rs6962966 aldaeratik 3.9 kb ur gora dagoena (14A irudia). Transkripto horren funtzioa ezezaguna den arren, RNA ez kodetzaileen taldean sailkatzen da (kodetze potentzia kalkulatzailerik programaren arabera).

EZari asoziatutako rs6962966 polimorfismoak eremu genomiko berdinean kokatutako geneetan eraginik duen ezezaguna denez, gene horien adierazpen mailako aldaketak karakterizatu ziren. Lehenik eta behin, *MAGI2* eta *RP4-587D13.2* geneek giza ehun ezberdinetan duten adierazpen profila ikertu zen. Bi geneak ikertutako giza ehun guztietan adierazten ziren, hesteak barne (EZaren itu ehuna), nahiz eta adierazpen maila altuena burmuinean aurkeztu zuten (14B eta 14C irudiak). Gainera, *MAGI2* eta *RP4-587D13.2* adierazpenek giza ehun ezberdinen artean korrelazio positiboa zuten (Spearman  $r=0,933$ ; p-balioa 0,0007). Kokapen zelularri dagokionez, *RP4-587D13.2* batez ere nuklearra dela ikusi zen (14, D irudia).

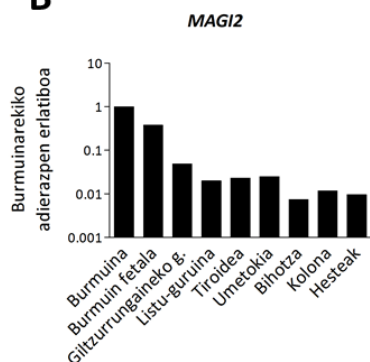
7.taula. LHN partaide diren geneetako SNP eta EZren arteko asoziazio analisia. Asoziaturiko SNPa beltzez markatu da. Chr=kromosoma; OR= aukera-arrazoia; CI= konfiantza tartea.

SNP	Kokapena (Hg38)	Geneak	Alelo txikia	Maiztasuna EZn	Maiztasuna kontroletan	p-balioa	OR	(CI %95)
<b>rs6962966</b>	<b>chr7: 78174806</b>	<b>MAGI2</b>	<b>A</b>	<b>0,521</b>	<b>0,3661</b>	<b>0,0029</b>	<b>1,88</b>	<b>(1,24-2,87)</b>
rs9640699	chr7: 78366115	MAGI2	A	0,3613	0,3056	0,1763	1,29	(0,89-1,85)
rs1496770	chr7: 78629694	MAGI2	T	0,4699	0,4341	0,4022	1,16	(0,82-1,62)
rs10763976	chr10: 34275364	PARD3	G	0,4713	0,456	0,7246	1,06	(0,76-1,49)
rs4379776	chr10: 34328092	PARD3	T	0,3811	0,4286	0,2583	0,82	(0,58-1,16)
rs2305767	chr19: 17183487	MYO9B	C	0,3547	0,3956	0,3311	0,85	(0,59-1,19)
rs1457092	chr19: 17193427	MYO9B	A	0,394	0,3889	0,9042	1,02	(0,72-1,45)
rs2305764	chr19: 17203024	MYO9B	A	0,4147	0,4333	0,671	0,93	(0,65-1,32)

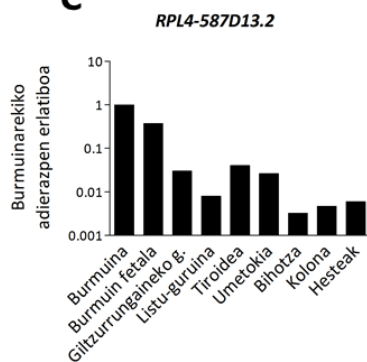
A



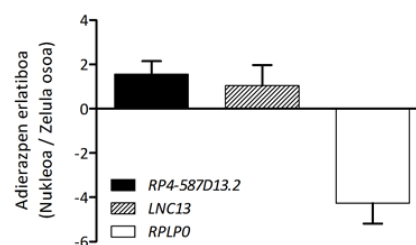
B



C



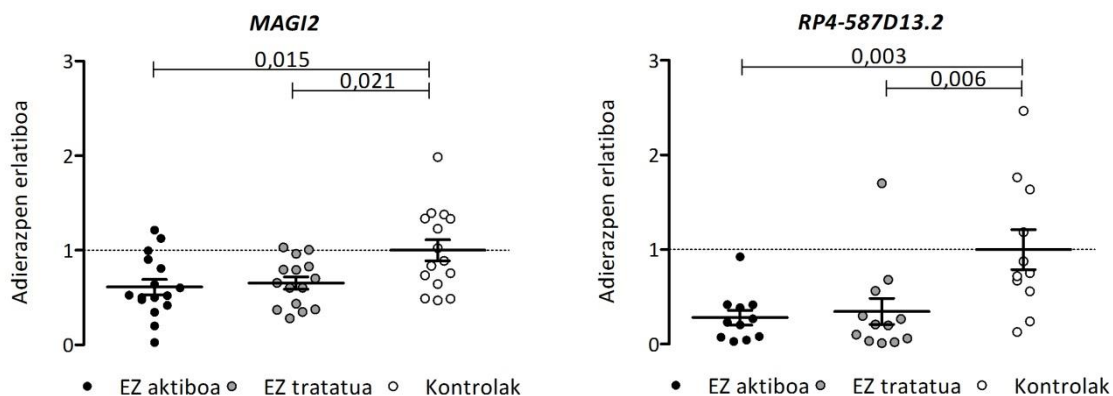
D



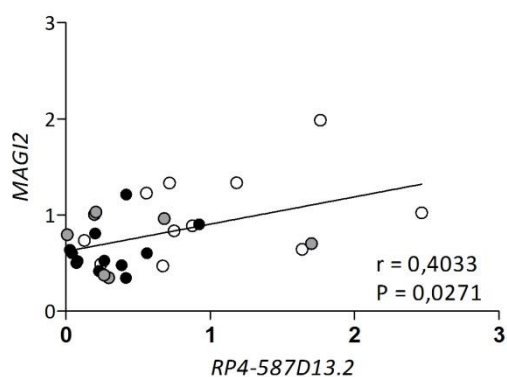
14. irudia. Asoziatutako eskualdearen karakterizazioa. A) *MAGI2* genearen exoi-introi egitura eta rs6962966 SNP inguruko 20 kb-tako genomaren eskema B) *MAGI2* genearen eta C) *RPL4-587D13.2* lncRNAren adierazpen profila 9 giza ehunetan. Adierazpen balioak adierazpen altuena zuen ehunarekiko (burmuinarekiko) erlatibizatu dira. D) *RPL4-587D13.2*ren lokalizazio zelularra. Transkriptoaren kantitate nuklearra zelula osoarekiko erlatibizatu da. *LNC13* eta *RPLP0* geneak kontrol nuklear eta kontrol zitoplasmatico modura erabili dira, hurrenez hurren. Irudiak laginen batz bestekoa eta batz bestekoaren errore tipikoa erakusten du.

### 2.2.2. *MAGI2n* eta *RP4-587D13.2n* adierazpena EZn

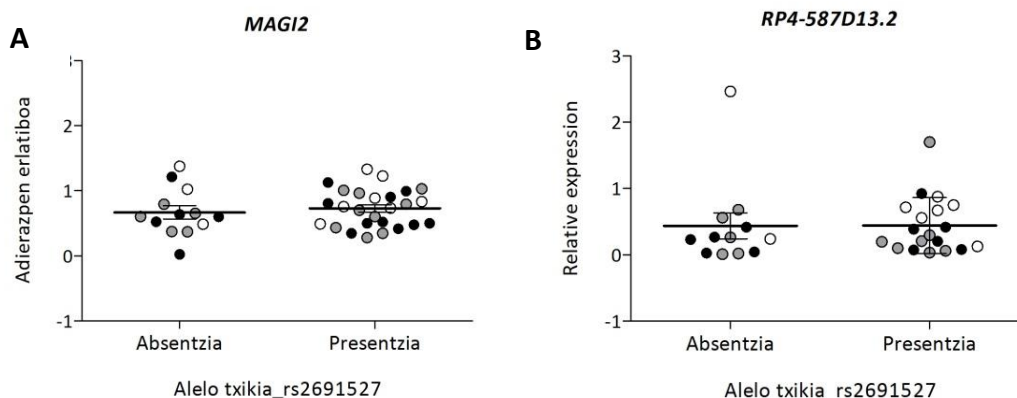
*MAGI2ren* eta *RP4-587D13.2ren* adierazpena pazienteen heste biopsietan ere aztertu zen EZ aktibo (n=15), EZ tratatu (n=15) eta kontrol ez gaixoetan (n=15) (15. irudia). EZdun gaixo aktiboak kontrolekin alderatzean, bi geneak azpiadierazita zeudela ikusi zen. Gaixo hauek GGD ezartzean ere, hau da, EZ tratatuan, bi geneak berriz ere azpiadierazita zeuden. Gainera, biopsia duodenaletan ere ikusi zen giza ehunetan ikusitako (14. irudia) *MAGI2ren* eta *RP4-587D13.2ren* arteko adierazpenaren korrelazio positiboa (15C irudia).



**15.irudia. EZri asoziatutako eskualdearen adierazpen analisia.** A) *MAGI2*ren eta B) *RPL4-587D13.2*ren adierazpena EZ aktibo, EZ tratatu eta Kontrol taldeetan. Adierazpen balioak kontrolen batz bestearikiko erlatibizatu dira. Irudian batz bestekoa eta batz bestekoaren errore tipikoa erakusten dira. C) *MAGI2*ren eta *RPL4-587D13.2*ren arteko korrelazio analisia. Spearman R eta p balioak irudikatu dira.

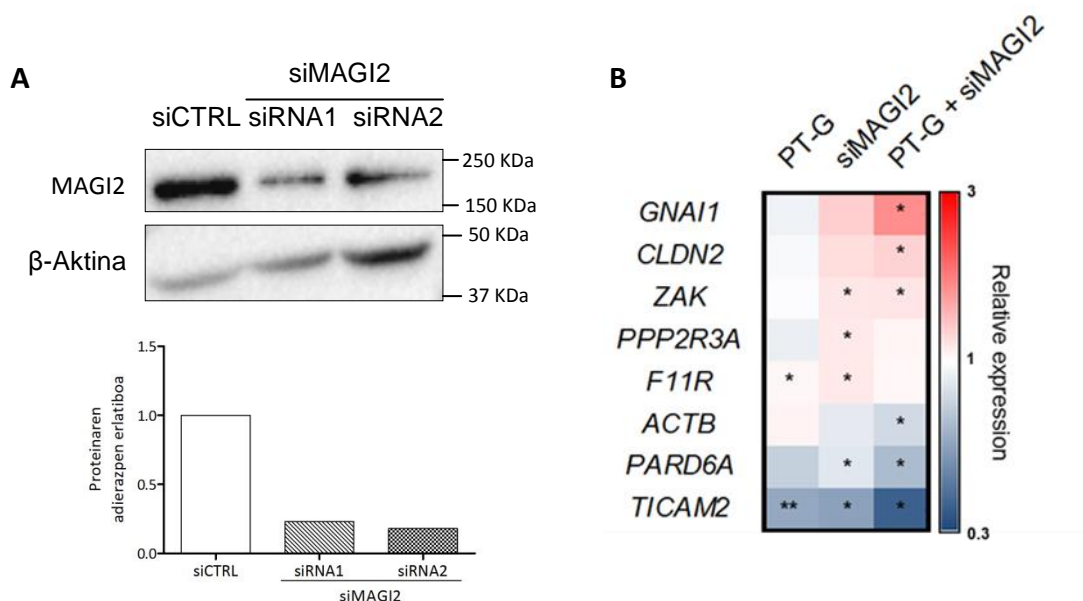


eQTL analisia burutu zen EZri asoziatutako rs6962966 SNPa *MAGI2*ren eta *RPL4-587D13.2*ren azpiadierazpena eragiten zuen argitzeko. Ez zen asoziaziorik aurkitu SNPa eta *MAGI2* eta *RPL4-587D13.2* biopsia duodenaleko adierazpenen artean (16. irudia).



**16. irudia. *MAGI2* eta *RP4-587D13.2* geneen eta rs2691527 SNParen arteko eQTL analisia.** Analisisian EZdun gaixoen (EZ aktibo edo EZ tratatu) eta kontrolen biopsia duodenaleko laginak aztertu dira. Irudiak rs2691527 genotipoaren (alelo txikiaren presentzia edo absentzia) arabera adierazpen maila erakusten du. Adierazpena kontrolen batz bestearikiko erlatibizatu da.

### 2.2.3. *MAGI2*ren isilarazpenak eta gliadinaren kitzikapenak LHko geneen adierazpenean duten eragina



17. irudia. *MAGI2*ren isilarazpenak eta gliadinaren kitzikapenak LHko geneen adierazpenean duten eragina A) *MAGI2* proteinaren adierazpena siRNA bidez *MAGI2* genea isilarazitako C2BBe1 zeluletan. Goiko irudian Western Blot-a eta azpian horren kuantifikazioa ikus daitezke. Adierazpena  $\beta$ -aktina kontrol endogenoarekiko erlatibizatu da. B) Gene hautagaien adierazpen profila baldintza ezberdinetan. Adierazpena aldatuta zuten geneak irudikatu dira. Adierazpena kontrolen (siCTRL bidez isilarazitako eta PT-BSAz kitzikatutako zelulen) batz bestearikiko erlatibizatu da. Zutabe bakoitza baldintza bakoitzari eta lerro bakoitza gene hautagai bakoitzari dagokio. Eskubiko kolore eskalak adierazpen erlatiboa neurtzen du, gorria gainadierazpena eta urdina azpiadierazpena izanik. Kontrolerik ezberdintasunak izartxo bidez markatu dira (\* p-balioa 0,01 < 0,05; \*\* p-balioa 0,001 < 0,01). siCTRL= itu gabeko siRNA kontrola; siMAGI2= *MAGI2*rako espezifikotasuna duen siRNA.

EZdun gaixoetan aurkitutako *MAGI2* genearen azpiadierazpenak LH bidezidorrean izan dezakeen eragin funtzionala hobeto ulertzeko, gaixoen hestearen modelo sinplifikatu bat eratu genuen *in vitro*, C2BBe1 heste zeluletan *MAGI2* genea isilaraziz. Zelula hauek PT-Gz kitzikatu eta LH bidezidorrean partaide diren 22 geneen adierazpena neurtu zen.

siRNA bidezko *MAGI2* isilarazpenaren efizientzia %75ekoa baino altuagoa izan zen (17A irudia). Isilarazi gabeko zelulen PT-G bidezko kitzikapenak oso

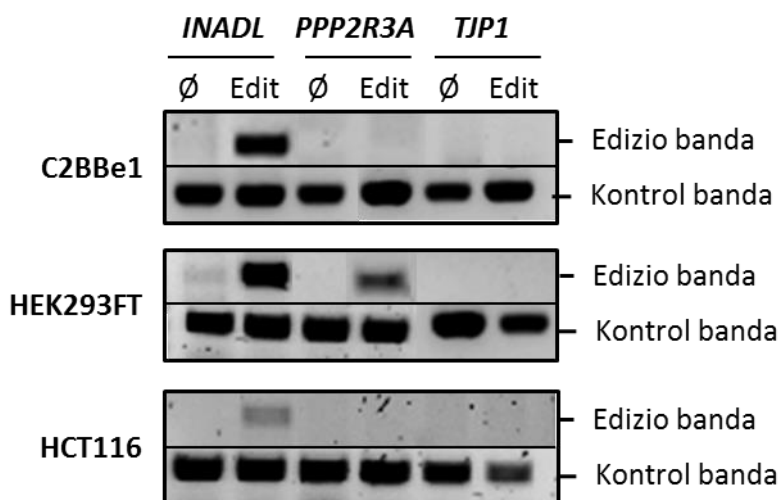
inpaktu txikia izan zuen gene hautagaien adierazpenean, *F11Rren* eta *TICAM2ren* adierazpena aldatuz. *MAGI2ren* isilarazpenak aldiz, *F11R*, *PARD6A*, *PPP2R3A*, *TICAM2* eta *ZAK* geneen alterazioa eragin zuen (17, B irudia). *MAGI2* isilarazitako zelulak PT-Gz kitzikatzerakoan, adierazpen aldaketak nabarmenagoak izan ziren *ZAK*, *PARD6A* eta *TICAM2* geneetan eragin emendatuak ikusiz, eta *GNAI1*, *CLDN2* eta *ACTB* geneen adierazpenetan alterazio berriak eraginez.

### 3. EZn berezko alterazioa aurkezten duten LH geneen edizio genetiko

EZdun gaixoetan aurkitzen den *INADL*, *PPP2R3A* eta *TJP1* geneen berezko azpiadierazpena (1. kapitulua) gaixotasunaren garapenarekin erlazionaturik dagoen argitzeko, epitelio zeluletan analisi funtzionalak burutu ziren horretarako CRISPR/Cas9 genoma editatzeko teknika erabiliz .

#### 3.1. Gene edizioen balioztatzea

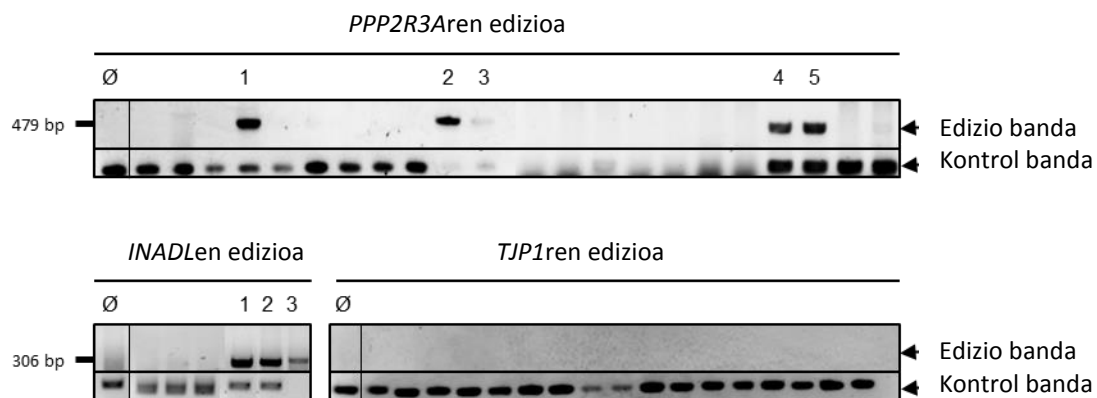
Gene hautagaien 1.exoia ezabatzeko, epitelio zelulei (C2BBe1, HCT116 eta HEK293FT) Cas9 nukleasa eta sgRNAk espezifikoak transfektatu zitzaizkien. Ondoren, delezioa balioztatzeko, eskualdearen amplifikazioa burutu zen exoiaren albo banatan loturiko hasleen bidez (18. irudia). *INADL* genearen exoiaren ezabapena 3 zelula motetan lortu zen bitartean, *PPP2R3A* genearen ezabapena HEK293FT zeluletan soilik antzeman zen. *TJP1* genearen kasuan berriz, ez zen deleziorik aurkitu ikertutako zelula guztietan.



18. irudia. *INADL*, *PPP2R3A* eta *TJP1* geneen delezio-mutazioaren baieztapena. Edizio banda, itu-exoien alboko eremuetan itsatsitako hasleen bidez amplifikatu da eta delezio-mutazioa eman bada soilik agertuko da. Kontrol banda, itu-exoien barneko eremuan itsatsitako hasleen bidez amplifikatu da eta ediziorik gertatu ez bada soilik agertuko da.

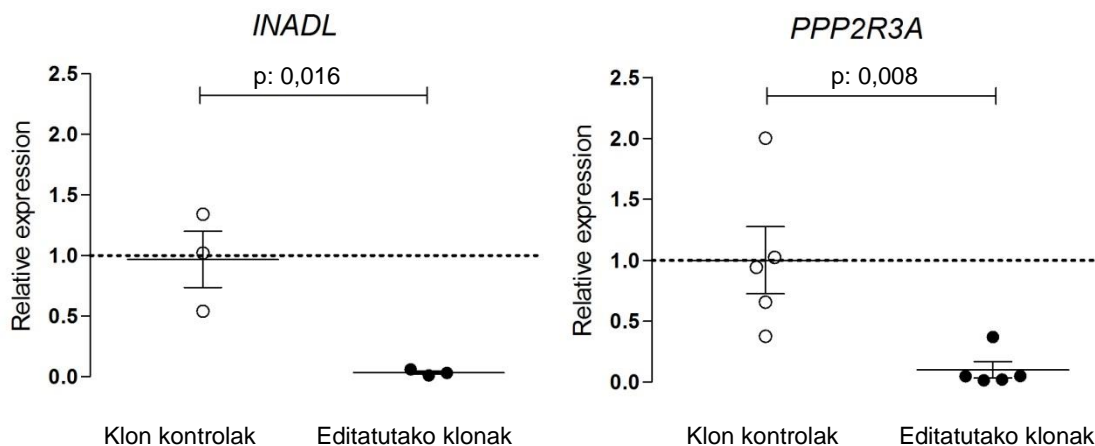


Genomaren edizioa %100ean eraginkorra ez denez, Gene hautagaiak editatzea lortu zen zelula kulturetan, zelula ez editatuak ere agertu ziren. Horien analisia ekiditeko, zelulak banaka isolatu eta bakoitzetik koloniak hedatu ziren; ondoren, delezio-mutazioa zeramaten koloniak hautatu ahal izateko (19. irudia). Heste zelulen lerroetan (C2BBe1 eta HCT116) ez zen lortu zelulen isolamendua aurrera eramatea eta lerro klonalak hedatzea. HEK293FT zeluletan berriz, *INADL* genearen kasuan 1. exoiaren ezabapena zeramaten 3 klon lortu ziren, eta *PPP2R3A* genearen kasuan 5 klon. Editatutako lerro zelular guztiak heterozigotoak izan ziren deleziorako, *INADL*en kasu batean izan ezik. Klon batean kontrol bandarik ez zen agertu, *INADL*en delezioa homozigotoa adieraziz.



**19. irudia.** *INADL*, *PPP2R3A* eta *TJP1* geneen edizioaren baieztapena HEK293FT lerro zelular klonaletan. Gene hautagaien delezio-mutazioa zeramaten zelula klonalak PCR amplifikazioaren bidez antzeman ziren (irudian zenbatuta). Itu-exoien alboko eremuetan itsatsitako hasleen bidez editatutako zelulak detektatu ziren, amplifikazioan edizio banda ikusiz. Edizio banda, itu-exoien alboko eremuetan itsatsitako hasleen bidez amplifikatu da eta delezio-mutazioa eman bada soilik agertuko da. Kontrol banda, itu-exoien barneko eremuan itsatsitako hasleen bidez amplifikatu da eta ediziorik gertatu ez bada soilik agertuko da.

Adierazpen analisisian editatutako zelulak, zelula ez editatuekin alderatzean, gene hautagaien adierazpena ia erabat isilarazi zela ikusi zen. Bi geneak, bai *INADL* baita *PPP2R3A* ere, kontrolekiko azpiadierazita zeuden editatutako HEK293FT zelula lerro klonaletan (20. irudia).



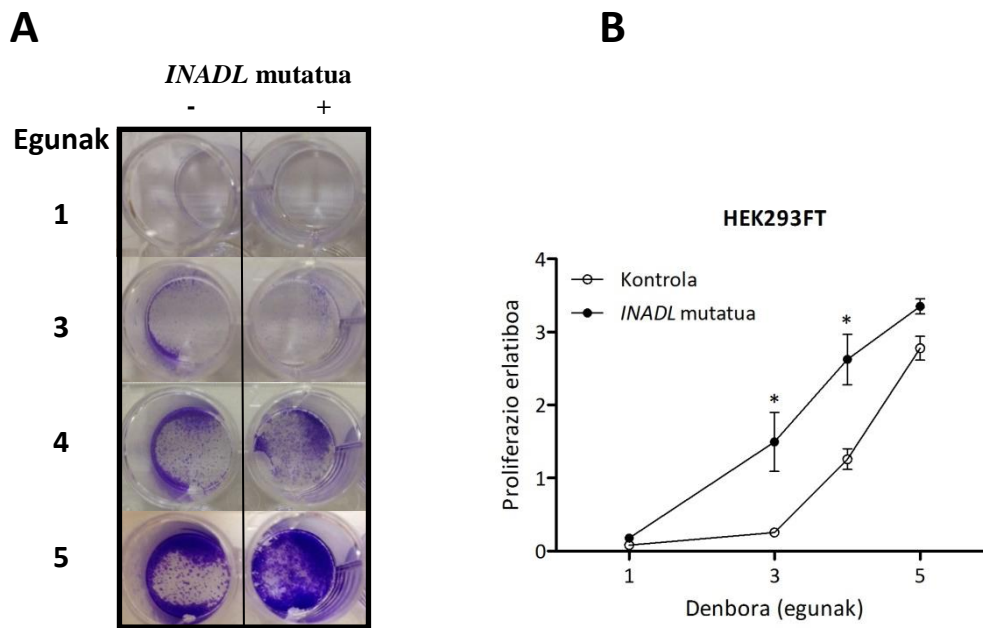
20. irudia. *INADL* eta *PPP2R3A* geneetan delezio-mutazioa duten HEK293FT zelulen adierazpen analisia. Adierazpen balioa bektore hutsarekin transfektatutako kontrolen batz bestekarekiko erlatibizatu da. Irudian laginen batz bestekoa, batz bestekoaren errore tipikoa (n=3) eta p-balioa agertzen da.

### 3.2. Edizioaren eragina zelularen funtzionamenduan

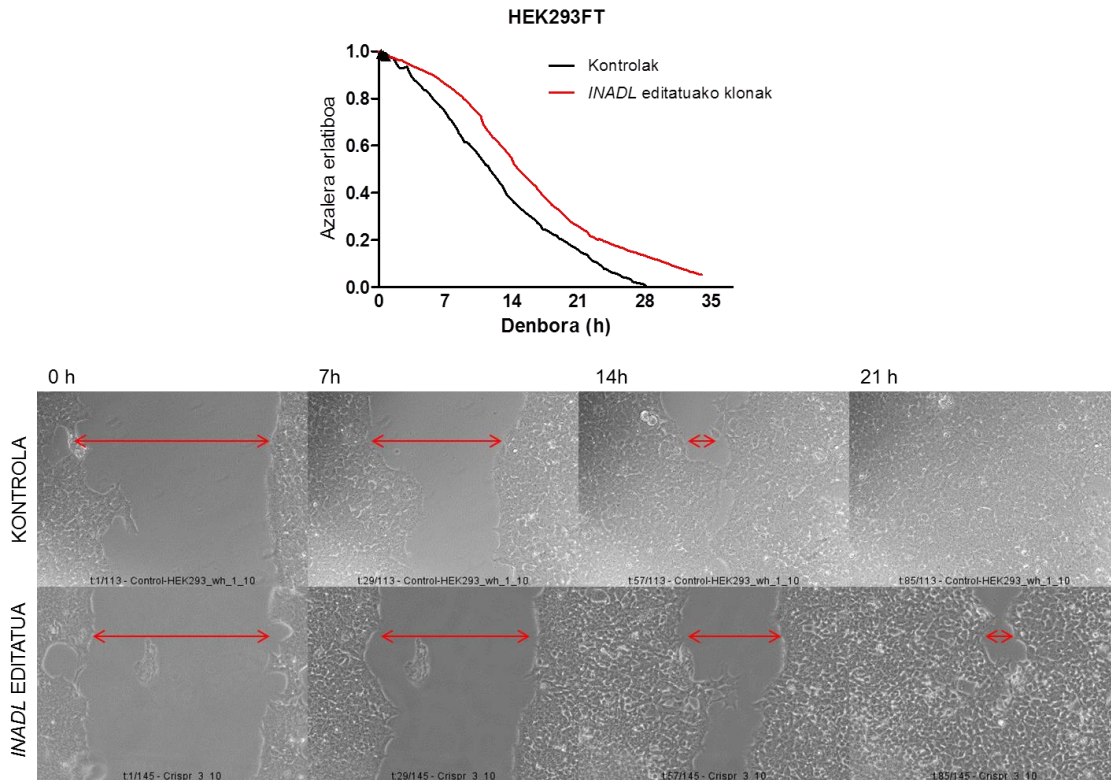
Geneen edizioak HEK293FT zelula lerro klonaletan izan zuen eragin funtzionala ikertu zen hurrena. *INADL* genearen funtzioa zelularen polarizazioarekin eta proliferazioarekin erlazionaturik dagoenez, *INADL* editatutako zelula lerroen proliferazio eta migrazio tasak neurtu ziren.

Zelulen proliferazioari dagokionez, *INADL* mutaturako zelulek kontrolak baino proliferazio tasa altuagoa aurkeztu zuten (21. irudia). Proliferazio mailen arteko desberdintasunak hazkuntzaren fase esponenzialean gertatu ziren, 3. eta 4. egunetan hain zuzen ere. Behin zelulak konfluentziara heltzean proliferazio mailak berdindu egin ziren.

Bestalde, zauri-sendatze entseguan, *INADL* mutaturako zelula lerroak kontrolak baino migrazio abiadura baxuagoa aurkeztu zuen (22. irudia). Editatutako zelulek denbora luzeagoa behar izan zuten zelularik gabeko eremu librea betetzeko. Nahiz eta desberdintasunak ez zuen esangarritasun estatistikoa lortu, joera bat behatu zen. Kontrolak eremu librea 21 orduetan bete zuten bitartean, zelula mutatuak 36 ordu behar izan zuten azalera bere betetzeko.



21. irudia. Proliferazio testa *INADL* editaturia duten HEK293FT lerro zelular klonaletan. A) *Crystal violet* tindaketa bidezko proliferazio tasaren neurketa *INADL* mutaturia duten zelula lerroetan eta kontrolatan. 5 eguneko denbora tarteko 4 neurketa irudikatu dira. Irudian 3 erreplika independenteetako esperimentu bakarra irudikatu da esperimentu osoaren adierazgarri. B) Denboran zeharreko proliferazio erlatiboa. Proliferazio balioa kontrolen batz bestekikiko erlatibizatu da. Balioen batz bestea eta batz bestekoaren errore tipikoa (n=3) irudikatu dira.



**22. irudia. Zauri-sendatze entsegua *INADL* mutaturako HEK293FT klonetan. Goiko irudian 36 orduko denbora tarteko migrazio tasa agertzen da. Migrazioa zelulek estalitako azaleraren kuantifikazioaren bidez kalkulatu da eta balioak hasiera puntuko azalarekiko erlatibizatu dira. Irudian esperimentu berdineko zelulen 3 eremu ezberdinen neurketaren batz bestekoa ikus daiteke. Beheko argazkietan, entseguaren 4 denbora puntu ageri dira esperimentu osoaren adierazgarri. Zelula kontrolen (goiko lerroa) eta *INADL* mutatu duten zelulen (beheko lerroan) migrazioa ikus daiteke 0, 7, 14, 21 orduetan. Gezi gorriak zelulez estali gabeko azalera adierazten du.**

## **5. Eztabaida**



## EZTABAIDA

Gaixotasunean bezalako baldintzetan zelularen baitan ematen diren aldaketak ulertzeko, ezinbestekoa da aktibo edo aldatuta dauden bidezidor biologikoak identifikatzea eta karakterizatzea. Gene adierazpenaren profilararen analisiak, zelularen funtzioa modu global batean aztertzea baimentzen du. Proiektu honetan, LHetan partaide diren 23 geneetatik 15, gaixotasun aktiboan ezberdin adierazten direla ikusi dugu. Honek, glutenaren eraginez garatzen den heste meharreko inflamazioak LHen bidezidorraren desantolaketa orokorra eragiten duela adierazten du. Gainera, koadierazpen analisisen arabera, adierazpen aldaketa hauek geneen arteko elkarrekintzetan ere eragiten dute.

Gure analisian antzemandako zenbait alterazio lehendik ezagunak ziren eta hainbat hesteetako gaixotasunetan (EZ, IBD, infekzio eta elikagaiekiko alergiak bestetak beste) heste-hesiaren suntsiketaren parte hartzen dutela ikusi da [103, 117], LHetako geneek patogenian eduki dezakeen garrantzia azpimarratuz. Adibidez, zitoeskeletoko osagaien gainadierazpena (gure emaitzetan ere ikusi duguna) gliadinak eragindako mikrotubuluaren berrantolaketarekin erlazionatzen da. Berrantolaketa honek, LHetako proteinen kokapen aldaketak eragiten ditu LHen egitura desantolatuz [118, 119]. Animalietan egindako *in vitro* eta *in vivo* azterketen arabera, zitokina hantura eragileek (IFN $\gamma$  eta TFN $\alpha$  besteak beste) zitoeskeletoa fosforilatzen dute eta honekin batera ematen den ZO-1 (*TJP1* geneak kodetuta) lokailu nagusiaren eta okcludina eta JAM-1 mintz-proteinen azpiadierazpenek LHen egitura desengonkortzen dute, heste-iragazkortasunaren emendioa eraginez [120, 121]. Bestalde, klaudina poro-eratzailen gainadierazpenak ere, bereziki klaudina-2renak, iragazkortasunaren emendioa eragiten du eta heste-hesiaren osotasuna gogor afektatzen dutela ikusi da [104, 105]. Horren adierazle, *CLND2* genea gaixotasunaren egoeraren arabera adierazten da, handiagoa izanik atrofia maila altuetan. Guk, gaixotasunaren karakteristikoa den *CLDN1* eta *CLDN2* geneen gainadierazpena ikusi dugu, eta hori ez ezik, gaixotasun aktiboan bidezidorreko beste gene batzuekin koadierazten direla ere ikusi dugu. Honek,

gaixotasun aktiboan klaudinen adierazpenaren emendioa erregulatu egiten dela iradokitzen digu, zelularteko fluxu-emendioa eraginez.

Bestalde, aurretik aztertu gabe zeuden beste gene batzuen alterazioa ere aurkitu dugu gaixotasun aktiboan. Polaritatearekin (*PARD6A* eta *INADL*), proliferazioarekin (*PPP2R3A*) eta beste seinalizazio batzuekin (*GNAI1* eta *CSDA*) erlazionatuta dauden beste gene batzuen alterazioa ere ikusi dugu, orain arte ezezaguna zena. Honek guztiak, bidezidorraren desantolaketa orokorra berresten du eta gure ustez, EZn ikusitako LHen desantolaketa eragin dezake. Alterazio hauek zelularen prozesu eta seinalizazio konplexu ezberdinetan partaide diren gene ugari eragiten die eta horrek bidezidorraren funtzionamenduan inpaktu sakona eduki dezakeela uste dugu. Adibidez, zelularen polarizazio egoki bat ezinbestekoa da LHen eraketetarako [122]. Dena den, gene bakoitzak EZn duen inplikazio funtzionala argitzeko analisi funtzionalak egin beharko lirateke gene hautagai bakoitzarekin.

Glutena dietatik kentzean, adierazpen aldaketa gehienak normalizatu egin ziren. Beraz, bidezidorraren desantolaketa orokorra, glutenak piztutako erantzunaren ondorioa da, kitzikapena kentzean itzulgarria dena. Beste era batera esanda, gene alterazio gehienak patogenesiaren parte dira baina ez daude suszeptibilitate genetikoarekin lotuak. Hau, Alessio Fasanoren taldearen hipotesiarekin bat dator. Beraien ikerketen arabera, gliadinak zonulina-bidezidorraren menpeko LHen desantolaketa eragiten du, heste-iragazkortasunaren emendio azkarra eraginez. Honek, gliadinaren fluxu ez kontrolatua baimenduko luke, erantzun inflamatorioa handituz [108-123]. Prozesu hau argitzeko saiakera ugari egin diren arren, ez dakigu gliadinaren trafiko librea bermatzen duen mekanismoa zein den, ezta parte-hartzaile funtzionalak zeintzuk diren ere.

Nahiz eta EZdun gaixoen heste-hesiaren suntsiketa glutenaren irenstearen ondorio dela jakina den, ikerketa froga ezberdinek iragazkortasunaren emendioa gaixotasunaren sorrera baino aurretikoagoa dela diote eta gaixotasunaren garapenean inplikaturik egon daitekeela iradoki da. EZren ezaugarriak zehazki erreproduzitzen dituen animali eredurik ez dagoenez, gaixotasuna garatu aurreko heste-hesiaren egoera aztertzeke ikerketak



mugatuak izan dira. Dena den, zelula lerro eta gaixoen ehun kultura ezberdinetan *in vitro* egindako ikerketek ezagutza zertxobait emendatu dute [124] hala nola, gliadinak gene adierazpenean duen eragina kuantifikatuz edo heste-zelulen geruzabakarretan iragazkortasun azterketak eginez. Ikerketa talde batek, LHetako hainbat proteina batzuk aldatuta ikusi zituzten EZren garapenaren goiztiarrean, oraindik heste-mukosaren egitura osasuntsua zenean [125]. Guk C2BBe1 heste-zelulen geruzabakarrak eratu ditugu eta gliadinaren egituran duen efektua neurtu dugu. Gure ereduaren arabera, gliadina LHen bidezko geruzabakarren eraketa inhibitzeko gai da baina ez ditu eratutako geruzabakarrak suntsitzen. Badirudi, gliadinaren kitzikapenak kaltetuak edo sortzeke dauden geruza bakarrei eragiten diela soilik eta egitura bere osotasuenan ez dagoenean kaltegarria izanik.

Gure emaitzek, EZn heste-hesiaren suntsiketa gaixotasunaren garapenaren aurretikoa dela iradokitzen dute, gliadina peptidoek kaltetuta dauden LHen bidezko geruza bakarrean eragin toxikoa edukiko bailukete, LHen egiturak suntzituz eta hesiaren eraketa ekidinez. Beraz, aurretik aipatu den moduan, heste-epitelioaren hesi funtzio kaltetua glutenak eragindako ondorio bat izan baino, aurretik agertzen den alterazio bat izango litzateke. *In vivo* iragazkortasun ikerketek gure aurkikuntzaren esanahi funtzionala aurkitzen lagunduko lukete.

Heste-hesiaren haustura gertaera goiztiarra bada, partaide funtzionalak suszeptibilitate genetikoan inplikaturik egongo dira. LHetako geneetan egindako asoziazio analisiek, *MAGI2*, *PARD3* eta *MYO9B* geneetako hainbat polimorfismo EZrekin eta IBDrekin asoziatu dituzte. Asoziazio hauek ez dira ikertutako populazio guztietan erreplikatu, giza gaixotasun arrunten konplexutasuna eta heterogeneitatea agerian utziz [126, 127]. Normalean, asoziatutako seinalearen indarra erlatiboki txikia izaten da eta asoziazioa detektatzeko ahalmena alelo txikiaren maiztasunaren menpe badago, populazioen artean bariazioak egon daitezke, emiatza negatiboak lortuz. Gure populazioan, *MAGI2* genearen introi bateko rs6969266 aldaearen asoziazioa erreplikatu dugu EZn, lehendik Britaniako eta Holandako populazioetan detektatu zena [107].

Aldaera honek, EZren patogenesian eduki dezakeen inplikazioa ikertzeko asmotan, rs6969266 inguruko eskualde genomikoa behatu genuen. *MAGI2* geneaz gain, funtzio ezezaguneko RP4-587D13.2 lncRNA ere bertan kokatzen zela ikusi genuen. Berriki, eremu intronikoak ncRNA erregulatzaileretan aberatsak direla jakin da eta azken urteetan transkripto hauetako batzuen funtzioa ere karakterizatu da [128]. Gene ez-kodetzaileak oso talde dibertsoa da eta oraindik ezezagunak dire mekanismo ezberdinen bidez geneen adierazpena erregulatzen dute. RP4-587D13.2 lncRNAren giza ehunetako adierazpen orokorrak eta zelula barneko lokalizazio nuklearrak funtzionala den transkripto bat dela adierazten du. Gainera, *MAGI2* genearen adierazpen profilarrekin bat dator, bai giza ehunetan, baita gaixoen heste-mukosan ere adierazpenaren korrelazioa positiboa baita. Honek, beste lncRNA introniko batzuetan ikusi den moduan, *RP4-587D13.2* *MAGI2*ren pre-mRNA berdinekin prozesatua izan daitekeela eta funtzionalki *MAGI2*rekin erlazionatuta egon daitekeela iradokitzen du [129].

*MAGI2*ren eta *RP4-587D13.2*ren adierazpena erlazionatuta egoteaz gain, bi geneak EZdun gaixoen duodenoan azpiadierazita daude. Gainera, bi urteko GGD tratamenduaren ostean, hau da, hesteko atrofia desagertzean, bi geneen adierazpenak gutxituta jarraitzen du, alterazio iraunkorra dela igarritik. Nahiz eta asoziatutako aldaerak ez dirudi azpiadierazpenean zuzeneko efekturik duenik, gure emeaitzek eskualdea EZrekin genetikoki inplikaturik dagoela eta funtzionalki aldatuta dagoela iradokitzen dute eta beraz, karakterizazio zehatzago bat egitea interesgarria izango litzateke.

Asoziatutako eremuaren funtzio biologikoa ikertzeko, gaixotasuneko heste baldintzak *in vitro* erreplikatu genituen horretarako eredu sinple bat eratuz. Epitelioko zelula lerroetan *MAGI2* genea isilarazi eta zelulak PT-Gz kitzikatu genituen. *MAGI2* isilarazteak LHetako gene batzuen adierazpena aldatu zuen, LHen bidezidorraren funtzionamendu egokirako beharrezkoa dela iradokituz. Gainera, gliadinaren kitzikapenak *MAGI2*ren isilarazpenak eragindako aldaketak areagotu zituen. Orain arte esandakoa berretsiz, gliadinak LHen adierazpena aldatuta dagoenean eragin handiagoa du, eta egitura huen suntsiketa gertaera goiztiarra dela oarntzen badugu, baliteke *MAGI2* genea

arrisku genetikoan inplikatur egotea, honen azpiadierazpen iraunkorrak gliadinaren efektua emendatuz.

Lehen azaldu bezala, epitelioko polaritatearekin erlazionaturako bi geneen asoziazioak, Par-3 eta Magi2, zelularen polaritateak zeliakiaren heste-hesiaren suntsiketari paper nagusi bat izan dezakeela pentsarazten dugu. Baliteke, epitelioko zelulak ez egotea ondo polarizatur eta ondorioz, LHen eraketan nolabait eragina izatea, iragazkortasun emendia eraginez [107]. Hau guztiarekin batera, EZn azpiadierazpen iraunkorra duten 3 gene aurkitu ditugu, GGD ostean normalizatzen ez direnak: 1) *INADL*, Patj proteinaren kodetzailea, CRB-PALS1-PATJ polaritate-komplexuaren partaide dena, 2) *PPP2R3A*, ziklo zelularreko erregulatzaile negatiboa den konplexuko osagai bat kodetzen duena eta *TJP1*, ZO-1 proteinaren kodetzailea, LHetan zitoeskeletoa eta mintz-domeinuaren arteko lotura egiten duen lokailu nagusia.

Gene hauek bidezidorrean duten funtzio zentrala kontutan izanik, adierazpen aldaketa iraunkorrak bidezidorraren funtzioan inpaktu bortitza izan dezakeela pentsatzen dugu, EZn ematen den heste-hesiaren suntsiketari parte hartuz. Beraz, zelularen polaritateari inplikaturako mekanismoek benetan suntsiketari parte hartzen aztertu genuen. siRNA teknologia aldi baterako isilarazpenak sortzen dituenaz, azpiadierazpen zehatza eta iraunkorrak eratzeko CRISPR/Cas9 gene edizioaren teknologia erabili genuen. Teknika honek, editaturako zelula lerroetan epe luzeko ikerketak egitea ahalbidetzen du, fenotipoen azterketak baimenduz. LHak aztertzeko CRISPR/Cas9 bidezko ikerketa batzuk abian dira jada [131, 132]. Guk ere aurrerapen garrantzitsua egin dugu arlo honetarako, *INADL* eta *PPP2R3A* geneak ezabatuta dituzten HEK293FT zelula lerro mutanteak sortu baititugu eta erabilgarri baitaude analisi funtzionalak egiteko.

Eboluzioari kontserbakorra den Par3-Par6-aPKC eta PATJ-PALS-CRB polaritate konplexuak LHen eraketa eta migrazio zuzendua erregulatzen dute baina mekanismoa ez da ezagutzen. Egun, ez dakigu, polaritate proteina hauek nola hurbiltzen diren migratzen ari diren epitelioko zelulen hertze aurreratuara [133, 134]. Patj proteinak, LHen biogenesian eta epiteliokoaren polaritateari

funtzio zentrala du, alde apikaleko eta alboko osagaien arteko lotura eratzen baitu [135].

Proiektu honetan, zauri-sendatze entseguaren bidez Patj proteina zelulen migrazio zuzenduarentzako beharrezkoa dela ikusi dugu. Zauri-sendatze prozesuan, epitelio zelulen polaritate apiko-basala apurto egiten da eta polaritate proteinak birbanatu egiten dira [136]. Migrazio esperimentu batean, okludinak, kanpoko estimuluei erantzunez, aPKC-Par3 eta Patj proteinak hertze aurreratuara eramaten zituela ikusi zuten. Gainera, okludina isilaraztean, aPKC-Par3 eta Patj ez ziren hertze aurreratuan biltzen, mikrotubuluaren desantolaketa eraginez eta migrazioa galeraziz [122]. Gure emaitzek, mekanismoa ezezaguna den arren, Patj zelulen migrazio egokirako ezinbestekoa dela iradokitzen digute. Ziurrenik, Patj proteinak aPKC eta Par3 proteinak hertzean bilduz erregulatzen du epitelio zelulen migrazioa, bere funtzioa ezinbestekoa izanik.

Gure esperimentuan, *INADL*-mutatutako HEK293FT zelulek proliferazio aktibidade handiagoa ere erakutsi zuten. Polaritate apiko-basalaren desorekak zelularen proliferazioan eragin akututa izan dezakeela pentsatu genuen. Alde batetik, jakina delako polaritatea eta zelularteko loturak estuki erlazionatuta daudela, polaritate galeraren bidez epitelio zelulen proliferazioa afektatzen duen mekanismoa askotan izan baita ezatabaidatua. Epitelioan zauriak bezelako kalteek proliferazio aktibitatea emendatzen duten bitartean zelularteko loturek proliferazioaren murrizketa erregulatzen dute [138, 139]. Bestalde, EZn, kriptetako enterozitoen proliferazioa heste-mukosako alterazio goiztiarra dela badakigu, glutenarekiko suszeptibleak diren indibiduoetan ematen dena [140]. Izan ere, zeliakoen heste-ehuna diferentziazio/proliferaio programaren inbertsioaz karakterizatzen da, diferentziazioaren murriztapenak bilosken atrofia eraginez eta proliferazioaren emendioak kripten hiperplasia eraginez [77, 144].

EZko biopsia duodenaleko mikroarrayen azterketa ezberdinek proliferazio eta diferentziazioan partaide diren geneak patogenesia inplikaturik daudela erakutsi dute, *PPP2R3A* genea barne [77, 144]. Datu hauen arabera, *INADL* eta *PPP2R3A* EZ garatzeko arrisku genetikoan inplikaturik egon daitezke,

nolabaot hestean ematen den proliferazio alterazioan edota diferentziazio galeran parte hartuz.

Ondorio orokor moduan, EZn, LHen bidezidorraren desantolaketa orokorrak heste-mukosaren iragazkortasun emendioa bermatzen du. Gure emaitzak aztertua, LHen suntsiketa patogenesiako gertaera goiztiar bat dela proposatzen dugu, sintomak garatu baino lehen gaixoen heste-mukosan aurkitzen dena. Gainera, gliadina peptidoek kaltetuta edo eratu gabe dagoen heste-hesian efektu toxikoa dutela baieztatu dugu, epitelio zelulen arteko iragazkortasuna emendatuz. Bestalde, gaixoek berezkoak diren alterazio genetikoak daukate, LHen bidezidorrarekin erlazionatuta daudenak eta ez direnak glutenak piztutako erantzun inflamatorioaren ondorio. Beraz, posible da gene hauek EZrekiko suszeptibilitatearekin inplikaturik egotea, arrisku genetikoan parte hartuz. Azkenik, modifikazio egonkorak dituzten epitelio zelulen lerro bat eratu dugu, adierazpen aldaketa iraunkorrak aztertzeko eta analisi funtzionalak egiteko eredu ona dena.



## **6. Ondorioak**





## ONDORIOAK

- I. Eritasun zeliakoan, lotura hertsietako geneetan adierazpen eta koadierazpen profilen haustura orokorra ematen da.
  - a. EZ aktiboan, heste-mukosan ikusitako adierazpen aldaketa gehienak gaixotasunaren ondorio dirudite, GGD ostean aldaketak normaltasunera itzultzen baitira. Hala ere, *INADL*, *PPP2R3A* eta *TJP1* geneen azpiadierazpen iraunkorrak jatorri genetikoaren duen oinarritzko gertaera iradokitzen du.
  - b. Heste-zelulen geruza bakarrak eredu erabilgarriak dira epiteliomiesiaren osotasunean gertaera goiztiarrak aztertzeko. Gliadinak lotura hertsien eraketa suntsitzeko gaitasuna duela ikusita, heste-miesiaren haustura gertaera goiztiarra dela iradoki daiteke, erantzun immunitarioaren aurretik jazotzen dena.
- II. LHekin erlazionatutako eskualde genomikoek EZrekin asoziatutako polimorfismoak dituzten arren, beraien karakterizazio funtzionala ez da argia, gene hautagaien adierazpenaren eta asoziatutako aldaeren arteko erlazio funtzionala konplexua dela nabarmenduz.
  - a. rs6969266 EZrekin asoziatuta dagoela berretsi dugu Espainiako populazio independente batean. Gainontzeko polimorfismoen asoziazioa ezin izan da errepikatu.
  - b. rs6969266 aldaeraren eskualdean kokatuta dauden *MAGI2* eta RP4-587D13.2 RNA ez-kodetzailerak luzea modu koordinatuan adierazten dira giza ehun anitzetan, heste-mukosa barne. Gaixoen heste-mukosako gene biren azpiadierazipenak patogenian inplikaturik daudela iradokitzen du. Hala ere, ez dirudi rs6969266ren genotipoak eragin zuzena duenik haien adierazpenean.

- III. EZrekin erlazionatuta dauden *INADL* eta *PPP2R3A* LHetako geneen delezio iraunkorra duten HEK293FT lerro zelula egonkorrak garatu ditugu. Gainera, lehenengo zelula lerroak, proliferazio emendatua eta migrazio gaitasun murriztua aurkezten dituela ikusi dugu, epitelio zeliakoan deskribatu denaren antzera. CRISPR-Cas9 mekanismoan oinarritutako teknologia lanabes eraginkorra da gaixotasun konplexuetan inplikaturako geneen ekarpen funtzionala zehaztasunez aztertzeko, eta gaixotasun horien fisiopatologia argitzeko baliagarria izango da.

## **7. Bibliografia**



## BIBLIOGRAFIA

1. Dowd, B. and J. Walker-Smith, *Samuel Gee, Aretaeus, and the coeliac affection*. Br Med J, 1974. **2**(5909): p. 45-7.
2. K, W.D.W., et al., *Coeliakie*. 1950, MD Thesis.
3. Feighery, C., *Fortnightly review: coeliac disease*. BMJ, 1999. **319**(7204): p. 236-9.
4. Mäki, M. and P. Collin, *Coeliac disease*. Lancet, 1997. **349**(9067): p. 1755-9.
5. Marsh, M.N., *Gluten, major histocompatibility complex, and the small intestine. A molecular and immunobiologic approach to the spectrum of gluten sensitivity ('celiac sprue')*. Gastroenterology, 1992. **102**(1): p. 330-54.
6. Stenman, S.M., et al., *Secretion of celiac disease autoantibodies after in vitro gliadin challenge is dependent on small-bowel mucosal transglutaminase 2-specific IgA deposits*. BMC Immunol, 2008. **9**: p. 6.
7. Mäki, M., *The humoral immune system in coeliac disease*. Baillieres Clin Gastroenterol, 1995. **9**(2): p. 231-49.
8. Husby, S., et al., *European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 2012. **54**(1): p. 136-60.
9. Catassi, C., *[The global village of celiac disease]*. Recenti Prog Med, 2001. **92**(7-8): p. 446-50.
10. Rostom, A., J.A. Murray, and M.F. Kagnoff, *American Gastroenterological Association (AGA) Institute technical review on the diagnosis and management of celiac disease*. Gastroenterology, 2006. **131**(6): p. 1981-2002.
11. Dubé, C., et al., *The prevalence of celiac disease in average-risk and at-risk Western European populations: a systematic review*. Gastroenterology, 2005. **128**(4 Suppl 1): p. S57-67.
12. Mustalahti, K., et al., *The prevalence of celiac disease in Europe: results of a centralized, international mass screening project*. Ann Med, 2010. **42**(8): p. 587-95.
13. Cataldo, F. and G. Montalto, *Celiac disease in the developing countries: a new and challenging public health problem*. World J Gastroenterol, 2007. **13**(15): p. 2153-9.
14. Murray, J.A., et al., *Trends in the identification and clinical features of celiac disease in a North American community, 1950-2001*. Clin Gastroenterol Hepatol, 2003. **1**(1): p. 19-27.
15. Dalgic, B., et al., *Prevalence of celiac disease in healthy Turkish school children*. Am J Gastroenterol, 2011. **106**(8): p. 1512-7.
16. Collin, P., et al., *High incidence and prevalence of adult coeliac disease. Augmented diagnostic approach*. Scand J Gastroenterol, 1997. **32**(11): p. 1129-33.
17. Bodé, S. and E. Gudmand-Høyer, *Incidence and prevalence of adult coeliac disease within a defined geographic area in Denmark*. Scand J Gastroenterol, 1996. **31**(7): p. 694-9.

18. Manzel, A., et al., *Role of "Western diet" in inflammatory autoimmune diseases*. *Curr Allergy Asthma Rep*, 2014. **14**(1): p. 404.
19. Ivarsson, A., et al., *Epidemic of coeliac disease in Swedish children*. *Acta Paediatr*, 2000. **89**(2): p. 165-71.
20. Plot, L. and H. Amital, *Infectious associations of Celiac disease*. *Autoimmun Rev*, 2009. **8**(4): p. 316-9.
21. Thomas, H.J., et al., *Contribution of histological, serological, and genetic factors to the clinical heterogeneity of adult-onset coeliac disease*. *Scand J Gastroenterol*, 2009. **44**(9): p. 1076-83.
22. Di Sabatino, A. and G.R. Corazza, *Coeliac disease*. *Lancet*, 2009. **373**(9673): p. 1480-93.
23. Murray, J.A., et al., *Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease*. *Am J Clin Nutr*, 2004. **79**(4): p. 669-73.
24. Lerner, A., *New therapeutic strategies for celiac disease*. *Autoimmun Rev*, 2010. **9**(3): p. 144-7.
25. Samasca, G., et al., *Gluten-free diet and quality of life in celiac disease*. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench*, 2014. **7**(3): p. 139-43.
26. Rubio-Tapia, A. and J.A. Murray, *Classification and management of refractory coeliac disease*. *Gut*, 2010. **59**(4): p. 547-57.
27. Freeman, H.J., *Non-dietary forms of treatment for adult celiac disease*. *World J Gastrointest Pharmacol Ther*, 2013. **4**(4): p. 108-12.
28. Goel, G., et al., *Epitope-specific immunotherapy targeting CD4-positive T cells in coeliac disease: two randomised, double-blind, placebo-controlled phase 1 studies*. *Lancet Gastroenterol Hepatol*, 2017. **2**(7): p. 479-493.
29. Sollid, L.M. and E. Thorsby, *HLA susceptibility genes in celiac disease: genetic mapping and role in pathogenesis*. *Gastroenterology*, 1993. **105**(3): p. 910-22.
30. Greco, L., et al., *The first large population based twin study of coeliac disease*. *Gut*, 2002. **50**(5): p. 624-8.
31. Gutierrez-Achury, J., et al., *Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease*. *Nat Genet*, 2015. **47**(6): p. 577-8.
32. Horton, R., et al., *Gene map of the extended human MHC*. *Nat Rev Genet*, 2004. **5**(12): p. 889-99.
33. Ludwig, H., et al., *[Association of HL-A1 and HL-A8 with childhood celiac disease]*. *Z Immunitatsforsch Exp Klin Immunol*, 1973. **146**(2): p. 158-67.
34. Sollid, L.M., et al., *Evidence for a primary association of celiac disease to a particular HLA-DQ alpha/beta heterodimer*. *J Exp Med*, 1989. **169**(1): p. 345-50.
35. Spurkland, A., et al., *HLA-DR and -DQ genotypes of celiac disease patients serologically typed to be non-DR3 or non-DR5/7*. *Hum Immunol*, 1992. **35**(3): p. 188-92.
36. Karell, K., et al., *HLA types in celiac disease patients not carrying the DQA1\*05-DQB1\*02 (DQ2) heterodimer: results from the European Genetics Cluster on Celiac Disease*. *Hum Immunol*, 2003. **64**(4): p. 469-77.

37. Abadie, V., et al., *Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis*. *Annu Rev Immunol*, 2011. **29**: p. 493-525.
38. van Belzen, M.J., et al., *Defining the contribution of the HLA region to cis DQ2-positive coeliac disease patients*. *Genes Immun*, 2004. **5**(3): p. 215-20.
39. Ploski, R., et al., *On the HLA-DQ(alpha 1\*0501, beta 1\*0201)-associated susceptibility in celiac disease: a possible gene dosage effect of DQB1\*0201*. *Tissue Antigens*, 1993. **41**(4): p. 173-7.
40. Lundin, K.E., et al., *Gliadin-specific, HLA-DQ(alpha 1\*0501, beta 1\*0201) restricted T cells isolated from the small intestinal mucosa of celiac disease patients*. *J Exp Med*, 1993. **178**(1): p. 187-96.
41. Sollid, L.M., *Coeliac disease: dissecting a complex inflammatory disorder*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(9): p. 647-55.
42. Gujral, N., H.J. Freeman, and A.B. Thomson, *Celiac disease: prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment*. *World J Gastroenterol*, 2012. **18**(42): p. 6036-59.
43. van Heel, D.A., et al., *A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21*. *Nat.Genet.*, 2007. **39**(7): p. 827-829.
44. Dubois, P.C., et al., *Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression*. *Nat.Genet.*, 2010. **42**(4): p. 295-302.
45. Trynka, G., et al., *Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease*. *Nat.Genet.*, 2011. **43**(12): p. 1193-1201.
46. Hunt, K.A., et al., *Negligible impact of rare autoimmune-locus coding-region variants on missing heritability*. *Nature*, 2013. **498**(7453): p. 232-5.
47. Wang, Z., M. Gerstein, and M. Snyder, *RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics*. *Nat Rev Genet*, 2009. **10**(1): p. 57-63.
48. Kumar, V., et al., *Human disease-associated genetic variation impacts large intergenic non-coding RNA expression*. *PLoS Genet*, 2013. **9**(1): p. e1003201.
49. Castellanos-Rubio, A., et al., *A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease*. *Science*, 2016. **352**(6281): p. 91-5.
50. Farh, K.K., et al., *Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants*. *Nature*, 2015. **518**(7539): p. 337-43.
51. Schuppan, D., Y. Junker, and D. Barisani, *Celiac disease: from pathogenesis to novel therapies*. *Gastroenterology*, 2009. **137**(6): p. 1912-33.
52. Maiuri, L., et al., *Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease*. *Lancet*, 2003. **362**(9377): p. 30-7.
53. Hue, S., et al., *A direct role for NKG2D/MICA interaction in villous atrophy during celiac disease*. *Immunity*, 2004. **21**(3): p. 367-77.
54. Castellanos-Rubio, A., et al., *Long-term and acute effects of gliadin on small intestine of patients on potentially pathogenic networks in celiac disease*. *Autoimmunity*, 2010. **43**(2): p. 131-139.

55. Jabri, B. and L.M. Sollid, *Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease*. Nat.Rev.Immunol., 2009. **9**(12): p. 858-870.
56. Arentz-Hansen, H., et al., *The intestinal T cell response to alpha-gliadin in adult celiac disease is focused on a single deamidated glutamine targeted by tissue transglutaminase*. J Exp Med, 2000. **191**(4): p. 603-12.
57. Folk, J.E. and P.W. Cole, *Transglutaminase: mechanistic features of the active site as determined by kinetic and inhibitor studies*. Biochim Biophys Acta, 1966. **122**(2): p. 244-64.
58. Folk, J.E. and S.I. Chung, *Transglutaminases*. Methods Enzymol, 1985. **113**: p. 358-75.
59. Ráki, M., et al., *Surface expression of transglutaminase 2 by dendritic cells and its potential role for uptake and presentation of gluten peptides to T cells*. Scand J Immunol, 2007. **65**(3): p. 213-20.
60. van de Wal, Y., et al., *Selective deamidation by tissue transglutaminase strongly enhances gliadin-specific T cell reactivity*. J Immunol, 1998. **161**(4): p. 1585-8.
61. Molberg, O., et al., *Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease*. Nat Med, 1998. **4**(6): p. 713-7.
62. Caputo, I., et al., *Tissue transglutaminase in celiac disease: role of autoantibodies*. Amino Acids, 2009. **36**(4): p. 693-9.
63. Lindfors, K., K. Kaukinen, and M. Mäki, *A role for anti-transglutaminase 2 autoantibodies in the pathogenesis of coeliac disease?* Amino Acids, 2009. **36**(4): p. 685-91.
64. Mazzarella, G., et al., *An immunodominant DQ8 restricted gliadin peptide activates small intestinal immune response in in vitro cultured mucosa from HLA-DQ8 positive but not HLA-DQ8 negative coeliac patients*. Gut, 2003. **52**(1): p. 57-62.
65. Lundin, K.E., et al., *T lymphocyte recognition of a celiac disease-associated cis- or trans-encoded HLA-DQ alpha/beta-heterodimer*. J Immunol, 1990. **145**(1): p. 136-9.
66. Nilsen, E.M., et al., *Gluten specific, HLA-DQ restricted T cells from coeliac mucosa produce cytokines with Th1 or Th0 profile dominated by interferon gamma*. Gut, 1995. **37**(6): p. 766-76.
67. Troncone, R., et al., *Majority of gliadin-specific T-cell clones from celiac small intestinal mucosa produce interferon-gamma and interleukin-4*. Dig Dis Sci, 1998. **43**(1): p. 156-61.
68. Monteleone, G., et al., *Role of interferon alpha in promoting T helper cell type 1 responses in the small intestine in coeliac disease*. Gut, 2001. **48**(3): p. 425-9.
69. León, A.J., et al., *Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients*. Clin Exp Immunol, 2006. **146**(3): p. 479-85.
70. Steinman, L., *A brief history of T(H)17, the first major revision in the T(H)1/T(H)2 hypothesis of T cell-mediated tissue damage*. Nat Med, 2007. **13**(2): p. 139-45.
71. Castellanos-Rubio, A., et al., *TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin*. Autoimmunity, 2009. **42**(1): p. 69-73.



72. Harris, K.M., A. Fasano, and D.L. Mann, *Monocytes differentiated with IL-15 support Th17 and Th1 responses to wheat gliadin: implications for celiac disease*. Clin Immunol, 2010. **135**(3): p. 430-9.
73. Monteleone, I., et al., *Characterization of IL-17A-producing cells in celiac disease mucosa*. J Immunol, 2010. **184**(4): p. 2211-8.
74. Sjöström, H., et al., *Identification of a gliadin T-cell epitope in coeliac disease: general importance of gliadin deamidation for intestinal T-cell recognition*. Scand J Immunol, 1998. **48**(2): p. 111-5.
75. Fina, D., et al., *Interleukin 21 contributes to the mucosal T helper cell type 1 response in coeliac disease*. Gut, 2008. **57**(7): p. 887-92.
76. Juuti-Uusitalo, K., et al., *cDNA microarray analysis of gene expression in coeliac disease jejunal biopsy samples*. J Autoimmun, 2004. **22**(3): p. 249-65.
77. Diosdado, B., et al., *A microarray screen for novel candidate genes in coeliac disease pathogenesis*. Gut, 2004. **53**(7): p. 944-51.
78. Kumar, V., et al., *Systematic annotation of celiac disease loci refines pathological pathways and suggests a genetic explanation for increased interferon-gamma levels*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(2): p. 397-409.
79. Parmar, A., et al., *Gene Expression Profiling of Gliadin Effects on Intestinal Epithelial Cells Suggests Novel Non-Enzymatic Functions of Pepsin and Trypsin*. PLoS One, 2013. **8**(6): p. e66307.
80. Gujral, N., J.W. Suh, and H.H. Sunwoo, *Effect of anti-gliadin IgY antibody on epithelial intestinal integrity and inflammatory response induced by gliadin*. BMC Immunol, 2015. **16**: p. 41.
81. Suzuki, T., *Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions*. Cell Mol Life Sci, 2013. **70**(4): p. 631-59.
82. Cereijido, M., L. Gonzalez-Mariscal, and G. Contreras, *Tight Junction: Barrier Between Higher Organisms and Environment*. Physiology. p. 72-75.
83. Turner, J.R., *Intestinal mucosal barrier function in health and disease*. Nat Rev Immunol, 2009. **9**(11): p. 799-809.
84. Zihni, C., et al., *Tight junctions: from simple barriers to multifunctional molecular gates*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2016. **17**(9): p. 564-80.
85. Furuse, M., et al., *Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions*. J Cell Biol, 1993. **123**(6 Pt 2): p. 1777-88.
86. Kotler, B.M., J.E. Kerstetter, and K.L. Insogna, *Claudins, dietary milk proteins, and intestinal barrier regulation*. Nutr Rev, 2013. **71**(1): p. 60-5.
87. Mineta, K., et al., *Predicted expansion of the claudin multigene family*. FEBS Lett, 2011. **585**(4): p. 606-12.
88. Krause, G., J. Protze, and J. Piontek, *Assembly and function of claudins: Structure-function relationships based on homology models and crystal structures*. Semin Cell Dev Biol, 2015. **42**: p. 3-12.
89. Ikenouchi, J., et al., *Tricellulin constitutes a novel barrier at tricellular contacts of epithelial cells*. J Cell Biol, 2005. **171**(6): p. 939-45.
90. Martin-Padura, I., et al., *Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration*. J Cell Biol, 1998. **142**(1): p. 117-27.

91. Matter, K. and M.S. Balda, *Epithelial tight junctions, gene expression and nucleo-junctional interplay*. J Cell Sci, 2007. **120**(Pt 9): p. 1505-11.
92. Guillemot, L., et al., *The cytoplasmic plaque of tight junctions: a scaffolding and signalling center*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1778**(3): p. 601-13.
93. Fanning, A.S. and J.M. Anderson, *Zonula occludens-1 and -2 are cytosolic scaffolds that regulate the assembly of cellular junctions*. Ann N Y Acad Sci, 2009. **1165**: p. 113-20.
94. McCaffrey, L.M. and I.G. Macara, *Signaling pathways in cell polarity*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(6).
95. Matter, K. and M.S. Balda, *Signalling to and from tight junctions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(3): p. 225-36.
96. Hollander, D., et al., *Increased intestinal permeability in patients with Crohn's disease and their relatives. A possible etiologic factor*. Ann Intern Med, 1986. **105**(6): p. 883-5.
97. Büning, C., et al., *Increased small intestinal permeability in ulcerative colitis: rather genetic than environmental and a risk factor for extensive disease?* Inflamm Bowel Dis, 2012. **18**(10): p. 1932-9.
98. Schulzke, J.D., et al., *Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue*. Pediatr Res, 1998. **43**(4 Pt 1): p. 435-41.
99. Edelblum, K.L. and J.R. Turner, *The tight junction in inflammatory disease: communication breakdown*. Curr Opin Pharmacol, 2009. **9**(6): p. 715-20.
100. Hollander, D., *Intestinal permeability, leaky gut, and intestinal disorders*. Curr Gastroenterol Rep, 1999. **1**(5): p. 410-6.
101. DeMeo, M.T., et al., *Intestinal permeation and gastrointestinal disease*. J Clin Gastroenterol, 2002. **34**(4): p. 385-96.
102. Balda, M.S., et al., *Functional dissociation of paracellular permeability and transepithelial electrical resistance and disruption of the apical-basolateral intramembrane diffusion barrier by expression of a mutant tight junction membrane protein*. J Cell Biol, 1996. **134**(4): p. 1031-49.
103. Schumann, M., et al., *Celiac Disease: Role of the Epithelial Barrier*. Cell Mol Gastroenterol Hepatol, 2017. **3**(2): p. 150-162.
104. Schumann, M., et al., *Cell polarity-determining proteins Par-3 and PP-1 are involved in epithelial tight junction defects in coeliac disease*. Gut, 2012. **61**(2): p. 220-8.
105. Szakál, D.N., et al., *Mucosal expression of claudins 2, 3 and 4 in proximal and distal part of duodenum in children with coeliac disease*. Virchows Arch, 2010. **456**(3): p. 245-50.
106. Montalto, M., et al., *Immunohistochemical analysis of ZO-1 in the duodenal mucosa of patients with untreated and treated celiac disease*. Digestion, 2002. **65**(4): p. 227-33.
107. Wapenaar, M.C., et al., *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. **57**(4): p. 463-7.
108. Sturgeon, C. and A. Fasano, *Zonulin, a regulator of epithelial and endothelial barrier functions, and its involvement in chronic inflammatory diseases*. Tissue Barriers, 2016. **4**(4): p. e1251384.

109. Khaleghi, S., et al., *The potential utility of tight junction regulation in celiac disease: focus on larazotide acetate*. Therap Adv Gastroenterol, 2016. **9**(1): p. 37-49.
110. Groschwitz, K.R. and S.P. Hogan, *Intestinal barrier function: molecular regulation and disease pathogenesis*. J Allergy Clin Immunol, 2009. **124**(1): p. 3-20; quiz 21-2.
111. Hall, E.J. and R.M. Batt, *Abnormal permeability precedes the development of a gluten sensitive enteropathy in Irish setter dogs*. Gut, 1991. **32**(7): p. 749-53.
112. Vogelsang, H., et al., *Screening for celiac disease in first-degree relatives of patients with celiac disease by lactulose/mannitol test*. Am J Gastroenterol, 1995. **90**(10): p. 1838-42.
113. Tsukita, S., M. Furuse, and M. Itoh, *Multifunctional strands in tight junctions*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(4): p. 285-93.
114. Martin-Pagola, A., et al., *MICA response to gliadin in intestinal mucosa from celiac patients*. Immunogenetics, 2004. **56**(8): p. 549-554.
115. Purcell, S., et al., *PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses*. Am J Hum Genet, 2007. **81**(3): p. 559-75.
116. Dye, J.F., et al., *Cyclic AMP and acidic fibroblast growth factor have opposing effects on tight and adherens junctions in microvascular endothelial cells in vitro*. Microvasc Res, 2001. **62**(2): p. 94-113.
117. Laukoetter, M.G., P. Nava, and A. Nusrat, *Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(3): p. 401-7.
118. McCarthy, K.M., et al., *Inducible expression of claudin-1-myc but not occludin-VSV-G results in aberrant tight junction strand formation in MDCK cells*. J Cell Sci, 2000. **113 Pt 19**: p. 3387-98.
119. Itoh, M., et al., *Direct binding of three tight junction-associated MAGUKs, ZO-1, ZO-2, and ZO-3, with the COOH termini of claudins*. J Cell Biol, 1999. **147**(6): p. 1351-63.
120. Furuse, M., et al., *Direct association of occludin with ZO-1 and its possible involvement in the localization of occludin at tight junctions*. J Cell Biol, 1994. **127**(6 Pt 1): p. 1617-26.
121. Mitic, L.L., C.M. Van Itallie, and J.M. Anderson, *Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2000. **279**(2): p. G250-4.
122. Du, D., et al., *The tight junction protein, occludin, regulates the directional migration of epithelial cells*. Dev Cell, 2010. **18**(1): p. 52-63.
123. Thomas, K.E., et al., *Gliadin stimulation of murine macrophage inflammatory gene expression and intestinal permeability are MyD88-dependent: role of the innate immune response in Celiac disease*. J Immunol, 2006. **176**(4): p. 2512-21.
124. Fasano, A. and T. Shea-Donohue, *Mechanisms of disease: the role of intestinal barrier function in the pathogenesis of gastrointestinal autoimmune diseases*. Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol, 2005. **2**(9): p. 416-22.

125. Rauhavirta, T., et al., *Impaired epithelial integrity in the duodenal mucosa in early stages of celiac disease*. Transl Res, 2014. **164**(3): p. 223-31.
126. Amundsen, S.S., et al., *Association analysis of MYO9B gene polymorphisms with celiac disease in a Swedish/Norwegian cohort*. Hum Immunol, 2006. **67**(4-5): p. 341-5.
127. Chen, Y.Q., et al., *Lack of Association between MYO9B Gene Polymorphisms and Susceptibility to Coeliac Disease in Caucasians: Evidence from a Meta-Analysis*. Immunol Invest, 2016. **45**(5): p. 396-405.
128. Qu, Z. and D.L. Adelson, *Evolutionary conservation and functional roles of ncRNA*. Front Genet, 2012. **3**: p. 205.
129. Guttman, M., et al., *Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals*. Nature, 2009. **458**(7235): p. 223-7.
130. Bjarnason, I. and T.J. Peters, *In vitro determination of small intestinal permeability: demonstration of a persistent defect in patients with coeliac disease*. Gut, 1984. **25**(2): p. 145-50.
131. Hopcraft, S.E. and M.J. Evans, *Selection of a hepatitis C virus with altered entry factor requirements reveals a genetic interaction between the E1 glycoprotein and claudins*. Hepatology, 2015. **62**(4): p. 1059-69.
132. Van Itallie, C.M., et al., *A complex of ZO-1 and the BAR-domain protein TOCA-1 regulates actin assembly at the tight junction*. Mol Biol Cell, 2015. **26**(15): p. 2769-87.
133. Goldstein, B. and I.G. Macara, *The PAR proteins: fundamental players in animal cell polarization*. Dev Cell, 2007. **13**(5): p. 609-22.
134. Shin, K., V.C. Fogg, and B. Margolis, *Tight junctions and cell polarity*. Annu Rev Cell Dev Biol, 2006. **22**: p. 207-35.
135. Shin, K., S. Straight, and B. Margolis, *PATJ regulates tight junction formation and polarity in mammalian epithelial cells*. J Cell Biol, 2005. **168**(5): p. 705-11.
136. Ridley, A.J., et al., *Cell migration: integrating signals from front to back*. Science, 2003. **302**(5651): p. 1704-9.
137. Roh, M.H., et al., *The carboxyl terminus of zona occludens-3 binds and recruits a mammalian homologue of discs lost to tight junctions*. J Biol Chem, 2002. **277**(30): p. 27501-9.
138. Bryant, P.J. and P. Simpson, *Intrinsic and extrinsic control of growth in developing organs*. Q Rev Biol, 1984. **59**(4): p. 387-415.
139. Johnston, L.A. and P. Gallant, *Control of growth and organ size in Drosophila*. Bioessays, 2002. **24**(1): p. 54-64.
140. Marsh, M.N., *Clinical and pathological spectrum of coeliac disease*. Gut, 1993. **34**(12): p. 1740; author reply 1741.
141. Juuti-Uusitalo, K., et al., *Gluten affects epithelial differentiation-associated genes in small intestinal mucosa of coeliac patients*. Clin Exp Immunol, 2007. **150**(2): p. 294-305.

## **8. Eranskinak**



E1 Taula. Ikerketan sartutako EZdun gaixoen ezaugarri kliniko, immunologiko eta HLARI buruzko informazioa. E: emakumea; G: Gizona; Dx: Diagnosian.

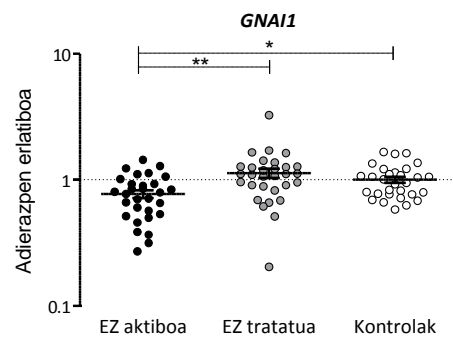
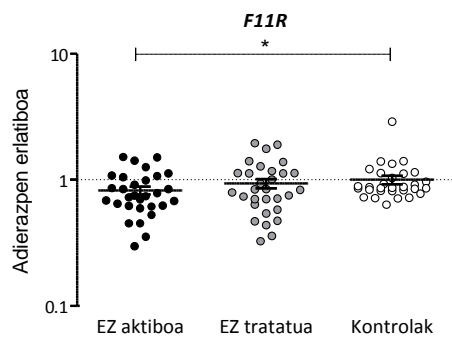
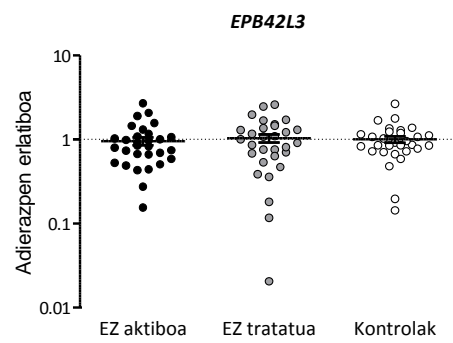
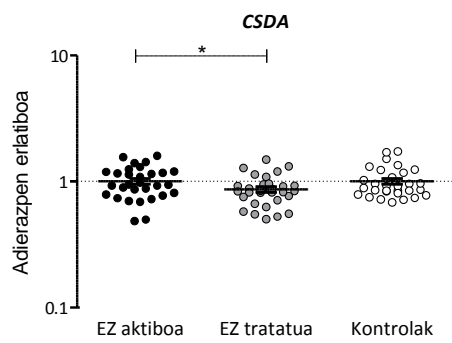
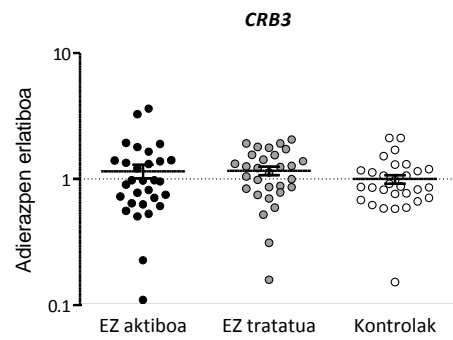
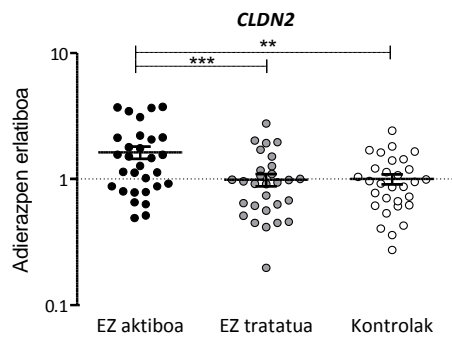
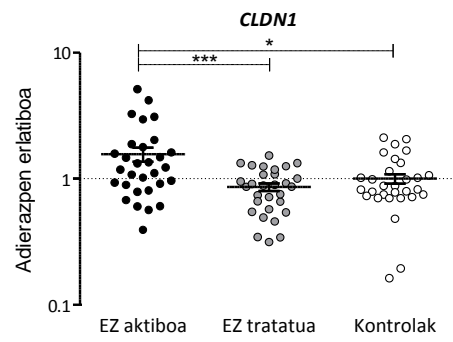
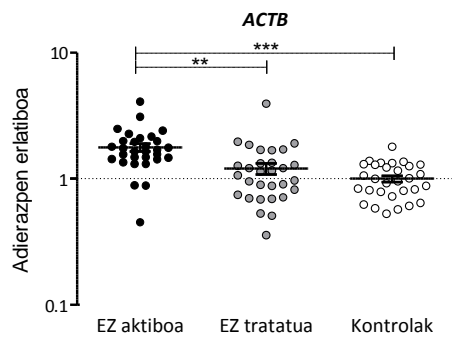
	Generoa	Adina DX (hilabete)	tTG Dx	Marsh Dx	DR	HLA
1	E	11	62	3c	DR3/DRX	DQ2
2	E	96	110	3c	DR3/DR7	DQ2
3	E	18	37	3a/b	DR3/DRX	DQ2
4	G	13	131	3c	DR3/DR7	DQ2
5	E	12	104	3a/b	DR3/DR3	DQ2
6	E	12	106	3b	DR3/DRX	DQ2
7	E	41	76	3c	DR3/DR4	DQ2/DQ8
8	E	15	116	3c	DR3/DR7	DQ2
9	G	22	113	3c	DR3/DR7	DQ2
10	E	9	122	3c	DR3/DR7	DQ2
11	E	20	127	3c	DR4/DR7	DQ2/DQ8
12	G	8	125	3c	DR3/DR4	DQ2/DQ8
13	G	0	105	3c	DR3/DRX	DQ2
14	E	22	103	3b/c	DR5/DR7	DQ2
15	E	6	113	3c	DR3/DR4	DQ2/DQ8
16	G	6	84	3c	DR3/DR7	DQ2
17	E	17	113	3c	DR4/DR5	DQ8
18	E	20	49	3c	DR3/DRX	DQ2
19	E	16	103	3c	DR3/DRX	DQ2
20	G	24	77	3c	DR3/DR3	DQ2
21	G	26	109	3c	DR3/DR7	DQ2
22	E	30	49	3a/b	DR5/DR7	DQ2
23	G	12	108	3c	DR3/DR3	DQ2
24	G	19	100	3c	DR3/DRX	DQ2
25	G	34	278	3c	DR3/DR7	DQ2
26	E	96	102	3c	DR3/DR4	DQ2/DQ8
27	E	20	501	3c	DR3/DR4	DQ2/DQ8

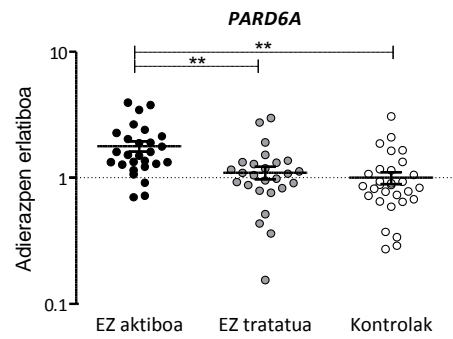
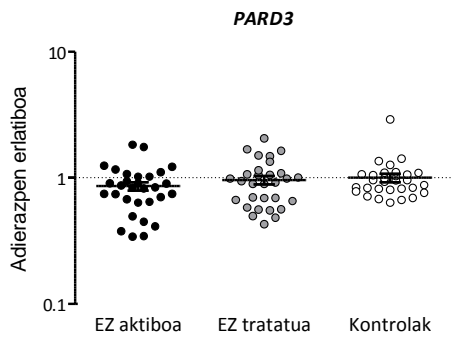
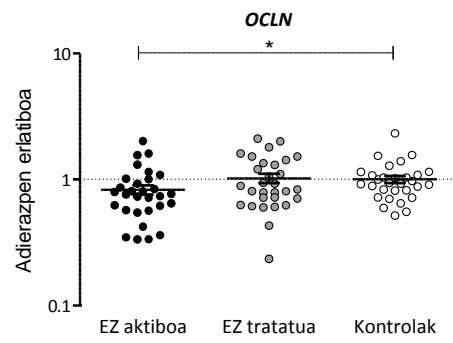
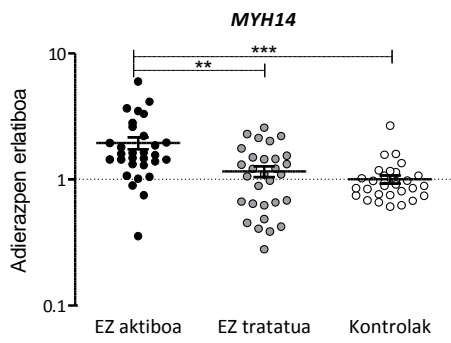
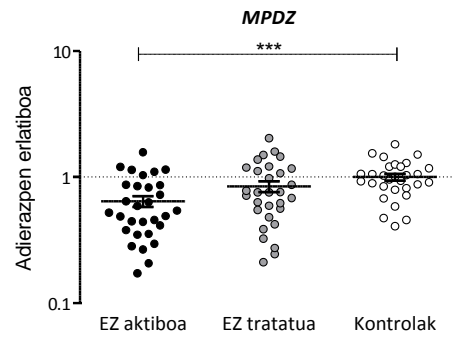
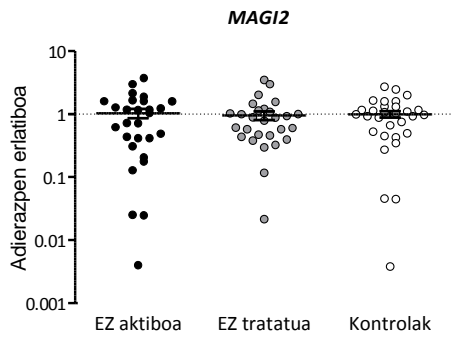
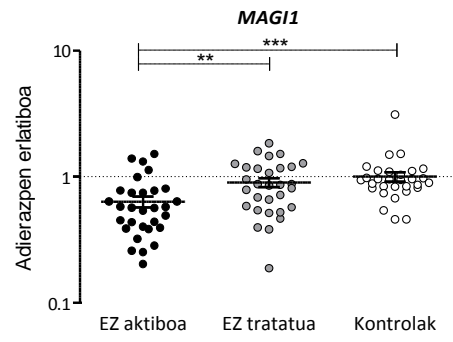
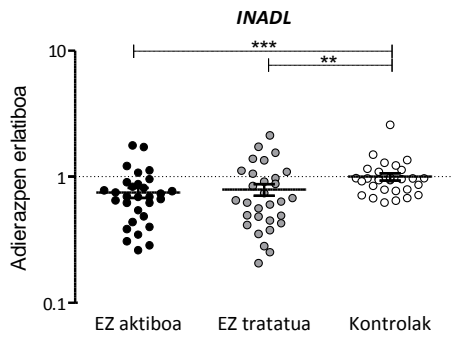
## E2 taula. TaqMan entseguen buruzko informazioa

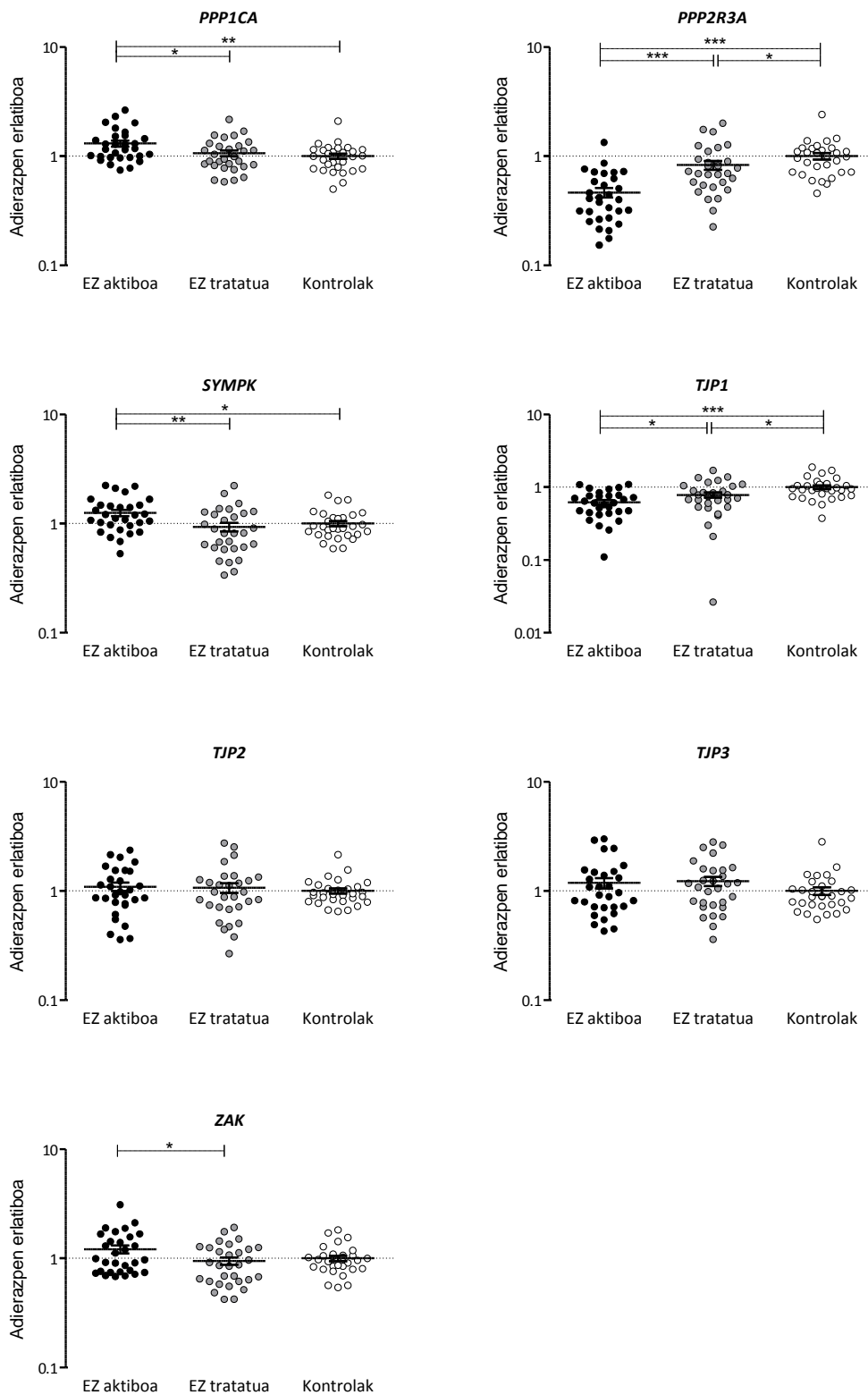
	Genea	Entsegu kodea	Kodetzen duen proteina	Protein familia	
1	<i>CLDN1</i>	Hs00221623_m1	Claudin 1	<b>Mintz-proteinak</b>	<b>LH</b>
2	<i>CLDN2</i>	Hs00252666_s1	Claudin 2		
3	<i>CRB3</i>	Hs01548179_m1	Crumbs homolog 3 ( <i>Drosophila</i> )		
4	<i>FIIR</i>	Hs00170991_m1	Junctional adhesion molecule 1 (JAM-1)		
5	<i>OCLN</i>	Hs00170162_m1	Occludin		
6	<i>INADL</i>	Hs00195106_m1	Pals1-Associated Tight Junction Protein (PATJ)	<b>Proteina adaptatzaileak</b>	
7	<i>MAG1</i>	Hs00191026_m1	Membrane associated guanylate kinase 1		
8	<i>MAG2</i>	Hs00202321_m1 Hs01111613_m1	Membrane associated guanylate kinase 2		
9	<i>MPDZ</i>	Hs01075090_m1	Multiple PDZ domain protein (MUPP1)		
10	<i>PARD3</i>	Hs00969077_m1	Partitioning defective 3 homolog ( <i>C. elegans</i> )		
11	<i>PARD6A</i>	Hs00180947_m1	Partitioning defective 6 homolog $\alpha$ ( <i>C. elegans</i> )		
12	<i>TJP1</i>	Hs01551861_m1	Zonula occludens 1 (ZO-1)		
13	<i>TJP2</i>	Hs00910543_m1	Zonula occludens 2 (ZO-2)		
14	<i>TJP3</i>	Hs00274276_m1	Zonula occludens 3 (ZO-3)		
15	<i>CSDA</i>	Hs01124964_m1	ZO-1-Associated Nucleic Acid-Binding (ZONAB)	<b>Proteina erregulatzaileak</b>	
16	<i>EPB4IL3</i>	Hs00202360_m1	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3		
17	<i>GNAI1</i>	Hs01053353_m1	G protein, alpha inhibiting activity polypeptide 1		
18	<i>PPP1CA</i>	Hs00267568_m1	Protein phosphatase 1, catalytic subunit, $\alpha$		
19	<i>PPP2R3A</i>	Hs01097014_m1	Protein phosphatase 2, regulatory subunit B, $\alpha$		
20	<i>SYMPK</i>	Hs00191361_m1	Symplekin		
21	<i>ZAK</i>	Hs00370447_m1	Sterile $\alpha$ motif & leucine zipper containing kinase		
22	<i>ACTB</i>	Hs01060665_g1	Actin, beta	<b>Zitoeskeletoko osagaiak</b>	
23	<i>MYH14</i>	Hs00226855_m1	Myosin, heavy chain 14, non-muscle		
24	<i>MYO9B</i>	Hs00188109_m1	Myosin IXB		
25	<i>MYD88</i>	Hs01573837-g1	Myeloid Differentiation Primary Response 88	<b>TLR</b>	
26	<i>TICAM1</i>	Hs00706140-s1	Toll Like Receptor Adaptor Molecule 1		
27	<i>TICAM2</i>	Hs04189225_m1	Toll Like Receptor Adaptor Molecule 2		
28	<i>TIRAP</i>	Hs00364644_m1	TIR Domain Containing Adaptor Protein		
29	<i>TOLLIP</i>	Hs01553188_m1	Toll Interacting Protein		
30	<i>IRAK1</i>	Hs00155570_m1	Interleukin 1 Receptor Associated Kinase 1		
31	<i>IRF5</i>	Hs00158114_m1	Interferon Regulatory Factor 5		
32	<i>IRF7</i>	Hs01014809-g1	Interferon Regulatory Factor 7		



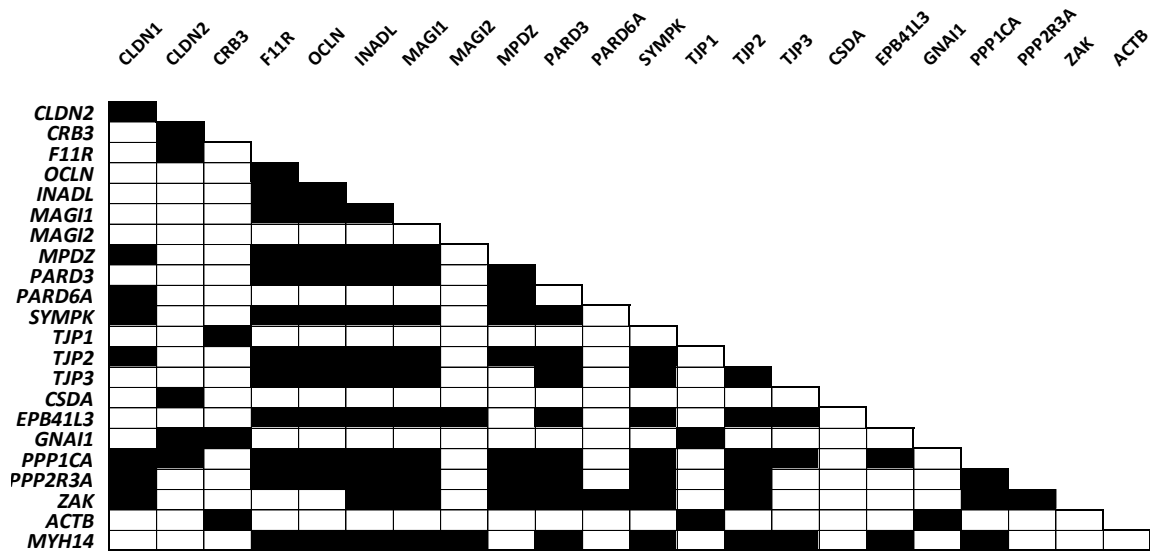
33	<b>TRAF6</b>	Hs00371512-g1	TNF Receptor Associated Factor 6	
34	<b>MAP3K7</b>	Hs00177373_m1	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase 7	
35	<b>AKT1</b>	Hs00178289_m1	AKT Serine/Threonine Kinase 1	
36	<b>RAC1</b>	Hs01902432-s1	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 1	
37	<b>RAC2</b>	Hs01032884_m1	Ras-Related C3 Botulinum Toxin Substrate 2	
38	<b>MALT1</b>	Hs01120052_m1	MALT1 Paracaspase	
39	<b>NFKB1</b>	Hs00765730_m1	Nuclear Factor Kappa B Subunit 1	NF-kappaB
40	<b>REL</b>	Hs00968436_m1	REL Proto-Oncogene, NF-KB Subunit	Seinalizazioa
41	<b>STAT3</b>	Hs01047580_m1	Signal Transducer And Activator Of Transcription 3	
42	<b>CCL5</b>	Hs00982282_m1	C-C Motif Chemokine Ligand 5	
43	<b>CXCL1</b>	Hs00605382-gh	C-X-C Motif Chemokine Ligand 1	
44	<b>CXCL10</b>	Hs00171042_m1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 10	
45	<b>CXCL11</b>	Hs04187682-g1	C-X-C Motif Chemokine Ligand 11	
46	<b>IFNA1</b>	Hs04189288-g1	Interferon Alpha 1	Erantzun
47	<b>IFNB1</b>	Hs01077958-s1	Interferon Beta 1	inflammatorioa
48	<b>IL1B</b>	Hs00174097_m1	Interleukin 1 Beta	
49	<b>IL6</b>	Hs00174131_m1	Interleukin 6	
50	<b>IL15</b>	Hs01003716_m1	Interleukin 15	
51	<b>TNF</b>	Hs00174128_m1	Tumor Necrosis Factor	
52	<b>RPLP0</b>	4333761F	Ribosomal Protein Lateral Stalk Subunit P0	Kontrol endogenoa



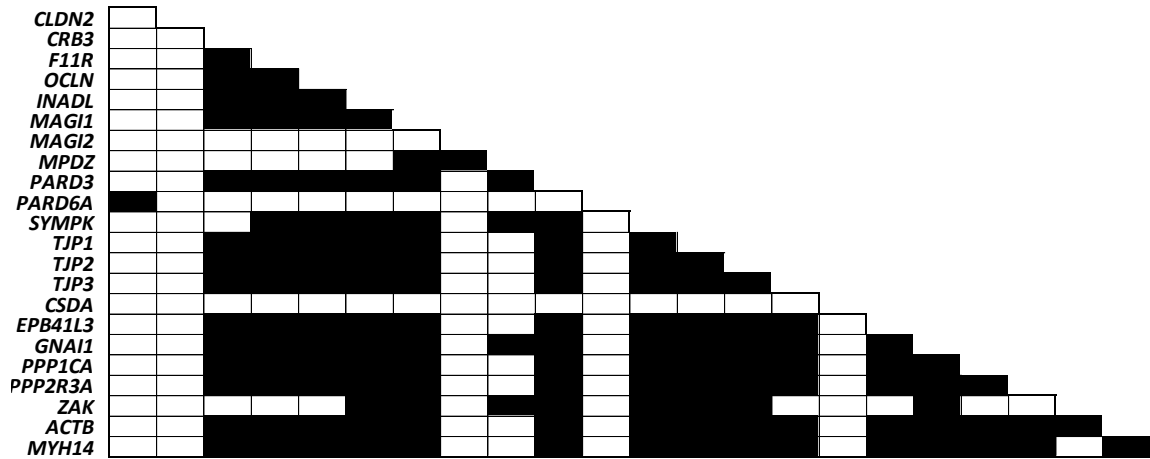




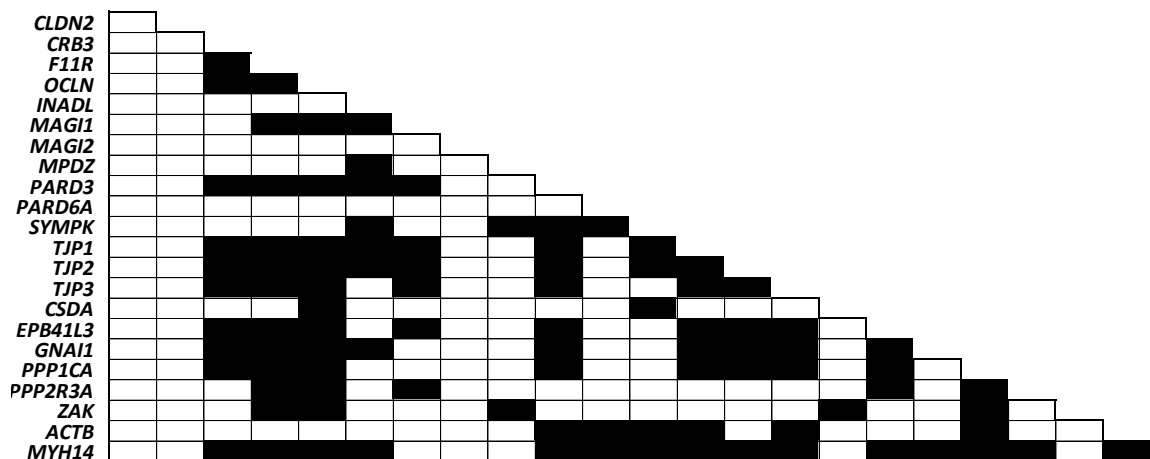
E1 irudia. LHetako gene hautagaien adierazpen erlatiboa EZ aktibo, EZ tratatu eta Kontrol taldeetan. Adierazpenak kontrolen balioen batz bestearerikiko erlatibizatu dira. Irudiak batz bestekoa eta batzbestekoaren errore tipikoa aurkezten ditu (n=30). Taldeen arteko ezberdintasunak asterizko batez adierazi dira (\* p-balioa 0,01 < 0,05; \*\* p-balioa 0,001 < 0,01).



## EZ AKTIBOA



## EZ TRATATUA



## KONTROLAK

E2 irudia. Gene hautagaien korrelazio matrizea. EZ aktibo, EZ tratatu eta Kontrol taldeen arteko geneen koadierazpen ereduak aurkezten dira. Lauki beltzek, dagokien bi geneen arteko korrelazioa irudikatzen dute (Spearman proba,  $p$ -balioa  $<0,05$ ).

