



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

ZIENTZIA  
ETA TEKNOLOGIA  
FAKULTATEA  
FACULTAD  
DE CIENCIA  
Y TECNOLOGÍA



Gradu Amaierako Lana  
Bioteknologiako Gradua

# **BACH2 IncRNA-ren karakterizazio molekularra pankreako $\beta$ zelulen suntsipenean**

Gradu Amaierako Lanaren Txostena

Egilea:

Leire Fernández Veiga

Zuzendaria:

Izortze Santin Gomez

Kurtso akademikoa:

2018/2019

Leioan, 2019ko ekainaren 21ean



**AURKIBIDEA**

<b>1. LABURPENA</b> .....	1
<b>2. SARRERA</b> .....	1-5
<b>3. HELBURUAK</b> .....	5
<b>4. MATERIALAK ETA METODOAK</b> .....	6-10
<b>5. EMAITZAK</b> .....	10-14
<b>6. EZTABAIDA</b> .....	14-17
<b>7. ONDORIOAK</b> .....	17
<b>8. ESKERRAK</b> .....	17-18
<b>9. BIBLIOGRAFIA</b> .....	18-20
<b>10. 1.ANEXOAK</b> .....	21

## 1. LABURPENA

I motako diabetesa gaixotasun autoimmune bat da, zeinean immunitate-sistemak espezifikoki pankreako  $\beta$  zelulen suntsipena eragiten duen. Asoziazio-ikerketek I motako diabetesarekin asoziatutako polimorfismo ugari identifikatu dituzte, horietako askok RNA ez kodetzaile luzeetan kokatuta daudelarik.

Gradu amaierako lan honen helburu nagusia I motako diabetesarekin asoziatuta dagoen polimorfismo bat duen *BACH2* RNA luze ez-kodetzailearen (*lncBACH2*) karakterizazio molekularra egitea izan da, horretarako pankreako giza  $\beta$  zeluletan isilarazpen genikoan oinarritutako ikerketa funtzionalak gauzatu direlarik.

Lan honen emaitzek *lncBACH2* zitokinek eragindako pankreako  $\beta$  zelulen apoptosis inplikaturik dagoela frogatu dute. Badirudi *lncBACH2* *BACH2* gene hautagai kodetzailearen adierazpenaren kontrolean inplikaturik dagoela eta erlazio horrek *lncBACH2* geneak apoptosis duen eragina azaldu dezakeela.

## 2. SARRERA

I motako diabetesa (T1D; *type 1 diabetes*) intsulina ekoizten duten pankreako  $\beta$  zelulen suntsipen autoimmunen ondorioz sortzen den gaixotasuna da (Atkinson, 2001; Bluestone et al., 2010).  $\beta$  zelulen suntsipena dela eta, insulinen ekoizpena murrizten da eta, ondorioz, hipergluzemia (glukosaren igoera odolean) garatzen da. Hipergluzemiarekin batera hiru dira agertzen diren sintoma kliniko ohikoenak: gerneraren gehiegizko isurketa, egarriaren emendioa eta gosearen handipena. Gaixotasunaren agerpena haur eta nerabeetan agertzen da normalean eta, gaitz kronikoa izanik, gaixoak bizitza osoan zehar intsulina-tratamendua jasotzera behartuta daude.

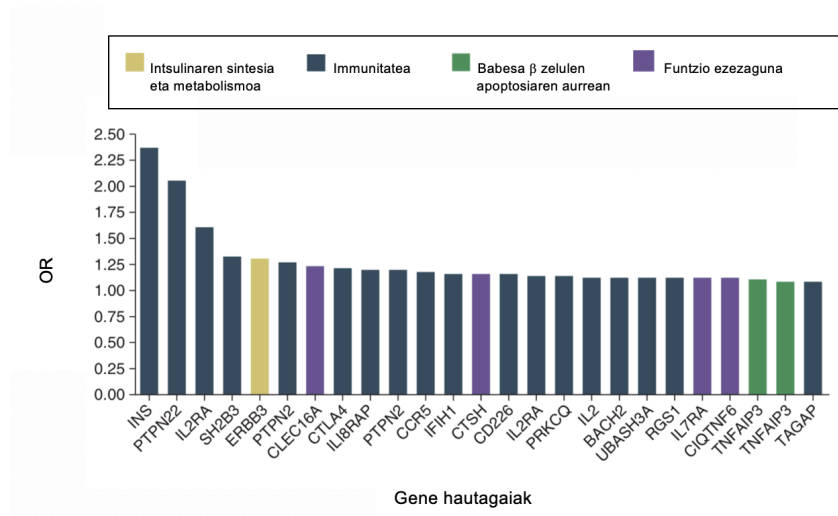
Faktore genetikoek I motako diabetesaren garapenean eragina badute ere, gaixotasun hau ez dago atxikita herentzia eredu mendelarrarekin, eta gaixotasun konplexu eta

poligenikoa kontsideratuta dago (Noble and Erlich, 2012). Familia agregazio ikerketek eta bikietan egindako azterketek erakutsi dute faktore genetikoek eta ingurune-faktoreek I motako diabetesaren garapenean eragiten dutela.

I motako diabetesaren garapenean eragina eduki dezaketen ingurune-faktoreen artean, gehien ikertu dena infekzio birikoak dira. Zenbait ikerketa epidemiologiko eta klinikoez egiaztatuta dute birus batzuek autoimmunitatea eragin dezaketela. Suszeptibilitate genetikoa duten pertsonetan birus jakinek  $\beta$  zelulak infektatzen dituztenean, zelulen inflamazioa eta apoptosiarekin erlazionatutako bidezidorrak aktiba ditzakete, I motako diabetesaren patogenesiarekin erabat erlazionatuta dauden bidezidorrak direlarik. I motako diabetesarekin asoziatu diren birusen artean, *Coxsackievirus B (CVB)*, *Rotavirus* eta *Cytomegalovirus* birusak daude (Filippi eta von Herrath, 2008). Hainbat ikerlanek frogatu dute *Coxsackie* birusak I motako diabetesaren garapenean inplikaturik daudela, baina eragin horren mekanismo molekularrak zeintzuk diren aurkitzeke daude (Hyöty et al., 2014). Adibidez, ikerketa batzuek erakutsi dute *CVB* andui patogeniko desberdinekin inokulatu ziren arratoi prediabetikoek I motako diabetesaren garapen azeleratua jasan zutela, arratoi kontrolekin konparatuta (Drescher et al., 2004).

Birusen eraginaz gain, elikadurarekin lotutako faktoreak ere proposatu dira ingurune-faktore gisa. Adibidez, D bitamina eta bere metabolismoaren eritasunaren agerpena zein garapenarekin lotuta egon daitekeela ikusi da (Todd, 2010). Izan ere, D bitaminaren metabolismoan parte hartzen dituzten zenbait proteinen gene kodetzaileetan gaixotasunarekin asoziatuak polimorfismoak aurkitu dira. Beste adibide bat gluten duen dietaren ahorakina da. I motako diabetesa eta gaixotasun zeliakoa (glutenak aktibatzen duen heste-zelulen kontrako erantzun autoimmunea) maiz garatzen dira indibiduo berean, sentikortasuna ematen duten geneen banaketa dela eta. Antza denez, gluten gabeko dietaren bidez, I motako diabetesaren sintomak arintzen dira (Hogg-Kollars et al., 2014).

Ingurune-faktoreez gain, genetikak garrantzi handia du gaixotasunaren garapenean; izan ere, orain arte, gaixotasunaren garapenarekin asoziatuta dauden 50 lokus inguru deskribatu dira (Pociot et al., 2010). Giza antigeno leukozitarioaren lokusak (*HLA*, *Human Leukocyte Antigen*) gaixotasunaren herentziaren % 60a azaltzen duen bitartean, asoziatutako beste gene hautagaien ekarpena oso txikia da (Pociot et al., 2010). **1. irudian** I motako diabetesarekin asoziatutako gene hautagaiak eta gaixotasunaren arrisku genetikoan gene hauek duten ekarpena (OR; *odds ratio*) ikus daitezke.



**1. irudia. I motako diabetesarekin asoziatutako gene hautagaiak eta horien ekarpena gaixotasuna garatzeko arrisku genetikoan.** Y ardatzean gene hautagaiak gaixotasuna garatzeko ematen duten arrisku erlatiboa (OR; *odds ratio*). X ardatzean, I motako diabetesarekin asoziatutako gene hautagaien zerrenda. Gene bakoitzaren barra koloretzatuta agertzen da, gene horren funtzioa zein den adierazteko (Concannon et al., 2009).

Genomako asoziazio-ikerketei esker, gaixotasunaren patogenesian eragina izan dezaketen genomaren eskualde asko aurkitu dira eta eskualde horietan zenbait gene hautagai proposatu dira, proposatutako gene hautagai guztiak proteina kodetzaileak direlarik. Hala ere, gaur egun badakigu genomako asoziazio-ikerketen bidez aurkitu diren polimorfismoen gehiengo bat genomaren eskualde ez-kodetzaileetan daudela eta zehazki % 10 inguru RNA luze ez-kodetzaileetan (*lncRNA*; *long non-coding RNA*)

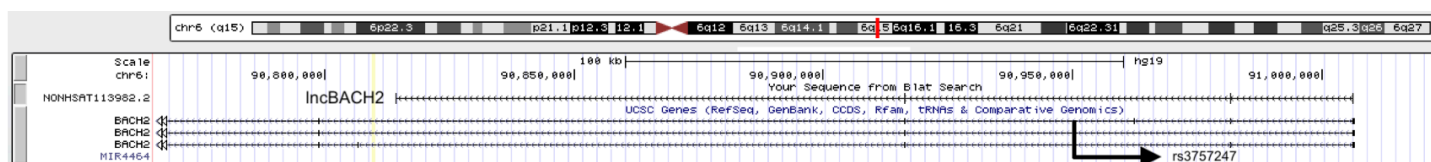
daudela. RNA luze ez-kodetzaileak proteinarik kodetzen ez duten 200 nukleotido edo gehiagoko RNA molekulak dira (Ponting et al., 2009). Azken urteetan, lncRNAk adierazpen genikoaren erregulatzailerik oso garrantzitsuenak direla ikusi da eta, zenbait ikerlanen arabera, prozesu biologiko ugarien erregulazioan parte hartzen dute, hala nola, lokalizazioan, garapenean, ziklo zelularrean, metabolismoan eta abar (Hung et al., 2011). lncRNA-ek *cis* zein *trans* posizioan dauden geneen erregulazioa kontrolatzen dute, zuzenean kromatina moldatzen duten proteinekin eta transkripzio faktoreekin elkarri eraginez, adibidez (Wang eta Chang, 2011).

Kontuan izanda gaixotasunekin asoziatuta dauden polimorfismo ugari lncRNA-etan kokatuta daudela, logikoa da pentsatzea lncRNA-en funtzioa giza gaixotasunen garapenarekin lotuta egon daitekeela. Izan ere, zenbait gaixotasunetan molekula horien adierazpen-profila aldatua dagoela ikusi da, besteak beste, hainbat gaixotasun autoimmuneetan, minbizian eta gaixotasun neurodegeneratiboetan (Wapinski eta Chang, 2011). Diabetesarekin erlazionatuta egon daitezkeen lncRNAei dagokionez, orain dela urte batzuk egindako ikerketa batean, giza pankreako Langerhans-en irlen eta  $\beta$  zelulen transkriptoma aztertu zen, eta 1128 lncRNA aurkitu ziren. Aurkitutako lncRNA horiek  $\beta$  zelulekiko espezifikoak ziren, eta ondorioz,  $\beta$  zelulen desberdintzapenean eta funtzioan inplikatuta egon daitezkeela uste da (Moran et al., 2012).

Asoziazio ikerketa ezberdinek BTB eta CNC homologia 1 (*BACH1*) genea I motako diabetesarekin eta beste gaixotasun autoimmunekin asoziatuta dagoela aurkitu dute (Grant et al., 2009). *BACH2* geneak transkripzio faktore bat kodetzen du. Transkripzio faktore horrek sistema-immunearen aktibazioan eragina du, zelula plasmatikoen desberdintzapenean, immunoglobulinen eraldaketan eta T zelula erregulatzaileen sorreran parte hartzen du, besteak beste (Roychoudhuri et al., 2013). Horretaz gain, pankreako  $\beta$  zeluletan zenbait funtzio betetzen dituela ikusi da (Marroqui et al., 2014). Izan ere, pankreako  $\beta$  zeluletan zitokina proinflamatorioek *BACH2* genearen adierazpena aldatzen dute. Gainera, *BACH2* genearen inhibizioak zitokinekin tratatutako  $\beta$  zelulen apoptosia areagotzen du, *BACH2* genea gainadierazten denean

aurkako efektuak ikusten diren aldetik. Aurkikuntza horiek erakusten dute *BACH2* gene hautagaiak zitokinek eragindako  $\beta$  zelulen apoptosiaren erregulazioan parte hartzen duela, prozesu hau I motako diabetesaren ezaugarri patogeniko garrantzitsua delarik (Marroqui et al., 2014).

Orain dela gutxi publikatutako lan batean *BACH2* genea kokatuta dagoen eskualde genomikoan lncRNA bat transkribatzen dela ikusi da (Mirza et al., 2014). lncRNA hori kodetzen duen genearen eta *BACH2* gene kodetzailearen sekuentzia partzialki gainjartzen dira eta bi geneek I motako diabetesarekin asoziatutako polimorfismoa partekatzen dute, rs3757247 polimorfismoa, hain zuzen ere, **2. irudian** adierazten den moduan. Efektu funtzionalen iragarpen programen arabera (Mirza et al., 2014), I motako diabetesarekin asoziatutako polimorfismo horrek lncRNA horren bigarren mailako egitura aldatzen du eta, ondorioz, horren funtzioan nolabaiteko eragina izatea posible da, I motako diabetesean garrantzitsuak izan daitezkeen bidezidorretan eragina eduki dezakeelarik.



**2. irudia. *BACH2* genearen kokapena genomian eta eskualde berean dagoen lncRNAren lokalizazioa.** Irudi honetan *BACH2* genea genomian non kokatuta dagoen adierazten da, baita eskualde genomiko berean transkribatzen den lncRNAren kokapena eta diabetesarekin asoziatuta dagoen SNParen kokapena ere (UCSC Genome Browser).

Hori aintzat hartuta, lan honen helburua *BACH2* gene kodetzailearekin gainjartzen den lncRNAren (hemendik aurrera, *lncBACH2* deituko duguna) karakterizazio funtzionala egitea da, I motako diabetesaren garapenean eduki dezakeen efektua argitzekeo.



### 3. HELBURUAK

Gradu amaierako lan honen helburu nagusia *lncBACH2*-ren karakterizazio molekularra egitea izan da, pankreako  $\beta$  zelulen disfuntzioan eduki dezakeen funtzioa argitzeko. Helburu nagusi hori lortzeko, honako helburu espezifikoak zehaztu dira:

1. *lncBACH2* eta *BACH2* geneen adierazpenaren arteko erlazioa ikertzea.
2. *lncBACH2*-ren efektu potentziala zehaztea pankreako  $\beta$  zelulen apoptosian.

### 4. MATERIALAK ETA METODOAK

#### 4.1. ZELULA KULTIBOA

Ikerketa aurrera eramateko, pankreako giza  $\beta$  zelulak erabili dira, EndoC- $\beta$ H1 pankreako  $\beta$  zelulen lerroa (Univercell Biosolutions), hain zuzen ere. Zelulak Matrigel-fibronektinarekin (100 mg/ml eta 2 mg/ml, hurrenez hurren; Sigma-Aldrich) estalitako plaketan kultibatu ziren, honako erreaktiboekin aberastutako DMEM medioa erabilia: 5.6 mmol/L glukosa, % 2 BSA (Sigma-Aldrich), 50  $\mu$ mol/L 2-merkaptoetanola (BIORAD), 10 mmol/L nikotinamida (Calbiochem), 5.5  $\mu$ g/ml transferrina, 6.7  $\mu$ g/ml selenito (Sigma-Aldrich), 100 unitate/ml penizilina eta 100  $\mu$ g/ml estreptomizina (Lonza).

#### 4.2. ZITOKINEN TRATAMENDUAK

Zitokinek intereseko lncRNAREN adierazpenean duten efektua aztertzeko, zelulak hantura sustatzen duten zitokinekin edo zitokina proinflamatorioekin (IL-1 $\beta$  eta IFN- $\gamma$ ) tratatu ziren denbora-tarte ezberdinetan. Horretarako, 24 putzuetako plaka batean 300 000 zelula zituzten 4 putzu prestatu ziren eta 8, 24 eta 48 orduz IL-1 $\beta$  (R&D

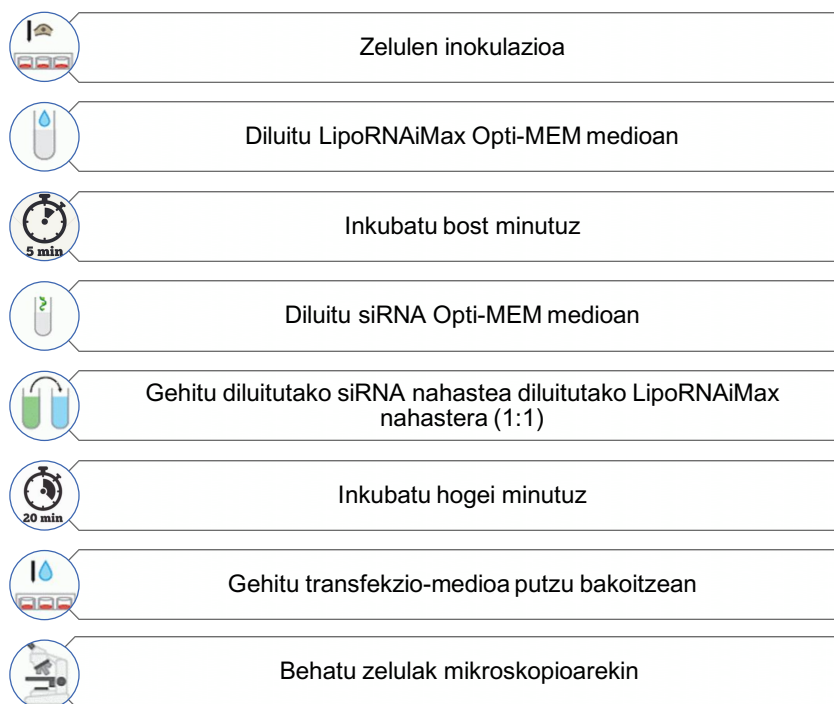
Systems) eta INF- $\gamma$ -rekin (PeproTech) tratatu genituen, 50 U/ $\mu$ l eta 1000 U/ $\mu$ l kontzentrazioetan, hurrenez hurren. Putzu batean zeuden zelulak ez ziren tratatu, kontrol gisa erabiltzeko (0h deitutakoa).

### 4.3. *lncBACH2*-REN ISILARAZPENA

Ikerketaren hurrengo urratsa *lncBACH2* isilaraztea izan zen. Horretarako, *lncBACH2*-rekiko espezifikokoak diren 2 RNA interferente txiki (siRNA; *small interfering RNA*) (Qiagen) erabili ziren (siLncBACH2#1 eta siLncBACH2#2). Isilarazpena bi baldintzen pean egin zen. Alde batetik, egoera basalean zeuden zeluletan (ez tratatutakoak) eta, bestetik, 4.2. atalean azaldu den bezala, zitokinekin tratatutako zeluletan. *lncBACH2* isilarazten zuten siRNAk erabiltzeaz gain, kontrol gisa  $\beta$  zeluletan adierazten diren geneen adierazpenean eragina ez duen siRNA kontrol bat (siKTRL) erabili zen. siRNA horien transfekzioa partikula lipidikoen (LipoRNAi Max, Thermo Scientific) bitartez egin zen, **3. irudian** laburbiltzen den honako prozedura jarraituz:

1. Partikula lipidikoen diluzioa: putzu bakoitzeko 1  $\mu$ l LipoRNAi Max 50  $\mu$ l Opti-MEM medioan (serum kontzentrazio baxuko medioa) jarri zen eta bost minutuz inkubatu zen ingurune-tenperaturan.
2. siRNA bakoitzaren diluzioa: putzu bakoitzeko 1  $\mu$ l siRNA (20  $\mu$ M) 50  $\mu$ l Opti-MEM medioan jarri zen (putzu bakoitzean siRNA bakoitzaren azken kontzentrazioa 30 nM izateko).
3. Transfekzio-nahastea egin: partikula lipidikoen diluzioa eta siRNAen diluzioaren nahasketa egin zen 1:1 bolumenean eta 20 minutu inkubatu zen ingurune-tenperaturan.

4. Putzu bakoitzeko 400  $\mu$ l transfekzio-medio gehitu zen.
5. Zelulen mediao transfekzio-nahastearen 500  $\mu$ l-rekin ordezkatu zen.



**3. irudia. *IncBACH2* isilarazpena egiteko metodologiaren laburpen eskematikoa.** *IncBACH2* isilarazteko siRNA espezifikoak erabili ziren eta horien transfekzioa partikula lipidikoak (Lipofectamine RNAi Max, Thermo Scientific) erabilita egin zen.

Zelulak transfekzio-nahastearekin 16 orduz inkubatu ostean, zelulak  $\beta$  zelulen medio arruntara pasatu ziren eta beste 24 orduz inkubatu ziren, zitokinen tratamendua hasi baino lehen. Zitokinen tratamendua 48 orduz mantendu zen, hurrengo esperimenduekin hasi baino lehen.

#### 4.4. RNA ERAUZKETA, ALDERANTZIZKO TRANSKRIPZIOA ETA PCR

## KUANTITATIBOA (Q-PCR)

Zelulak adierazitako denbora-tarteetan zitokinekin mantendu ostean, zelulak lisatu ziren RNA erauzteko helburuarekin. Horretarako, lehenik, medioa kendu eta zelulak PBS-rekin garbitu ziren. Bigarrenik, 350 µl RA1 deituriko lisirako tanpoia gehitu zen putzu bakoitzean, zelulak jaso eta -80 °C-tan gorde ziren RNA erauzketa burutu arte. Behin lagin guztiak izanda, RNA erauzteko kit-a erabili zen (NucleoSpin, RNA isolation kit, Macherey-Nagel) eta lortutako laginen RNA kontzentrazioak *Nanodrop* espektrofotometroaren bidez neurtu ziren. Lagin guztietako RNA kontzentrazioak jakinda, RNA kontzentrazio baxuena zuen lagina hartu zen erreferentzia moduan. Horrela, gainerako laginen RNA kontzentrazioak kontzentrazio jakin horretara doitu ziren ur esterilarekin diluituz. Horren ostean, RNA hori cDNARA eraldatu zen, erretrotranskriptasa (alderantzizko transkriptasa) entzima duen kit komertziala erabiliz (iScript cDNA Synthesis Kits, Bio-Rad).

Q-PCR teknikaren bidez cDNAREN anplifikazioa egin daiteke, gene konkretu baterako dagoen cDNA (adierazpen genikoa) modu oso zehatzean kuantifikatzeko. cDNAREN anplifikazioa seinale fluoreszente baten sorrerarekin erlazionatu daiteke, horrela, fluoreszentzia neurtuz, zikloz ziklo moldea zenbat aldiz kopiatzen den ikus daitekeelarik. Fluoroforo mota desberdinak daude, eta horien artean, erabilienetarikoa SYBR Green molekula tartekatzailea da. Gure laginetan gene ezberdinen adierazpena neurtzeko SYBR Green teknologia erabili genuen (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad), *Eco Illumina Real Time PCR* aparatua erabilia (Illumina). Teknika horren bitartez, *BACH2*, *lncBACH2* eta *HPRT* (kontrol endogeno gisa) geneen adierazpena neurtu zen, horretarako **1. anexoan** adierazten diren hasleak erabili zirelarik. Adierazpen emaitzak  $2^{-\Delta\Delta CT}$  metodoa erabilia aztertu ziren.

### 4.5. APOPTOSIAREN NEURKETA, KASPASA 3/7-REN AKTIBAZIOAREN DETERMINAZIOAREN BITARTEZ

Apoptosiaren neurketa egiteko, luminiszentziaren bidez kaspasa 3/7-ren aktibazioa

neurtzen duen kit komertzial bat erabili genuen (Caspase-Glo 3/7 Assay, Promega). Kontuan hartu behar da, zelulek kaspasa 3/7 entzimak dituztela, baina horiek egoera basalean inaktibo daudela. Zenbait estimuluek (zitokina proinflamatorioek, adibidez) entzimen aktibazioa eragiten dute, kaspasa 3/7 aktibatutako egoerara (*Cleaved Caspase 3/7*) aldatuz. Teknika honen oinarria kaspasa 3/7 entzima aktibatuaeren substratua fluoroforo bati lotuta dagoela da. Kaspasa 3/7 entzima aktibatuek substratua degradatzean, luminiszentzia askatzen da, eta luminiszentzia hori irakurgailu batean (DTX 880 Detector, Beckman Coulter) neur daiteke. Laburki, prozesu hau aurrera eramateko, zelulak PBS-arekin garbitu ostean, 150 µl PBS-an jaso ziren eta Kaspasa 3/7 Glo nahastearen (tanpoia eta substratua) bolumen bera gehitu zitzairen. Nahastearekin ordu batez inkubatu ostean, lagin bakoitzeko 200 µl hartu eta 96 putzuetako plaka beltz batean jarri ziren, irakurgailuan askatutako luminiszentzia neurtzeko.

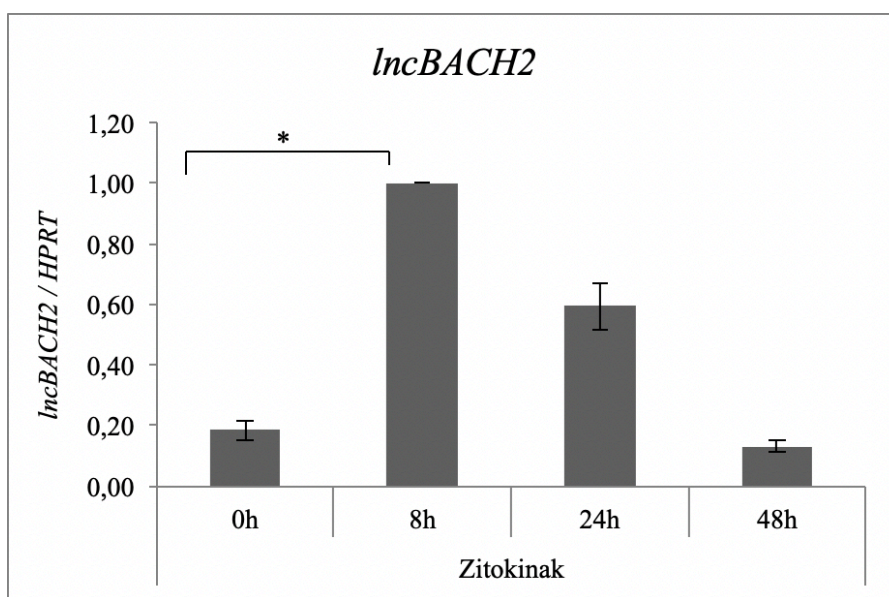
#### 4.6. ANALISI ESTADISTIKOAK

Datuak batezbestekoa  $\pm$  SEM (SEM: *standard error mean*; batezbestekoaren errore estandarra) bezala adierazita daude. Baldintzen arteko desberdintasunak *Student's t test* frogaren bidez ebaluatu ziren. p-balorea 0.05 baino txikiagoa zenean, baldintzen arteko desberdintasunak esanguratsuak zirela kontsideratu ziren. Horretarako, *Microsoft Office Excel* programa erabilita, lortutako datuen batez besteko balioak, desbiderapen estandarra eta errorea kalkulatu dira.

## 5. EMAITZAK

### 5.1. HANTURA SUSTATZEN DUTEN ZITOKINEK *IncBACH2*-AREN ADIERAZPENA HANDITZEN DUTE

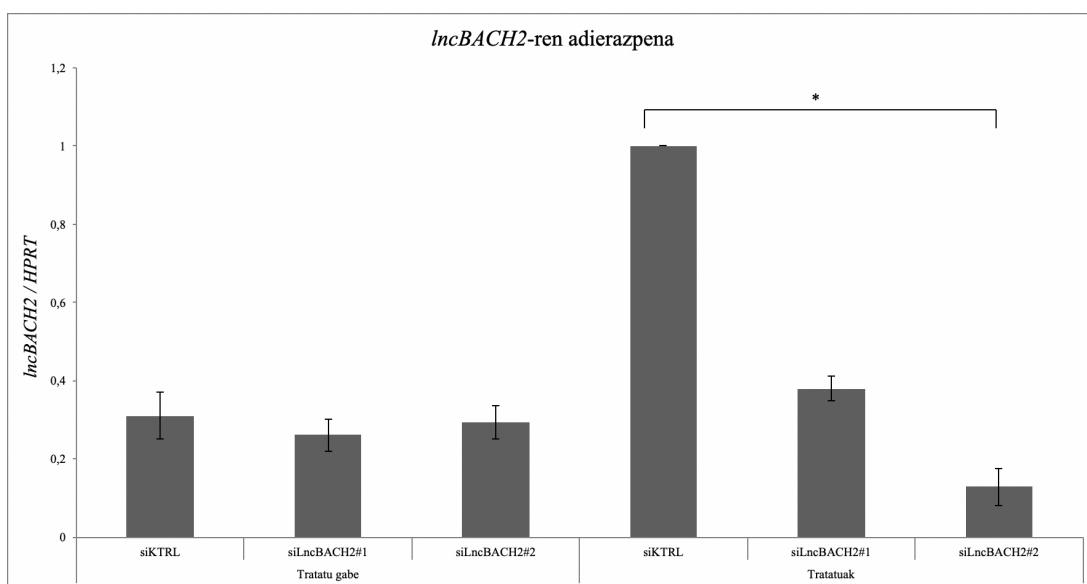
Hasteko, zitokinekin egindako tratamenduei dagokien emaitzak aztertuko dira, **4. irudian** ikus daitekeen bezala, 8h-tara zitokinek (IL-1 $\beta$  eta IFN- $\gamma$ ) *lncBACH2*-aren adierazpenean efektu nabaria izan zuten; izan ere, *lncBACH2*-aren adierazpena 5.4 aldiz emendatu zen tratamenduaren ondorioz. 24 ordotara, berriz, *lncBACH2*-aren adierazpenak behera egin zuen 8 ordutako tratamenduarekin konparatuz, baina oraindik ere tratatu gabeko zelulekin alderatuta, *lncBACH2*-aren adierazpena 3.2 aldiz handiagoa zen. Azkenik, 48 ordotara, *lncBACH2*-aren adierazpena egoera basalean zuen mailara jaitsi zen.



**4. irudia. Zitokinek *lncBACH2*-aren adierazpenean duten eragina.** Irudi honetan denbora-tarte desberdinetan egindako zitokinen tratamenduaren emaitzak ikusten dira, 8, 24 eta 48h-tan egindakoak, hain zuzen ere. 0h-ko laginak kontrol gisa jarduten du. Datuak 3 erreplika esperimentalen batezbestekoa  $\pm$  SEM (SEM: *standard error mean*; batezbestekoaren errore estandarra) bezala adierazita daude. Baldintzen arteko desberdintasunak *Student's t test* frogaren bidez ebaluatu ziren; \* $p < 0.05$ .

## 5.2. *lncBACH2*-REN ISILARAZPENAK *BACH2* GENE KODETZAILEAREN ADIERAZPENA EMENDATZEN DU

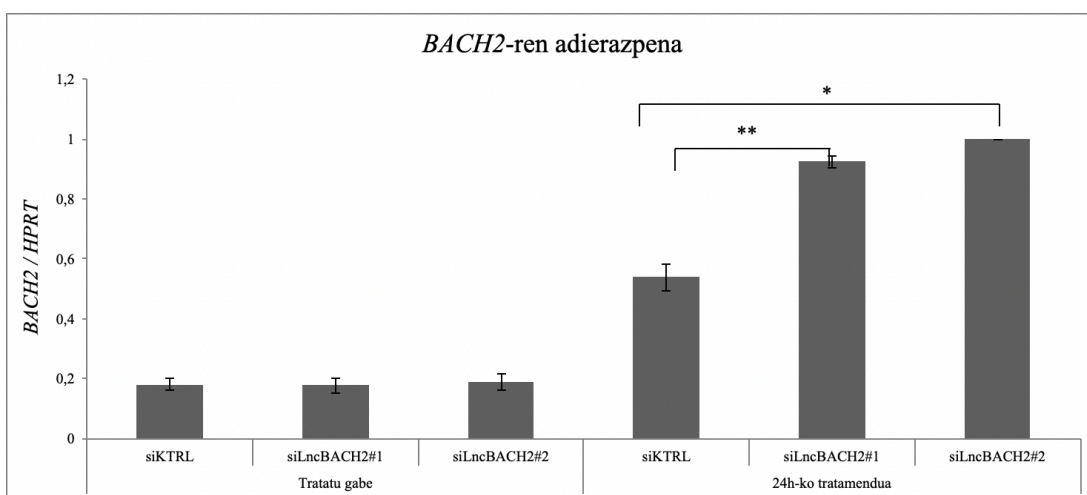
*LncBACH2*-ren isilarazpenaren efizientzari dagokionez eta **5. irudian** ikus daitekeen bezala, egoera basalean (tratatu gabeko zelulak) siKTRL-rekin edo siLncBACH2 isilarazteko erabili ziren siRNA-ekin transfektatutako zeluletan, *lncBACH2*-ren adierazpena nahiko antzekoa da. Zelulak zitokina proinflamatorioekin tratatu zirenean berriz, argi ikusten da *lncBACH2*-ren adierazpena 2.5-10 aldiz txikiagoa dela siLncBACH2#1 edo siLncBACH2#2-rekin transfektatutako zeluletan, siKTRL-arekin transfektatutakoekin konparatuz gero.



**5. irudia.** *lncBACH2*-ren adierazpenaren neurketa zelulak siRNA-ekin transfektatu eta zitokina proinflamatorioekin tratatu ostean. Hiru siRNA erabili ziren, siKTRL, siLncBACH2#1 eta siLncBACH2#2, hurrenez hurren. Lagin batzuk zitokina proinflamatorioekin tratatu ziren (IL 1- $\beta$  eta IFN- $\gamma$ ) 24 orduz. Datuak 5 erreplika esperimentalen batezbestekoa  $\pm$  SEM (SEM: *standard error mean*; batezbestekoaren errore estandarra) bezala adierazita daude. Baldintzen arteko desberdintasunak *Student's t test* frogaren bidez ebaluatu ziren; \* $p < 0.05$ .

Bestalde, *BACH2* gene kodetzailearen adierazpena neurtu genuen *lncBACH2* isilaraztean. **6. irudian** ikus daitekeen bezala, tratatu gabeko laginen kasuan ez zen baldintzen arteko desberdintasunik ikusi *BACH2*-ren adierazpenari dagokionez. Aldiz, zitokina proinflamatorioekin tratatutako  $\beta$  zelulak eta siKTRL-arekin transfektatutako

zelulei erreparatuz, tratamenduak *BACH2*-ren adierazpena emendatu zuela ikus daiteke. Gainera, *lncBACH2*-ren isilarazpenak *BACH2* gene kodetzailearen adierazpena emendatu zuela ikus daiteke tratatutako zeluletan. Izan ere, siKTRL-arekin konparatuta, *lncBACH2* isilarazitako zeluletan *BACH2*-ren adierazpena  $\sim 2$  aldiz handiagoa izan zen.



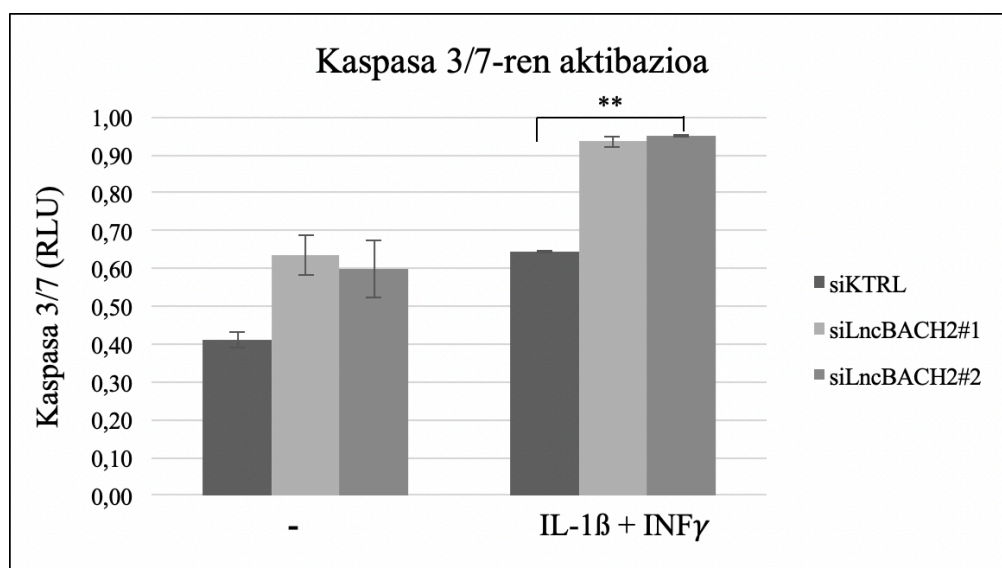
**6. irudia.** *BACH2*-ren adierazpena *lncBACH2* siRNA-ekin isilarazi eta zelulak zitokina proinflamatorioekin tratatu ostean. Hiru siRNA erabili ziren, siKTRL, siLncBACH2#1 eta siLncBACH2#2, hurrenez hurren. Lagin batzuk zitokina proinflamatorioekin (IL-1 $\beta$  eta INF- $\gamma$ ) tratatu ziren 24 orduz. Datuak 5 erreplika esperimentalen batezbestekoa  $\pm$  SEM (SEM: *standard error mean*; batezbestekoaren errore estandarra) bezala adierazita daude. Baldintzen arteko desberdintasunak *Student's t test* frogaren bidez ebaluatu ziren; \* $p < 0.05$  eta \*\* $p < 0.01$ .

### 5.3. *LNCBACH2*-AREN ISILARAZPENAK ZITOKINAK ERAGINDAKO APOPTOSIA EMENDATZEN DU

Kaspasa 3/7 aktibazioaren emaitzei dagokienez, siKTRL-arekin transfektatutako zelulei erreparatuz gero, ikus daiteke espero bezala zitokina proinflamatorioen tratamenduak kaspasa 3/7-ren aktibazioa emendatu zuela, **7. irudian** antzematen den moduan; hau da, zitokina proinflamatorioek  $\beta$  zelulen apoptosia eragiten zutela. Egoera basalean (tratatu gabeko zeluletan) zein tratatutako zeluletan, *lncBACH2*-aren



isilarazpenak bi siRNA independenteekin (siLncBACH2#1 eta siLncBACH2#2) apoptosiaren emendioa eragiten zuen siKTRL-rekin transfektatutako zelulekin konparatuta, ~ 1.5 aldiz, hain zuzen ere.



**7. irudia. Kaspasa 3/7-ren aktibazioaren determinazioa *lncBACH2* isilarazitako zeluletan.** Irudi honetan tratamendu desberdinak jaso zituzten laginak ikusten dira. Hiru siRNA erabili ziren, siKTRL, siLncBACH2#1 eta siLncBACH2#2, hurrenez hurren. Lagin batzuk zitokina proinflamatorioekin tratatu ziren (IL-1 $\beta$  eta IFN- $\gamma$ ) 24 orduz. Datuak 4 erreplika esperimentalen batezbestekoa  $\pm$  SEM (SEM: *standard error mean*; batezbestekoaren errore estandarra) bezala adierazita daude. Baldintzen arteko desberdintasun adierazgarriak *Student's t test* frogaren bidez ebaluatu ziren; \*\* $p < 0.01$ . RLU: *relative luciferase units* (luziferasa unitate erlatiboak).

## 6. EZTABAIDA

Aurreko ataletan azaldu den bezala, *BACH2* genea I motako diabetesarekin asoziatuta dagoen genea da (Marroquí et al., 2014) eta gaixotasun horrekin asoziatuta dagoen polimorfismo bat dauka, rs3757247 delakoa. Ikusi da lncRNA jakin bat *BACH2* gene kodetzailearen sekuentziarekin partzialki gainjartzen dela (Mirza et al., 2014), *lncBACH2* gisa izendatu duguna. Lan honetan  $\beta$  zelulak hantura sustatzen duten zitokinekin tratatzean, *lncBACH2*-ren adierazpena handitzen dela ikusi dugu, *lncBACH2*-k zitokinek eragindako  $\beta$  zelulen apoptosiarekin lotuta egon daitekeela

iradokiz. Gainera, *lncBACH2*-ren adierazpen profila *BACH2* gene kodetzailearen adierazpen profilaren berdina dela ikusi dugu eta, horrek, adieraz dezake *lncBACH2* *BACH2* genearen adierazpena erregulatzen ari dela. Izan ere, *BACH2* gene kodetzailearen adierazpenak ere 8 ordutako zitokinen tratamenduarekin gora egiten du eta, gero, 24 eta 48 ordutara jaisten da (Marroquí et al., 2014).

Bestalde,  $\beta$  zeluletan *lncBACH2* isilarazi dugunean, estimulu proinflamatorio baten aurrean *BACH2* gene kodetzailearen adierazpena emendatu egiten dela ikusi dugu. Izan ere, zitokina proinflamatorioekin tratatutako eta *lncBACH2* isilarazitako  $\beta$  zeluletan *BACH2* genearen adierazpenak gora egiten du eta, beraz, badirudi hantura sustatzen denean (IL-1 $\beta$  eta IFN- $\gamma$ -ren presentzian) *lncBACH2*-k *BACH2* gene kodetzailearen adierazpena kontrolatzen duela. Isilarazpenaren emaitzei erreparatuz gero, tratatu gabeko zeluletan ez dugu *lncBACH2* isilarazteko gaitasunik eduki. Arrazoia ez dakigun arren, pentsa daiteke egoera basalean *lncBACH2* zelulen nukleoan dagoela eta zitokinen presentzian zitoplasmara translokatzeko dela. Izan ere, partikula lipidikoen bitarteko transfekzioa ez da oso eraginkorra nukleoan dauden RNak isilarazteko eta horrek azalduko luke isilarazpen-efizientzian ikusitako ezberdintasunak tratatutako eta tratatu gabeko zelulen artean.

Arestian aipatu bezala, I motako diabetesarekin asoziatutako polimorfismo bat (rs3757247), *BACH2* gene kodetzailearen eta *lncBACH2*-ren introi batean kokatuta dago (Mirza et al., 2014). Bere momentuan asoziazio seinale hori dela eta, *BACH2* gene kodetzailea diabeteserako gene hautagai gisa proposatu zen arren, gerta daiteke polimorfismo horrek *lncBACH2*-aren funtzioan eragina izatea eta, ondorioz, bera izatea diabetesarekin erlazionatutako gene etiologikoa genomaren eskualde horretan. Hainbat ikerketek erakutsi dutenez, polimorfismoek lncRNA-en bigarren mailako egitura aldatu dezakete, beraien funtzioan eraginez (Castellanos-Rubio eta Ghosh, 2019).

I motako diabetesean pankreako  $\beta$  zelulen suntsipena batez ere zitokinek edo bestelako estimulu diabetogenikoek eragindako zelulen apoptosiaren bitartez ematen da (Marroquí et al., 2014). *BACH2* geneak transkripzio faktore bat kodetzen du, zeina zitokinek eragindako pankreako  $\beta$  zelulen apoptosisia erregulatzen duen. Kontuan izanda *lncBACH2* eta *BACH2*-ren adierazpena korrelazionatuta daudela, pentsa daiteke *lncBACH2* ere  $\beta$  zelulen apoptosian parte har dezakeela. Izan ere, lan honen emaitzen arabera, *lncBACH2* genearen inhibizioak zitokinek eragindako  $\beta$  zelulen apoptosisia areagotzen du.

Alabaina, lehen aipatu den bezala, *lncBACH2*-ren inhibizioak *BACH2* gene kodetzailearen adierazpena handitzen du eta publikatutako lanen arabera, *BACH2* genearen gainadierazpenak zitokinek eragindako  $\beta$  zelulen apoptosisia arintzen du (Marroquí et al., 2014). *BACH2* geneak zitokina proinflamatorioek sustatutako  $\beta$  zelulen apoptosisia erregulatzen du, JNK1/BIM bidezidorraren kontrolaren bidez, baita A1, MCL-1 eta BCL-2 familiako faktore antiapoptotikoen kontrolaren bidez. *BACH2* genea isilarazita duten eta zitokina proinflamatorioekin tratatu diren  $\beta$  zelulen kasuan, JNK1 proteina proapoptotikoaren fosforilazioaren emendioa antzeman da, kinasa 7 proteina erregulazio positiboa dela eta. JNK1 proteinak BIM proteina proapoptotikoaren fosforilazioa sustatzen du eta JNK1 zein BIM proteinek  $\beta$  zelulen apoptosisia bultzatzen dute. *BACH2* gene kodetzailearen gainadierazpenak kontrako efektua duela ikusi da (Marroquí et al., 2014).

Emaitza hauek aintzat hartuz, badirudi *lncBACH2*-k  $\beta$  zelulen apoptosian duen eragina ez dela *BACH2* genearen adierazpenaren erregulazioaren bitartekoa eta efektu horren pean bestelako mekanismo molekular bat egon daitekela dirudi. Izan ere, lncRNAek prozesu askotan parte hartzen dute mekanismo molekular ezberdinen bitartez. Adibidez, lncRNA-ek proteinekin interakzionatzeko lotura guneak dituzte eta zenbait kasuetan, proteinak zelularen konpartimentu batetik bestera eramateko gaitasuna dutela ikusi da (Hu et al., 2018). Bestalde, zuzenean DNArri lotzeko gaitasuna dute ere, geneen transkripzioa erregulatuz (Hu et al., 2018). Mekanismo molekular ezberdinen bidez, beraz, lncRNA-ek giza gaixotasunen garapenean ere eragina dute. Adibidetzat,

alzheimerren gaixotasunean eragiten duen *BACE1-AS* lncRNA edo *HOTAIR* lncRNA parkinson gaixotasunaren agerpenean duen inplikazioa (Hu et al., 2018).

Laburbilduz, lan honen emaitzek *lncBACH2* geneak pankreako  $\beta$  zelulen apoptosian parte hartzen duela baieztatzen dute, baina eragin horren mekanismo molekularrak zeintzuk diren argitzeke daude. *LncBACH2* geneak I motako diabetesaren patogenesisian eduki dezakeen eragina argitzeko, lehendabizi pankreako  $\beta$  zeluletan betetzen duen funtzioa argitu behar da, horretarako ikerketa funtzional gehiago egitea beharrezkoa delarik.

## 7. ONDORIOAK

Lan honen garapenean aurrera eramandako esperimientuetatik zenbait ondorio atera ditzakegu. Alde batetik, esperimientuetatik lortutako emaitzek konfirmatu dute jada jakina zena, hau da, zitokina proinflamatorioen (IL-1 $\beta$  eta IFN- $\gamma$ ) tratamenduak  $\beta$  zelulen apoptosia emendatzen duela. Bestalde, siLncBACH2#1 zein siLncBACH2#2 siRNAk  $\beta$  zeluletan *lncBACH2* isilarazteko egokiak direla egiaztatu da. Azkenik, *lncBACH2* geneak zitokinek eragindako  $\beta$  zelulen apoptosian parte hartzen duela konfirmatu da, baina efektu horren mekanismo molekularrak zeintzuk diren argitzeke daude. Lan honen eta alde z aurretik publikatutako emaitzen arabera, badirudi *lncBACH2*-ren efektua  $\beta$  zelulen apoptosian ez dela *BACH2* genearen adierazpenaren bitartekoa.

## 8. ESKERRAK

Hasteko, gustatuko litzaidake Euskal Herriko Unibertsitateari (UPV/EHU) eskerrak ematea, laborategiko instalazioak erabiltzen usteagatik. Gainera, Izortze Santin irakasle eta ikerlariari eskerrak eman nahi dizkiot, gradu amaierako lan honen

zuzendaria izateagatik eta hainbeste laguntzeagatik. Azkenik, Itziar González-ri ere eskertzen diot gradu amaierako lan honetan zehar bere laguntza eskaintzea.

## 9. BIBLIOGRAFIA

Atkinson MA, Eisenbarth GS. 2001. Type 1 diabetes: New perspectives on disease pathogenesis and treatment. *Lancet* 358: 221–229.

Bluestone JA, Herold K, Eisenbarth G. 2010. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature* 464: 1293–1300.

Castellanos-Rubio, Ainara; Ghosh, Sankar. 2019. Disease-Associated SNPs in Inflammation-Related lncRNAs. *Frontiers in Immunology* 10: 420.

Concannon P, Rich SS, Nepom GT. 2009. Genetics of type 1A diabetes. *N Engl J Med* 360: 1646–1654.

Drescher, Kristen M.; Kono, Ken; Bopegamage, Shubhada; Carson, Steven D.; Tracy, Steven. 2004. *Coxsackievirus B3* infection and type 1 diabetes development in NOD mice: insulinitis determines susceptibility of pancreatic islets to virus infection. *Virology* 2: 381–394.

Filippi, Christophe M.; von Herrath, Matthias G. 2008. Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes* 11: 2863–2871.

Grant SF, Qu HQ, Bradfield JP, et al. 2009. Follow-up analysis of genome-wide association data identifies novel loci for type 1 diabetes. *Diabetes* 58: 290–295.

Hogg-Kollars, Sabine; Al Dulaimi, David; Tait, Karen; Rostami, Kamran. 2014. Type 1 diabetes mellitus and gluten induced disorders. *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* 4: 189–197.

Hu, Guoku; Niu, Fang; Humburg, Bree A.; Liao, Ke; Bendi, Venkata Sunil; Callen, Shannon; Fox, Howard S.; Buch, Shilpa. 2018. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs and their role in disease pathogenesis. *Oncotarget* 26: 18648–18663.

Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, et al. 2011. Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet* 43: 621–629.

Hyöty, Heikki; Knip, Mikael; Veijola, Riitta; Ilonen, Jorma; Simell, Olli; Simell, Tuula; Almond, Jeffrey W.; Lehtonen, Jussi *et al.* 2014. *Coxsackievirus B1* Is Associated With Induction of  $\beta$ -Cell Autoimmunity That Portends Type 1 Diabetes. *Diabetes* 2: 446–455.

Marroquí, L.; Santin, I.; Dos Santos, R. S.; Marselli, L.; Marchetti, P.; Eizirik, D. L. 2014. *BACH2*, a Candidate Risk Gene for Type 1 Diabetes, Regulates Apoptosis in Pancreatic–Cells via JNK1 Modulation and Crosstalk With the Candidate Gene *PTPN2*. *Diabetes* 7: 2516–2527.

Mirza, Aashiq H.; Kaur, Simranjeet; Brorsson, Caroline A.; Pociot, Flemming. 2014. Effects of GWAS-associated genetic variants on lncRNAs within IBD and T1D candidate loci. *PloS One* 8: e105723.

Moran I, Akerman I, van de Bunt M, Xie R, Benazra M, et al. 2012. Human  $\beta$  cell transcriptome analysis uncovers lncRNAs that are tissue-specific, dynamically

regulated, and abnormally expressed in type 2 diabetes. *Cell Metab* 16: 435–448.

Noble JA, Erlich HA. 2012. Genetics of type 1 diabetes. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2: a007732.

Pociot F, Akolkar B, Concannon P, Erlich HA, Julier C, Morahan G, Nierras CR, Todd JA, Rich SS, Nerup J. 2010. Genetics of type 1 diabetes: What's next? *Diabetes* 59: 1561 – 1571.

Ponting CP, Oliver PL, Reik W. 2009. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* 136: 629–641.

Roychoudhuri R, Hirahara K, Mousavi K, et al. 2013. *BACH2* represses effector programs to stabilize T(reg)-mediated immune homeostasis. *Nature* 498: 506–510.

Todd JA. 2010. Etiology of type 1 diabetes. *Immunity* 32: 457 – 467.

Wang KC, Chang HY. 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* 43: 904–914.

Wapinski O, Chang HY. 2011. Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol* 21: 354–361.

## **1. ANEXO A**

### **1.1. *IncBACH2*-REN HASLEEN SEKUENTZIAK:**

FW: GTGCTCCTCTTGGAGGGTGT

RV: AAAGTGAGGGCTCCAGGAAT

### **1.2. *BACH2*-REN HASLEEN SEKUENTZIAK**

FW: TCACCATCATCCACCCTATG

RV: TTCTAGGCATGGGAACCACT

### **1.3. *HPRT*-REN HASLEEN SEKUENTZIAK**

FW: GCTATAAATTCTTTGCTGACCTGCTG

RV: AATTACTTTTATGTCCCCTGTTGACTGG