

FACULTAD DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA. LEIOA

TRABAJO FIN DE GRADO BIOTECNOLOGÍA

SILENCIAMIENTO DE *PTPRK*, UN GEN CANDIDATO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

Alumno/a: Casado Martín, Lorena

Fecha: Junio 2015

Director/a

Dr/a. José Ramón Bilbao Catalá

Curso académico

2014/2015

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Enfermedad celíaca	1
1.1.1 Mecanismos de autoinmunidad	1
1.1.2 Genética de la enfermedad celíaca	2
1.1.3 Región HLA	3
1.2 Immunochip	4
1.3 Importancia del silenciamiento	5
2. OBJETIVOS	6
3. MATERIALES Y MÉTODOS	7
3.1 Selección de genes a estudiar	7
3.2 Mantenimiento de la línea celular	7
3.2.1 Cultivo celular	7
3.2.2 Tratamiento con gliadina	8
3.3 Extracción, purificación y cuantificación de RNA	8
3.4 PCR cuantitativa a tiempo real (RT-qPCR)	8
3.5 Silenciamiento	10
3.6 Análisis estadístico de los resultados	11
4. RESULTADOS	11
4.1 Elección de los genes a estudiar	11
4.2 Extracción de RNA	12
4.3 RT-qPCR	13

4.3.1 Cuantificación de la expresión de los genes candidato	13
4.3.2 Estudio de la expresión de <i>PTPRK</i> en células tratadas con gliadina	14
4.3.3 Estudio de la expresión de <i>PTPRK</i> tras el silenciamiento	15
5. DISCUSIÓN	18
6. CONCLUSIÓN	18
7. BIBLIOGRAFÍA	19
ANEXO I	i

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ENFERMEDAD CELÍACA

La Enfermedad Celíaca, también conocida como enteropatía sensible al gluten, es un trastorno autoinmune crónico y común con una prevalencia de 1:100 en la población. Esta patología es causada por la intolerancia a la ingesta de gluten y desarrollada por personas genéticamente predispuestas cuyo único tratamiento consiste en una dieta estricta libre de gluten.

En muchas ocasiones esta patología se presenta con otro tipo de enfermedad autoinmune asociada como la dermatitis herpetiforme, enfermedad tiroidea autoinmune o hepatitis autoinmune entre otras (Molina Arias y Martínez-Ojinaga Nodal, 2013).

La autoinmunidad de la Enfermedad Celíaca es desarrollada contra el autoantígeno transglutaminasa tisular (tTG) y la respuesta está caracterizada por una inflamación crónica que afecta al intestino delgado. Los síntomas o consecuencias de esta enfermedad son principalmente la atrofia de las vellosidades, hiperplasia de las criptas e infiltración linfocítica en la mucosa (Plaza-Izurieta, 2014).

1.1.1 Mecanismos de autoinmunidad

Como se ha indicado con anterioridad, la Enfermedad Celíaca es una patología que precisa de una predisposición genética para poder desarrollarse, siendo imprescindible la exposición al gluten como desencadenante.

En concreto, la molécula que estimula la respuesta inmune anómala es la gliadina. Esta molécula es una mezcla de más de 40 proteínas diferentes, de elevado peso molecular, secuencia aminoacídica similar y con un elevado contenido en los aminoácidos hidrofóbicos glutamina y prolina. La transglutaminasa tisular (tTG) cataliza, tanto *in vivo* como *in vitro*, la desaminación de residuos específicos de glutamina a ácido glutámico, estimulando la capacidad de los péptidos derivados de la gliadina a unirse a HLA-DQ2/8 generando la respuesta (Sollid, 2000).

Existen varios estudios que muestran que en esta enfermedad participa tanto la respuesta inmune innata como la adaptativa contribuyendo ambas al daño epitelial (Gianfrani et al., 2005).

Se conoce que, el mecanismo autoinmune de la enfermedad está mediado por las células-T. En este proceso lo que ocurre es que la gliadina, ya sea en forma nativa o desaminada por transglutaminasa tisular, activa la infiltración de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+ por la lámina propia, generando la liberación de citoquinas proinflamatorias entre ellas el γ -interferón (Gianfrani et al., 2005).

Además, IL-15 cuya expresión está inducida por el estrés generado por la gliadina sobre el epitelio, juega un papel importante en la respuesta. La infiltración del epitelio por células que interactúan con dichas moléculas estimulan la actividad citotóxica, la activación de células dendríticas y probablemente la reducción de la apoptosis de células-T (Gianfrani et al., 2005).

1.1.2 Genética de la enfermedad celíaca

Aunque el modo de herencia de la Enfermedad Celíaca es aún desconocido, existen muchas evidencias que muestran que la genética es un factor importante en la predisposición de su desarrollo. De acuerdo a numerosos estudios de prevalencia en familias afectadas y otros que comparan parejas de gemelos, se puede afirmar que la genética juega un importante papel tanto en el inicio como en el posterior desarrollo de la enfermedad. En la actualidad se calcula que la heredabilidad de esta enfermedad está cerca del 87%.

Desde hace tiempo se conoce que gran parte del riesgo genético de la celiaquía se debe a la presencia de ciertos alelos del antígeno leucocitario humano (HLA por sus siglas en inglés) presente en la superficie de las células presentadoras de antígenos, posibilitando el reconocimiento antigénico y la respuesta de los linfocitos T, iniciándose así la respuesta inmune adaptativa.

A pesar de su papel determinante en la enfermedad, su contribución a la herencia de la misma es modesta (<50%), por lo que se ha especulado sobre la existencia de numerosos *loci* de susceptibilidad no ligados a HLA, cada uno de los cuales tendría un efecto muy pequeño sobre el riesgo global (Fernandez-Jimenez et al., 2013).

1.1.3 Región HLA

Como se ha indicado con anterioridad, la Enfermedad Celíaca, es de origen fundamentalmente genético y la región más involucrada es la región HLA o Antígeno Leucocitario Humano, que es el nombre que recibe el Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH).

HLA es un *superlocus* localizado en el brazo corto del cromosoma 6 que contiene un gran número de genes relacionados con el sistema inmune. Estos genes son responsables de codificar las proteínas presentadoras de antígenos, las cuales se encuentran en la superficie de la mayor parte de las células humanas, siendo una pieza fundamental en la distinción entre lo propio y lo extraño.

Se sabe que, los factores directamente implicados en la enfermedad son los genes HLA de clase II los cuales codifican para las moléculas HLA-DQ2 y HLA-DQ8. La asociación de HLA-DQ2 con la enfermedad es la más fuerte de forma que, el 90% de los pacientes celíacos presentan al menos una copia del heterodímero HLA-DQ2.5 (formado por la combinación de dos alelos DQA1*05 y DQB1*02). Además, un 20-30% de la población no celíaca es portadora de esta variante de riesgo lo cual demuestra que, HLA-DQ2 es por sí solo insuficiente para desarrollar la enfermedad.

Por otra parte, la mayoría de los pacientes con Enfermedad Celíaca que carecen de HLA-DQ2, son portadores de HLA-DQ8 y una proporción muy pequeña de celíacos son negativos para DQ2 y DQ8 presentando, la mayor parte de estos individuos, al menos uno de los alelos que codifica la molécula DQ2 (Fernandez-Jimenez et al., 2013). Las diferentes posibilidades se muestran en la **Figura 1**.

Por todo esto y dada la importancia de las moléculas HLA en el proceso de activación de las células T autoreactivas contra el gluten, es lógico pensar que cualquier modificación en la secuencia que las codifica puede provocar una alteración (Fernandez-Jimenez et al., 2013).

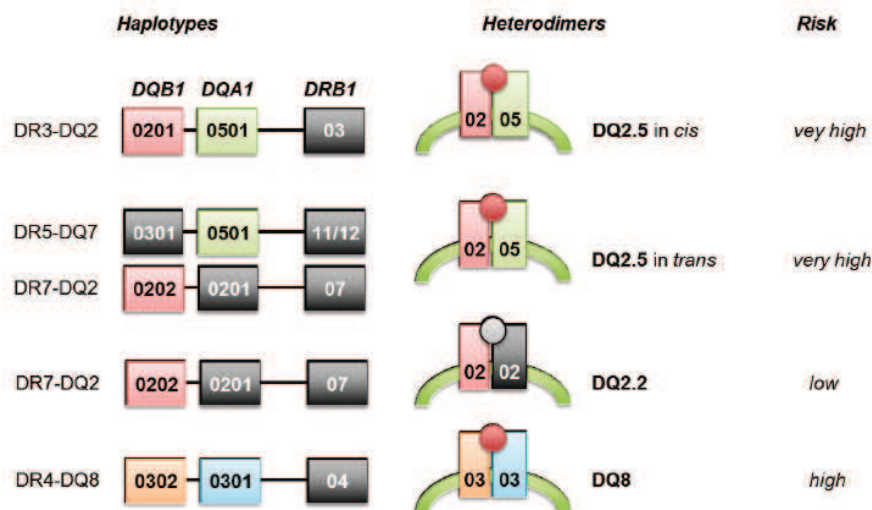


Figura 1: Asociación del *locus* HLA con la Enfermedad Celíaca (EC). La molécula HLA-DQ2 es el factor principal de riesgo genético de la enfermedad. La mayor parte de los individuos celíacos expresan el heterodímero HLA-DQ2.5 codificado por los alelos HLA-DQA1*05 (cadena α) y HLA-DQB1*02 (cadena β), que pueden encontrarse en *cis* en el haplotipo DR3-DQ2 o en *trans* en los heterocigotos DR5-DR7 y DR7-DQ2.2. El dímero HLA-DQ2.2, variante de HLA-DQ2, confiere un riesgo bajo de desarrollar EC. La mayoría de pacientes DQ2-negativo expresan HLA-DQ8, codificada por el haplotipo DR4-DQ8. Figura recogida de Fernández-Jimenez et al. La Enfermedad Celíaca: Marcadores Genéticos, 2013.

1.2 IMMUNOCHIP

ImmunoChip es el último proyecto a gran escala llevado a cabo con el objetivo de identificar el mayor número de variantes asociadas a la Enfermedad Celíaca y a otras enfermedades autoinmunes.

En concreto, para la celiaquía se han analizado 200.000 variantes en 12.000 pacientes celíacos y en 12.000 controles a partir de muestras de siete regiones geográficas diferentes. En este gran estudio, fueron estudiados 183 *loci* ajenos a la región HLA de los cuales 36 mostraron una asociación significativa con la enfermedad, con una frecuencia alélica mínima mayor del 5%.

Después de la anotación funcional de SNPs, una de las principales conclusiones de este proyecto fue que las variantes genéticas de regiones codificantes son muy pocas aunque, algunas de ellas se sitúan cerca del inicio de la transcripción de varios genes o en sus regiones 3'UTR. Se han propuesto 57 genes candidato, mostrados en la **Figura 2**, debido a que poseen señales significativas cerca de su región reguladora. (Fernández Jiménez, 2014).

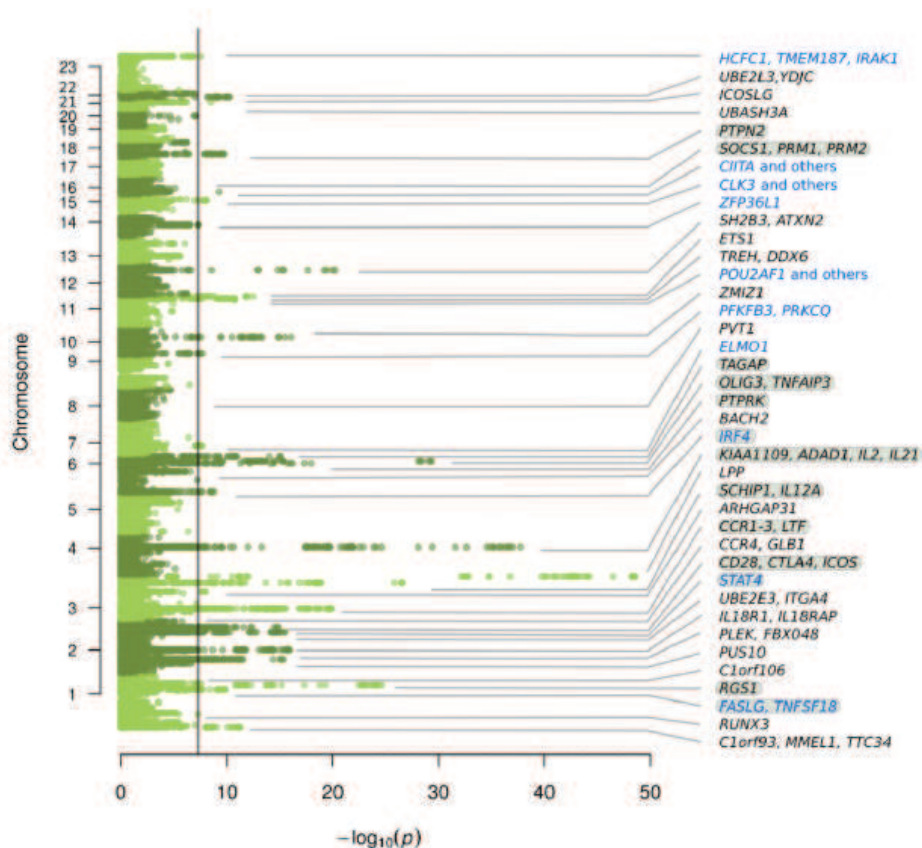


Figura 2: Estudio de asociación estadística en Manhattan para el conocimiento de nuevos loci de riesgo de la enfermedad celiaca. Figura recogida en Gosia et al., 2011.

1.3 IMPORTANCIA DEL SILENCIAMIENTO

El silenciamiento genético es un mecanismo de interferencia génica que se produce de forma natural en el organismo, estando implicado por ejemplo, en el desarrollo celular y en la defensa contra los virus.

El silenciamiento génico por ácido ribonucleico (RNA por sus siglas en inglés) en concreto RNA de interferencia, es inducido por pequeñas moléculas de este ácido nucleico, bicatenario de 21 a 27 nucleótidos denominadas siRNA (del inglés *small interfering RNA*). Estos RNAs sufren una serie de procesos en la célula, como consecuencia de los cuales su RNA de doble cadena se desdobra en una hebra sentido y una hebra antisentido. De ésta forma, la hebra antisentido se une a la cadena de mRNA por complementariedad de bases, provocando que el complejo resultante sea reconocido por los mecanismos celulares y degradado como se recoge en la **Figura 3**.

Los siRNAs también pueden ser introducidos artificialmente en el organismo con el fin de silenciar un gen específico del que se conozca su secuencia, mediante el diseño de la secuencia complementaria de dicho gen.

Por todo esto, los siRNA constituyen una herramienta inestimable en el estudio de las funciones de los genes, en la validación de las dianas terapéuticas, en el estudio del mecanismo de acción de medicamentos o como terapia para enfermedades de origen genético, como es el caso de la Enfermedad Celíaca.

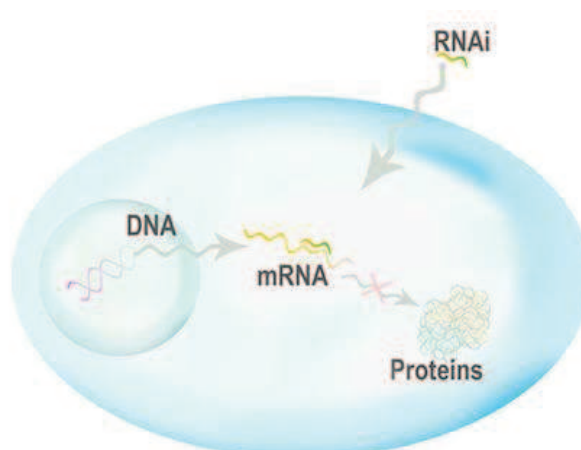


Figura 3: Esquema del proceso de silenciamiento genético.
Figura recogida en: sylentis.com/index.php/es/mecanismo.
Consulta 13 de junio 2015

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo es el conocimiento general de la Enfermedad Celíaca basado en la lectura de bibliografía específica. Así como, la realización del estudio de la expresión en células del epitelio intestinal, el efecto de la presencia de gliadina en la expresión y el desarrollo experimental de un protocolo de silenciamiento, para un gen participante en la enfermedad, en concreto el gen *PTPRK*, seleccionado tras un estudio bibliográfico y según los resultados del ImmunoChip.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 SELECCIÓN DE GENES A ESTUDIAR

La selección del gen a partir del cual se desarrollan los objetivos del trabajo, se ha realizado mediante una lectura de bibliografía variada a cerca de la Enfermedad Celíaca.

Tras dicha revisión, se eligen cuatro genes (*PTPRK*, *ICAM-1*, *THEMIS* y *MICA*.) de los que se estudiará su expresión con el objetivo de elegir el gen candidato final.

El gen elegido como diana para poner a punto un protocolo de silenciamiento del mismo es *PTPRK*.

Además, se utilizan los genes *ACTB* y *TJPI*, participantes ambos en las uniones intercelulares epiteliales, para comprobar si el silenciamiento tiene efecto en dichos genes.

3.2 MANTENIMIENTO DE LA LÍNEA CELULAR

3.2.1 Cultivo celular

Los tipos celulares utilizados en el trabajo son C2BBe1 [clones de Caco2] (ATCC[®] CRL2102[™]) y T84 (ATCC[®] CCL248[™]).

El medio de cultivo utilizado para las células C2BBe1 es DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium con 4,5 g/l de glucosa y L-glutamina, LONZA), suero fetal bovino (FBS, LONZA) al 5% como factor de crecimiento, previamente inactivado a 56°C y Estreptomicina y Penicilina (5000U/ml penicilina y 5000U/ml estreptomicina, LONZA) al 1% como antibiótico. Las condiciones de crecimiento establecidas son 37°C y 5% CO₂.

Para el cambio de medio, realizado cada 48 horas y después de cada pase celular, se utiliza HBSS (BioWhittaker[®], LONZA) como reactivo de limpieza.

En el pase de células los reactivos utilizados son HBSS (BioWhittaker[®], LONZA), Tripsina (Trypsin-EDTA 0,25% solution, SIGMA-ALDRICH[®]) como medio deshaderente y Trypan Blue Stain (Gibco[®], Invitrogen[™]) diluido 1/10 en PBS (Life-science, SIGMA-ALDRICH[®]) para colorar las células muertas. Levando a cabo el conteo de las células mediante un hemocitómetro.

3.2.2 Tratamiento con gliadina

El estudio de la influencia de gliadina en la expresión del gen diana, se realiza mediante el tratamiento de células C2BBel con dicha proteína durante 13 días, realizando el ensayo por triplicado.

Para ello, se utilizan tres cultivos celulares en diferentes condiciones, un control sin estímulo, uno estimulado con gliadina digerida con tripsina y pepsina y un tercero tratado con seroalbúmina bovina (BSA de sus siglas en inglés) (HyClone™ SH30574.03, GE Healthcare Life-Science) digerido con los mismos enzimas como control, para comprobar que el efecto sobre la expresión del gen es debido a la gliadina y no a las enzimas con la que ésta se trata.

La digestión se inicia a partir de 2,5g de gliadina (G-3375, SIGMA-ALDRICH®) en 25ml de HCl 0,2N, mediante el tratamiento con 25mg de pepsina (P6887, SIGMA-ALDRICH®) a 37°C durante una noche. A continuación, se utiliza una disolución de NaOH 1N con el objetivo de conseguir un pH 7 y proceder a la digestión con 25mg de tripsina (T9201, SIGMA-ALDRICH®), durante 5h a 37°C. El proceso continúa con un hervido para la inactivación de los enzimas y una posterior centrifugación a 2000g durante 10 minutos.

A partir del sobrenadante obtenido, se realiza una filtración mediante una membrana de 20µm de diámetro de poro, como mecanismo de esterilización, tras la cual se mide la concentración de proteína en Nanodrop 1000 a 280 nm y se realiza una detección de endotoxinas con PYROGENT® Plus Single Test Vials para verificar la ausencia de contaminación.

Para observar la correcta digestión de la proteína, se procede a realizar una electroforesis de las muestras sin digerir, otra de las tratadas con pepsina y por una última de las tratadas con pepsina y tripsina; en gel de acrilamida con SDS al 12% en el equipo electroforesis BIO-RAD PROTEAN® Tetra Cell.

3.3 EXTRACCIÓN, PURIFICACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE RNA

La extracción de RNA celular se realiza mediante el reactivo de lisis, Lysis buffer, tras lo cual se procede al almacenamiento a -80°C hasta la posterior purificación, la cual se lleva a cabo según el kit NucleoSpin® miRNA (Macherey-Nagel).

La cuantificación de RNA se realiza en el equipo Nanodrop 1000 a 280 nm utilizando H₂O como blanco.

3.4 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL (RT-qPCR)

El estudio de la expresión genética se ha realizado en todos los casos mediante la técnica RT-qPCR, en concreto RT-PCR cuantitativa en un solo paso (*one step*), utilizando el kit QuantiTec Probe RT-PCR (Qiagen) y parejas de cebadores y sondas

específicos para cada gen a estudiar, así como del gen endógeno *RPLPO*, disponibles como sondas comerciales Taqman® Gene Expression Assays 20X (*Applied Biosystems*, cat. N° 4351372) según la **Tabla 1**.

Tabla 1: Referencias de las sondas de cada gen utilizado

Genes candidato	Referencia de la sonda	Objetivo
<i>PTPRK</i>	Hs00267788_m1	Expresión para elección del gen candidato, antes y después del tratamiento con gliadina y tras silenciamiento
<i>ICAM-1</i>	Hs00164932_m1	Expresión para elección del gen candidato
<i>THEMIS</i>	Hs01041269_m1	Expresión para elección del gen candidato
<i>MICA</i>	Hs00741286_m1	Expresión para elección del gen candidato
<i>ACTB</i>	Hs99999903_m1	Expresión tras silenciamiento
<i>TJP1</i>	Hs01551861_m1	Expresión tras silenciamiento

La mezcla de reacción utilizada, siendo RNAsa out (20u/ µl) y RNA (25ng/ µl) para todos los casos, es la indicada en la **Tabla 2**.

Tabla 2: Mezcla de reacción para RT-qPCR

	Volumen (µl)
Buffer	5
RNAsa out	0,2
RT	0,1
Gen candidato *	0,5
Gen endógeno (<i>RPLPO</i>)**	0,5
RNA	1

*Marcado con fluoróforo FAM; ** Marcado con fluoróforo VIC

Se realizan un número total de 40 ciclos siguiendo las condiciones indicadas en la **Figura 4**.

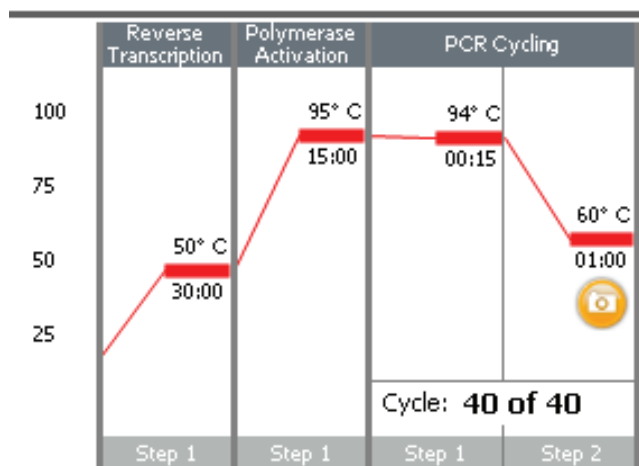


Figura 4: Pantalla de información del equipo ECO Illumina mostrando las condiciones de reacción de RT-qPCR.

El equipo utilizado es *Illumina Eco RT-PCR system* y los ensayos se realizan en placas de 48 pocillos de 0,2ml, por triplicado para cada gen estudiado.

3.5 SILENCIAMIENTO

El silenciamiento del gen *PTPRK* se realiza en células T84 mediante la transfección mediada por lípidos, de un siRNA específico para dicho gen (N002844.12.1, *Integrated DNA Technologies*) y otro como control (AllStars Negative Control siRNA, Qiagen).

Dado que el cultivo celular utilizado es adherente, la transfección se realiza cuando las células están en suspensión (*reverse transfection*) en una placa de 24 pocillos previamente tratada (CORNING). Para dicho proceso, se utiliza un volumen de 1,5 ml de tripsina (Trypsin-EDTA 0,25% solution, SIGMA-ALDRICH®).

El protocolo de silenciamiento se realiza mediante 100µl de Optimem® I Reduced Serum Medium 1X (GIBCO), 1 µl de Lipofectamina™ RNAiMax reverse transfection (Invitrogen™) y 0,75µl (30 µM) de siRNA para un número total de 50.000 células/pocillo.

Tras el mantenimiento durante una noche en el medio previamente descrito pero, sin antibiótico para reducir la toxicidad de la lipofectamina. Una vez realizada la transfección se realiza un cambio de medio añadiendo antibiótico y se mantienen las células durante 48h para que se lleve a cabo silenciamiento del gen a 37°C y 5%CO₂.

3.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La cuantificación de la expresión es una cuantificación relativa a uno o varios genes que se expresan de forma regular en las células, denominados genes endógenos (*RPLPO*).

La relativización se realiza mediante el programa Microsoft Office Excell 2007. Para ello, se normaliza la cantidad o Ct del gen a estudiar respecto del gen endógeno de referencia (ΔCt) y se calcula la cantidad relativa en cada muestra mediante la **Ecuación (1)**.

$$Rt = 2^{-\Delta Ct} \quad (1)$$

El análisis estadístico se realiza con el programa GraphPad InStat mediante un T-test.

4. RESULTADOS

4.1 ELECCIÓN DE LOS GENES A ESTUDIAR

Tras la revisión bibliográfica se han elegido cuatro genes candidato de entre los cuales, tras realizar un estudio de expresión se seleccionará el gen definitivo del que realizar su silenciamiento.

Los genes elegidos son los siguientes:

1) *Intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)*: la posición en el genoma de este gen es 19p13.2. Codifica una glucoproteína de superficie expresada en el endotelio vascular, en células presentadoras de antígenos y linfocitos activados (Lebedeva et al., 2005). Esta proteína actúa como receptor de β -integrinas mejorando la adhesión de los leucocitos al endotelio, lo cual juega un papel esencial en la inflamación (Diamond et al., 1991).

La presencia de gliadina induce un aumento en la expresión de *ICAM-1* en explantes celulares de biopsias (Maiuri et al., 2003) además, se ha observado un aumento de este gen en su forma soluble en el plasma sanguíneo de pacientes celíacos (Jelinkova et al., 2000) y (Merendino, 2003). Este incremento de expresión desemboca en la

unión de leucocitos como NK, monocitos y neutrófilos en el epitelio generando inflamación y lesión (Simon et al., 2000) (Zen y Parkos, 2003).

2) *Thymocyte-expressed molecule involved in selection (THEMIS)*: situado en el cromosoma 6 y expresado en el tejido linfoide. En base a estudios en ratones, se ha observado que codifica para una proteína importante en el desarrollo de células-T (Lesourne, 2009).

La presencia de gliadina, aumenta la expresión de este gen generando la infiltración inflamatoria de la mucosa intestinal (Constanza et al., 2013).

3) *Protein tyrosine phosphatase, receptor type, kappa (PTPRK)*: situado en el cromosoma 6, se encarga del mantenimiento de la unión intercelular (Sap et al., 1994) (Anders et al., 2006) y de la modulación del factor de crecimiento EGFR, inhibiendo la proliferación celular (Xu et al., 2006) (Xu et al., 2010).

En presencia de gliadina, la expresión de este gen disminuye generando un aumento en la permeabilidad que desemboca en una inhibición de la proliferación celular, favoreciendo la hiperproliferación de criptas celulares.

4) *MHC class I chain-related gene A (MICA)*: gen situado en el cromosoma 6 que codifica para una glicoproteína de superficie relacionada con las moléculas de clase I del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (MHC por sus siglas en inglés).

Sin conocer exactamente cuál es el mecanismo de este gen, parece que la presencia de gliadina estimula una sobreexpresión del mismo, en el epitelio de pacientes celíacos (Hue et al., 2004). Su función consiste en unirse con el receptor NKG2D de células TCR γ/δ^+ y NK activando una respuesta citotóxica innata y la producción de citoquinas (Gianfrani et al., 2005) que lleva a la destrucción del epitelio.

4.2 EXTRACCIÓN DE RNA

Tras la realización del silenciamiento, la extracción y purificación del RNA celular, se procede a medir la concentración del RNA extraído y los parámetros de calidad del mismo, los cuales se recogen en la **Tabla 3**.

Tabla 3: Concentración de RNA y parámetros de calidad de la purificación

	[RNA] ($\mu\text{g}/\mu\text{l}$)	Abs 260/280	Abs 260/230
Control <i>PTPRK</i>	42,8	2,11	0,25
siRNA <i>PTPRK</i>	49,7	2,17	0,53

4.3 RT-qPCR

4.3.1 Cuantificación de la expresión de los genes candidato

El estudio de la expresión de los cuatro genes candidato se recoge en las **Tablas 4-6**. Las curvas de amplificación de los experimentos se muestran en el **Anexo I**.

Tabla 4: Expresión relativa del gen *ICAM-1*

<i>ICAM-1</i>			
Tipo celular	<i>ICAM-1</i> Ct*	<i>RPLPO</i> Ct	Rt**
T84	39,550	17,332	1,820E-07
C2BBe1	32,434	17,804	4,052E-05

*Ciclo medio de RT-qPCR en el que aparece expresión del gen; **Rt calculado con la Ecuación (1)

Tabla 5: Expresión relativa del gen *PTPRK*

<i>PTPRK</i>			
Tipo celular	<i>PTPRK</i> Ct*	<i>RPLPO</i> Ct	Rt**
T84	21,659	17,388	5,283E-02
C2BBe1	21,652	17,814	7,217E-02

*Ciclo medio de RT-qPCR en el que aparece expresión del gen; **Rt calculado con la Ecuación (1)

Tabla 6: Expresión relativa del gen *MICA*

<i>MICA</i>			
Tipo celular	<i>MICA</i> Ct*	<i>RPLPO</i> Ct	Rt**
T84	25,926	16,885	1,902E-03
C2BBe1	24,148	17,163	8,059E-03

*Ciclo medio de RT-qPCR en el que aparece expresión del gen; **Rt calculado con la Ecuación (1)

Para el gen *THEMIS* no se observa expresión en ninguno de los dos tipos celulares.

La representación gráfica de la expresión de estos genes se recoge en la **Figura 5**.

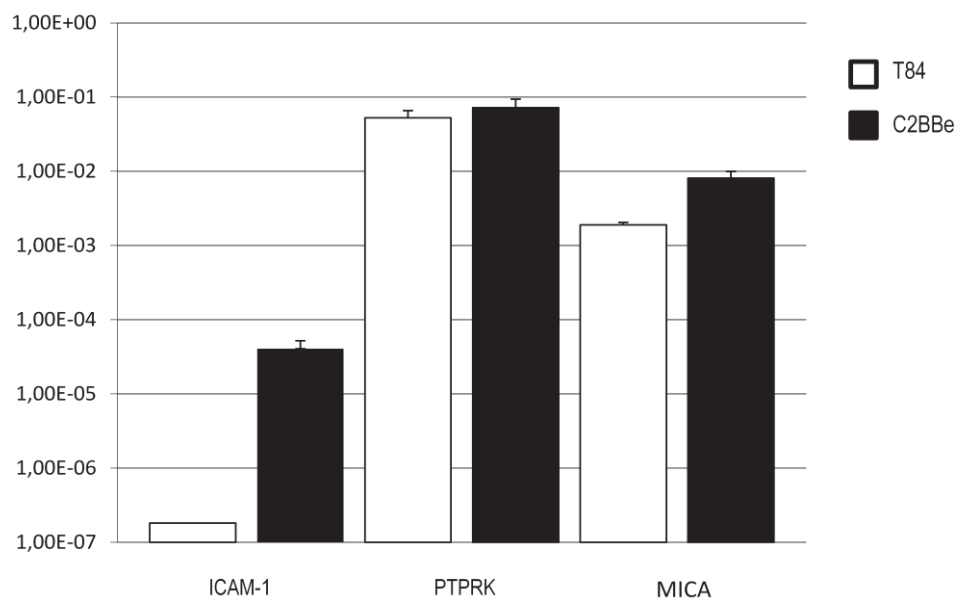


Figura 5: Expresión relativa de los genes candidato.

4.3.2 Estudio de la expresión de *PTPRK* en células tratadas con gliadina

Los resultados de la expresión media del gen *PTPRK*, en relación al gen endógeno, obtenidos para el RNA extraído de los tres cultivos de C2BBE1 tratados con gliadina, se recogen en la **Tabla 7**.

Tabla 7: Expresión del gen *PTPRK* en células tratadas con gliadina

Muestra	Rt**
<i>C-PTPRK</i> *	3,802E-01
<i>BSA-PTPRK</i>	5,056E-01
<i>G-PTPRK</i>	5,338E-01

*Control: células sin tratar con gliadina; ** Obtenido según la Ecuación (1)

Las representaciones gráficas dadas por *Illumina Eco*, que muestran el progreso de la cantidad de cDNA amplificado en función del número de ciclos, se recogen en el **Anexo I**.

La representación de los resultados promedio de la expresión de *PTPRK* recogidos en la **Tabla 7** se observa en la **Figura 6**.

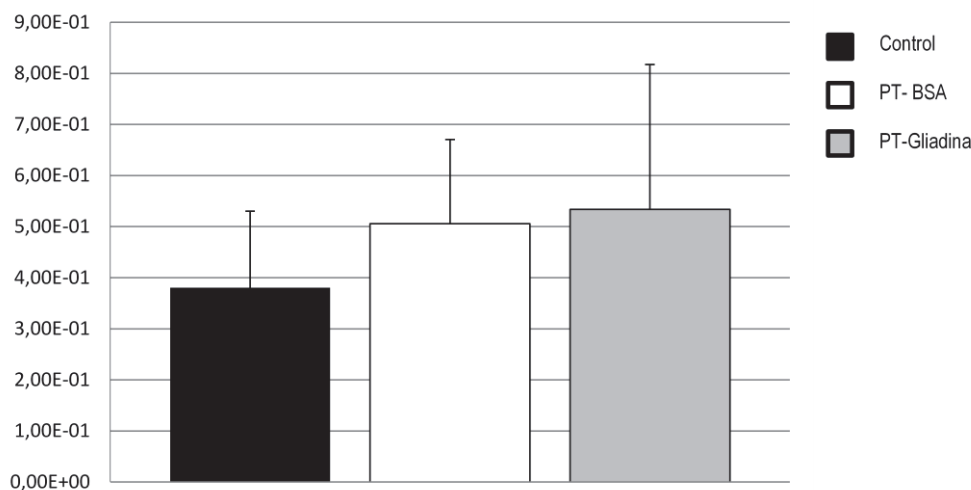


Figura 6 Representación gráfica de la expresión media de *PTPRK* relativa al control en las tres situaciones estudiadas. PT: digerido con pepsina y tripsina.

El resultado estadístico para la variación de la expresión de *PTPRK* es de $P=0,3002$ en células tratadas con BSA y de $P=0,0569$ para las células tratadas con gliadina respecto del control y con un intervalo de confianza del 95% para ambos casos.

4.3.3 Estudio de la expresión de *PTPRK* tras el silenciamiento

Tras la realización del silenciamiento, se procede a la medición de la expresión del gen para comprobar si se ha realizado de forma correcta el protocolo del mismo. Además del gen *PTPRK*, se mide la expresión relativa al endógeno de dos genes que participa en la unión entre células que son *ACTB* y *TJPI*. Las curvas de amplificación de los experimentos se muestran en el **Anexo I**.

Los resultados de expresión obtenidos se recogen en la **Tabla 8-10**.

Tabla 8: Expresión del gen *PTPRK* tras su silenciamiento

Muestra	<i>PTPRK</i>	<i>RPLPO</i>	
	Ct	Ct	Rt*
Control**	24,085	21,694	0,191
Control	24,371	22,677	0,309
Control	24,855	23,078	0,292
siRNA	26,190	22,556	0,081
siRNA	26,669	23,197	0,090
siRNA	26,296	23,053	0,106

*Calculado según la Ecuación (1) ** No silenciado

El resultado estadístico para el gen *PTPRK* para una media de expresión relativa de 0,264 para el control y de 0,092 para el gen silenciado y con una desviación estándar de 0,0641 y 0,0127 respectivamente, es de $P=0,0103$.

Tabla 9: Expresión del gen *ACTB* tras el silenciamiento de *PTPRK*

Muestra	<i>ACTB</i>	<i>RPLPO</i>	
	Ct	Ct	Rt*
Control**	19,966	22,227	4,792
Control	20,368	23,504	8,790
Control	20,609	23,521	7,530
siRNA	19,985	22,432	5,454
siRNA	20,200	24,118	15,123
siRNA	19,966	24,190	18,698

*Calculado según la Ecuación (1) ** No silenciado

El resultado estadístico para el gen *ACTB* para una media de expresión relativa de 7,037 para el control y de 13,092 para el gen silenciado y con una desviación estándar de 2,044 y 6,852 respectivamente, es de $P=0,2163$.

Tabla 10: Expresión del gen *TJP1* tras el silenciamiento de *PTPRK*

Muestra	<i>TJP1</i>	<i>RPLPO</i>	
	Ct	Ct	Rt*
Control**	27,0041	22,4480	0,0425
Control	26,8226	22,6530	0,0556
Control	26,8419	23,0694	0,0732
siRNA	26,9240	22,9871	0,0653

siRNA	27,2099	22,5986	0,0409
siRNA	27,1402	21,1000	0,0152

*Calculado según la Ecuación (1) ** No silenciado

El resultado estadístico para el gen *PTPRK* para una media de expresión relativa de 0,057 para el control y de 0,040 para el gen silenciado y con una desviación estándar de 0,015 y 0,0251 respectivamente, es de $P=0,3709$.

La representación gráfica de los resultados de las **Tablas 8-10** se recoge en la **Figura 7**.

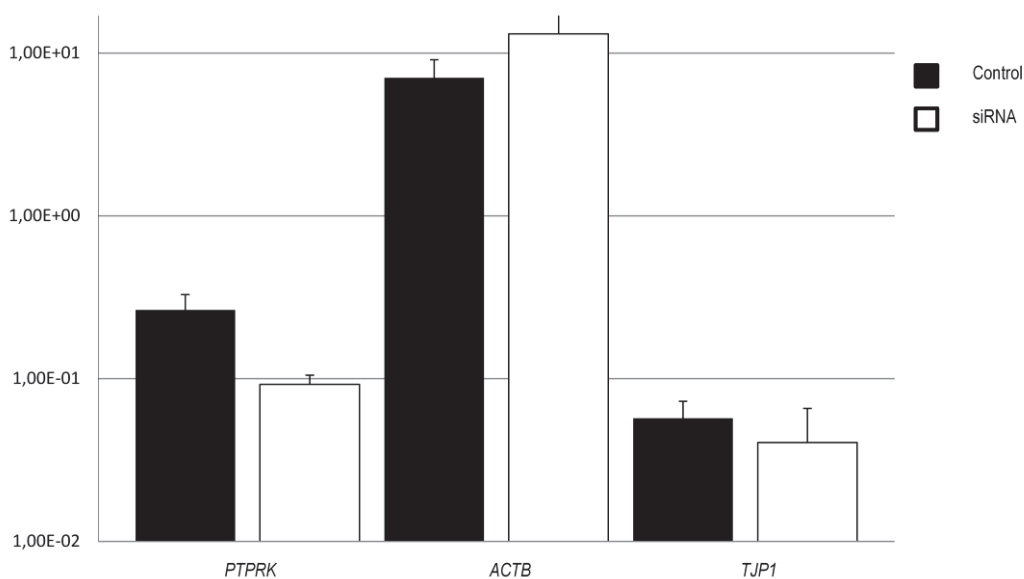


Figura 7: Representación gráfica de la variación de expresión de los genes estudiados en el silenciamiento. Siendo nombradas como control las muestras no sometidas a silenciamiento y siRNA a las muestras tratadas para silenciar.

5. DISCUSIÓN

El estudio de la expresión de los cuatro genes candidato mostrados en las **Tablas 4-6**, coincidiendo con la información posteriormente contrastada en *The Human Protein Atlas*. Como se puede observar el gen *THEMIS*, no presenta expresión y es que este gen no se manifiesta en células de cáncer colorectal. Por su parte, los genes *ICAM-1*, *MICA* y *PTPRK* sí que lo hacen, siendo la expresión de este último destacable. Por esta razón y por su importante función en las uniones intercelulares, *PTPRK* es escogido como gen diana final sobre el que realizar el estudio de expresión en células tratadas con gliadina y del cual se realiza el protocolo de silenciamiento.

Tras el tratamiento de células C2BBE1 con gliadina durante 13 días, los resultados recogidos en la **Tabla 7** muestran cómo, con un intervalo de confianza del 95%, la influencia de la gliadina sobre el gen *PTPRK* no es significativa ($P=0,0569$). Este resultado puede ser debido, a que la línea celular tratada con la proteína es una línea celular tumoral de un adenocarcinoma colorectal y no células de pacientes celíacos, por lo que no muestran sensibilidad hacia dicha molécula, no viéndose afectada por tanto, la expresión del gen en estudio.

Por otra parte, tras la purificación del RNA una vez realizado el protocolo de silenciamiento, se observa según la **Tabla 3** cómo la pureza de dicho ácido nucleico es aceptable ya que una ratio entorno a 2,0, para las absorbancias 260/280, es considerado como bueno y los valores obtenidos tanto para el control como para siRNA se encuentran próximos a él. Sin embargo, el resultado obtenido para las absorbancias 260/230 distan del ideal (2,0 – 2,2) quizá debido a la presencia de contaminantes que absorben a 230 nm.

Los resultados de expresión tras el silenciamiento, recogidos en las **Tablas 8-10** muestra un silenciamiento significativo de *PTPRK* ($P=0,0103$) con un intervalo de confianza del 95%; mientras que para los genes *ACTB* ($P=0,2163$) y *TJP1* ($P=0,3709$) la diferencia de expresión no es significativa.

Hay que tener en cuenta en todos los casos, que los estudios no son paramétricos ya que el número de datos obtenidos y tratados son pocos, por lo que no se puede afirmar con rotundidad ninguno de los resultados obtenidos para los procesos que se han estudiado.

6. CONCLUSIONES

La enfermedad celíaca es una intolerancia permanente al gluten, el cual produce lesiones severas en la mucosa del intestino delgado ocasionando una inadecuada absorción de los nutrientes provocando retraso de crecimiento, diarreas, vómitos etc. Esta enfermedad la padecen personas genéticamente predispuestas y presenta una prevalencia en la población de un 1% siendo su único tratamiento el seguimiento de una estricta dieta libre de gluten durante toda la vida, lo cual es difícil de realizar por

un lado por la dificultad que supone controlarlo en ciertos pacientes, en especial en niños y por otro, por la gran cantidad y variedad de alimentos presentes en el mercado que contienen gluten.

La detección temprana de esta enfermedad es de vital importancia puesto que, si un celíaco continúa ingiriendo gluten, corre un riesgo muy elevado de sufrir enfermedades más graves como cáncer de esófago, de intestino o de padecer linfomas. Es por todo esto que, es una enfermedad sobre la cual es importante investigar para conseguir una detección y diagnóstico a tiempo.

El desarrollo de procesos de silenciamiento de los genes participantes en la celiaquía, en este caso del gen *PTPRK* propuesto por el proyecto ImmunoChip, es vital para el conocimiento de su función e implicación en dicha enfermedad. Además, el desarrollo de mejoras en el protocolo de silenciamiento para este gen, pudiendo servir este trabajo como ejemplo, puede permitir avanzar en el conocimiento acerca del papel de este gen en la Enfermedad Celíaca y realizar avances en lo que a esta patología respecta.

7. BIBLIOGRAFÍA

Anders L., Mertins P., Lammich S. et al. 2006. Furin-, ADAM 10, and gamma-secretasemediated cleavage of a receptor tyrosine phosphatase and regulation of beta-catenin's transcriptional activity. *Mol. Cell. Biol.* 26: 3917–3934.

Bondar C., Plaza-Izurieta L., Fernández-Jiménez N., Irastorza I., Withoff S.,CEGEC, Wijmenga C., Chirido F., Bilbao JR. 2013. *THEMIS* and *PTPRK* in celiac intestinal mucosa: coexpression in disease and after in vitro gliadin challenge. *European Journal of Human Genetics* advances online publication 1-5.

Diamond MS., Staunton DE., Marlin SD., Springer TA. 1991. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of *ICAM-1* (CD54) and its regulation by glycosylation. *Cell* 65:961.

Fernández-Jiménez N., Plaza-Izurieta L., BilbaoJR. 2013. La Enfermedad Celíaca: Marcadores Genéticos, en Rodrigo L y Peñas AS., (Eds). *Enfermedad celíaca y sensibilidad al gluten no celíaca*. Barcelona, España: OmniaScience; 2013. P. 103-121

Fernández-Jiménez N. 2014. Novel Aspects in the genetics of celiac disease: copy number variation, methylation and coregulation in NFκB-Related genes. Universidad Del País Vasco (UPV/EHU), Leioa (Bizkaia).

Gianfrani C., Auricchio S., Troncone R. 2005. Adaptive and innate immune responses in celiac disease. *Immunology Letters* 99:141-145.

Hue S., Mention JJ., Monteiro R., Zang SL., Cellier C., Schmitz J., et al. 2004. A direct role for NKG2D/*MICA* interaction in villous atrophy during celiac disease. *Immunity* 21:367-77.

Jelinkova L., Tuckova L., Sanchez D., Krupickova S., Pozler O., Nevoral J., Kotalova R., Tlaskalova-Hogenova H. 2000. Increased levels of circulating *ICAM-1*, E-selectin, and IL-2 receptors in celiac disease. *Dig. Dis. Sci.* 45:398.

Lebedeva T., Dustin ML., Sykulev Y. 2005. *ICAM-1* co-stimulates target cells to facilitate antigen presentation. *Curr. Opin Immunol* 17:251.

Lesourne R., Uehara S., Lee J. et al. 2009. *Themis*, a new T-cell specific protein important for late thymocyte development. *Nat. Immunol.* 10:840-847.

Merendino RA., Di Pasquale G., Sturniolo GC., Ruello A., Albanese V., Miniciullo PL., Di Mauro S., Gangemi S. 2003. Relationship between IL-18 and *ICAM-1* serum levels in patients affected by coeliac disease: preliminary considerations. *Immunol. Lett.* 85: 257.

Miauri L., Ciacci C., Ricciardelli I., Vacca L., Raia V., Auricchio S., Picard J., Osman M., Quarantino S., Londei M. 2003. Association between innate response to gliadin and activation of pathogenic T cells in coeliac disease. *Lancet* 362:30.

Molina Arias M., Martínez-Ojinaga Nodal E. 2013. Autoinmunidad y Enfermedad Celíaca, en: Ergon C., (Eds). *Enfermedad celíaca presente y futuro*, (Majadahonda) Madrid, España, pp.67-73.

Sap J., Jiang YP., Friedlander D., Grumet M., Schlessinger J. 1994. Receptor tyrosine phosphatase R-PTP-kappa mediates hemophilic binding. *Mol. Cell. Biol.* 14:1-9.

Simon SI., Hu Y., Vestweber D., Smith CW. 2000. Neutrophil tethering on E-selectin activates beta 2 integrin binding to *ICAM-1* through a mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Immunol.* 164:4348.

Sollid LM. 2000. Molecular basis of coeliac disease. *Ann. Rev. Immunol.* 18:53-81.

Trynka G., Hunt KA., Bockett NA., Romanos J. et al. 2011. Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature Genetics* 43(12): 1193–1201.

Xu Y., Shao Y., Voorhees JJ., Fisher GJ. 2006. Oxidative inhibition of receptor type protein tyrosine phosphatase kappa by ultraviolet irradiation activates epidermal growth factor receptor in human keratinocytes. *J. Biol. Chem.* 281: 27389–27397.

Xu Y., Baker D., Quan T., Baldassare JJ., Voorhees JJ., Fisher GJ. 2010. Receptor type protein tyrosine phosphatase-kappa mediates cross-talk between transforming growth factorbeta and epidermal growth factor receptor signaling pathways in human keratinocytes. *Mol. Biol. Cell.* 21: 29–35.

Zen K., Parkos CA. 2003. Leukocyte-epithelial interactions. *Curr. Opin. Cell Biol.* 15:557.

Referencias de Internet

<http://proteinatlas.org/>. Consulta 27 de Enero de 2015.

<http://sylentis.com/index.php/es/mecanismo>. Consulta 13 de junio de 2015

<https://sensibilidadartificial.wordpress.com/2013/05/28/que-es-la-enfermedad-celiaca-y-cual-es-la-importancia-de-su-diagnostico/>. Consulta 13 de junio de 2015.

Anexo I

La representación de los datos crudos de la RT-qPCR de los cuatro genes candidato iniciales, dadas por el programa *ECO Illumina* se recogen en las **Figuras A.1-A.8**.

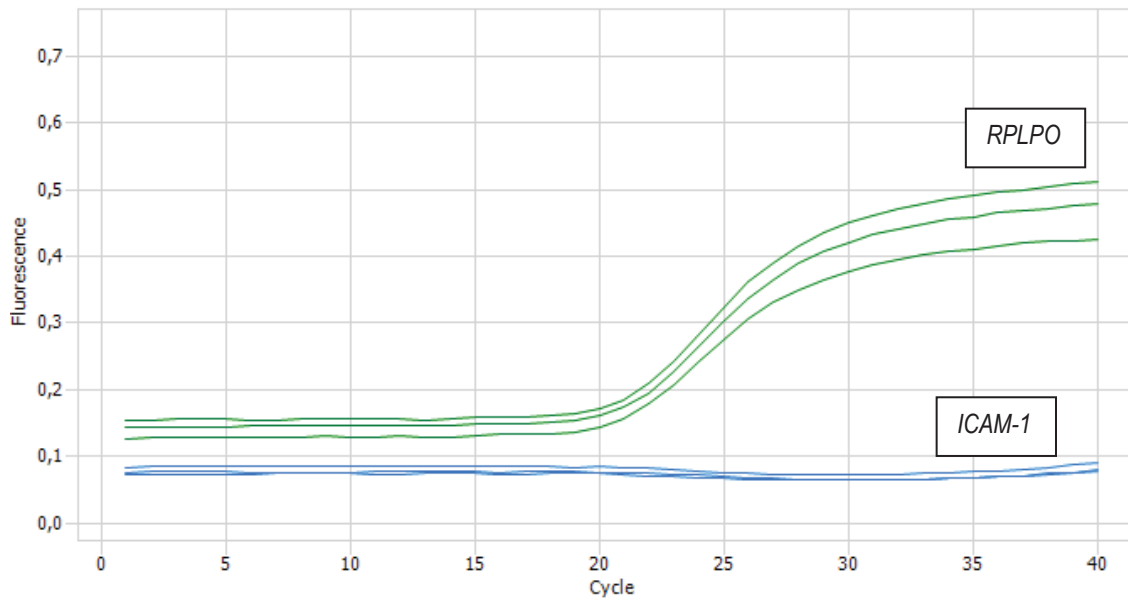


Figura A.1: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *ICAM-1* en células T84.

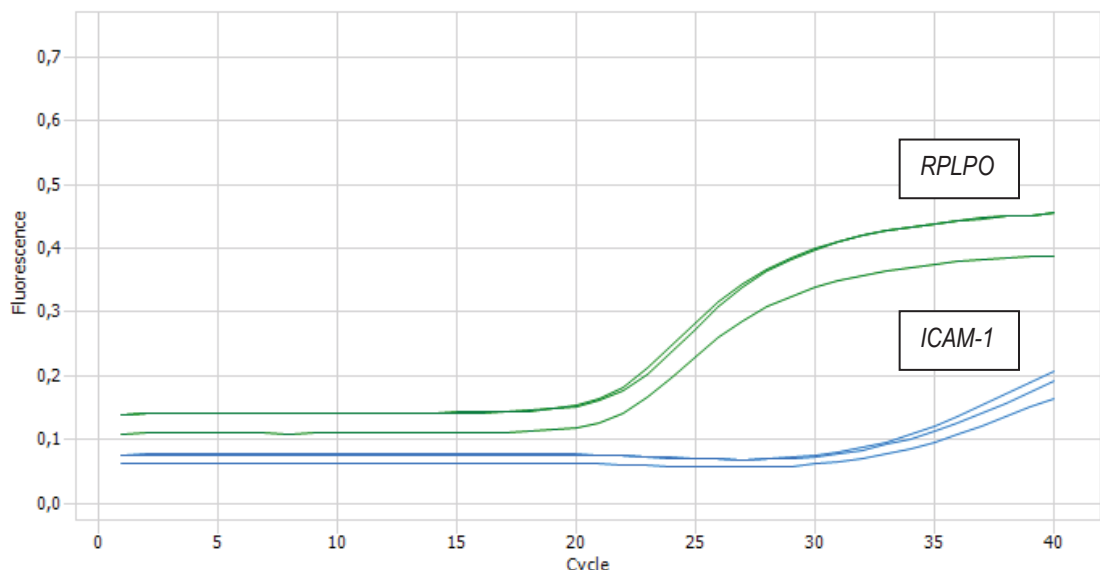


Figura A.2: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *ICAM-1* en células C2BBe1.

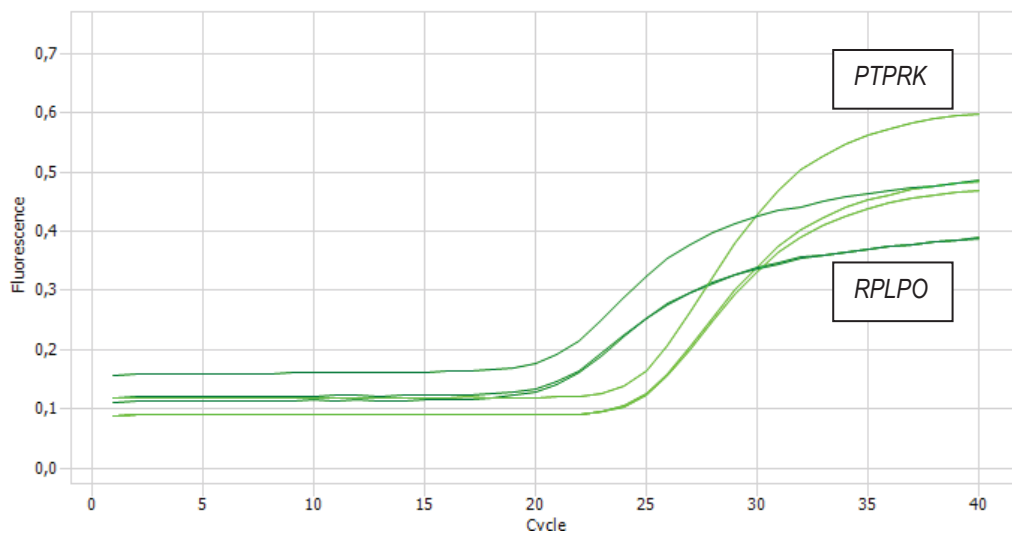


Figura A.3: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *PTPRK* en células T84.

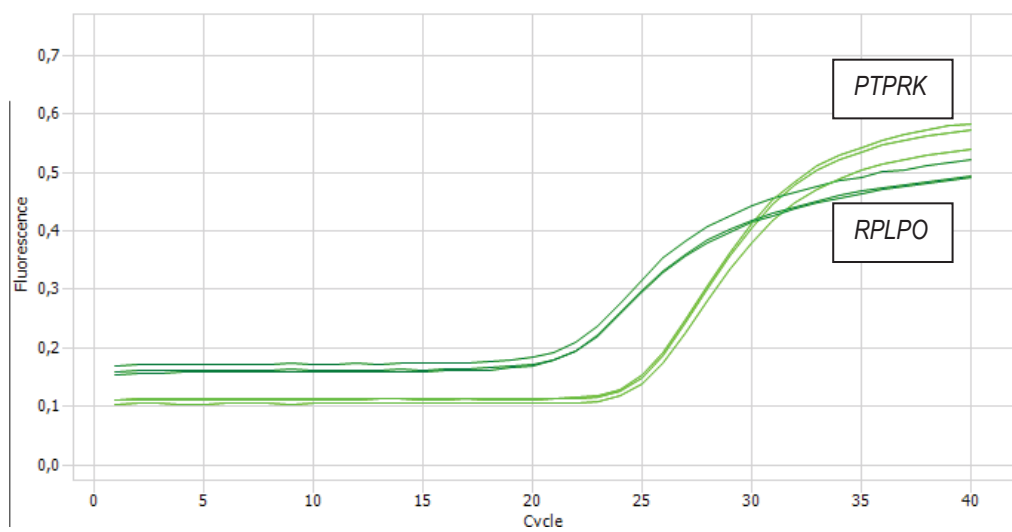


Figura A.4: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *PTPRK* en células C2BBE1.

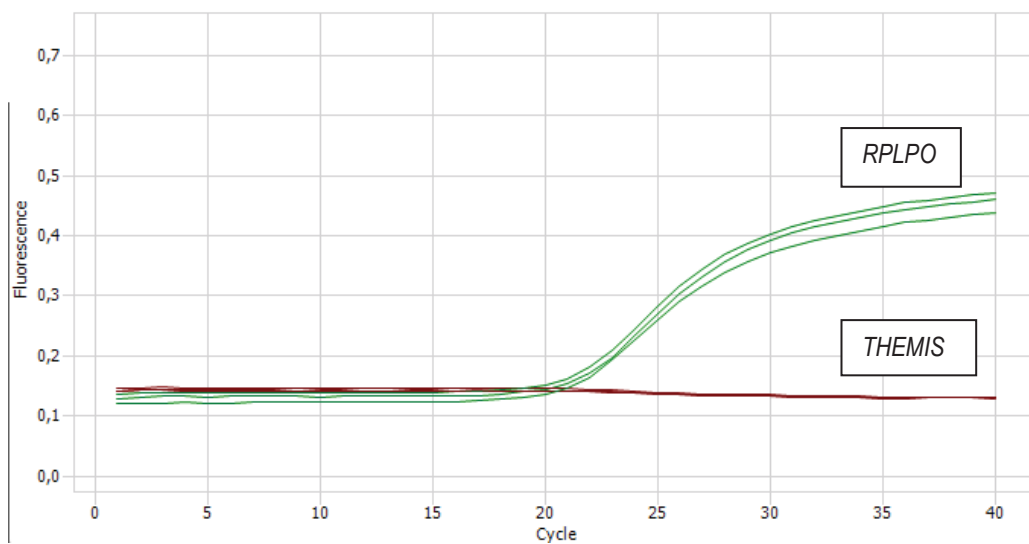


Figura A.5: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *THEMIS* en células T84.

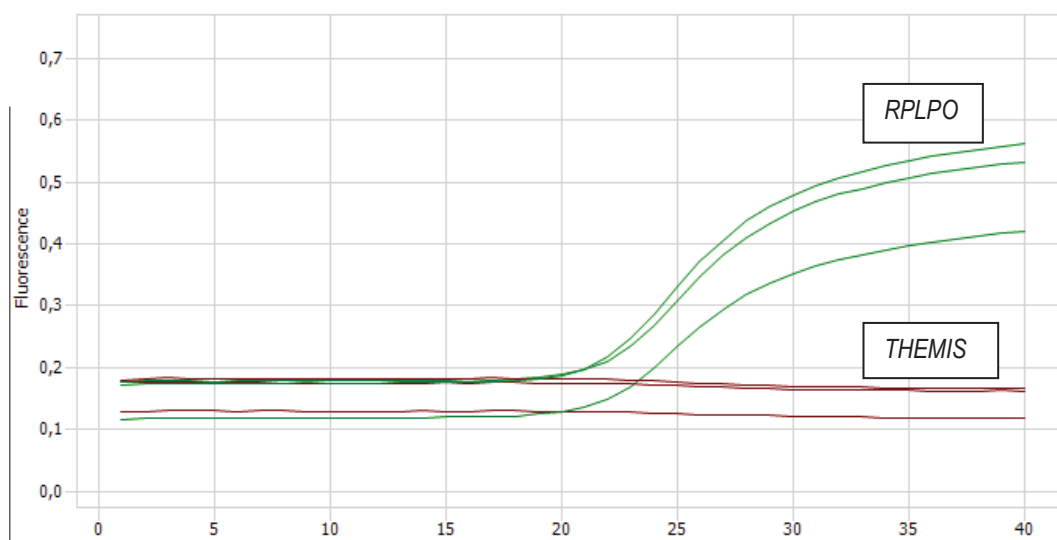


Figura A.6: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *THEMIS* en células C2BBE1.

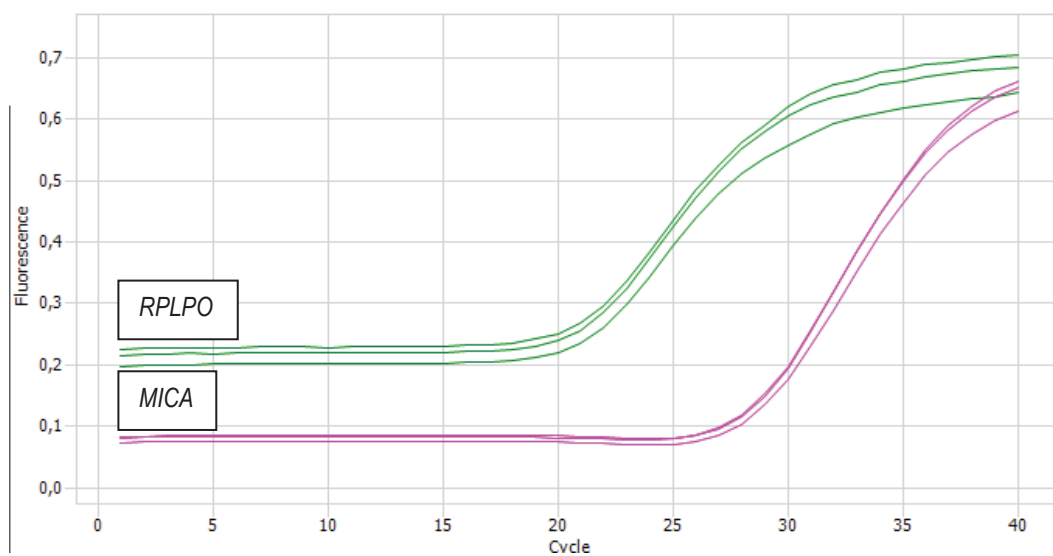


Figura A.7: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *MICA* en células T84

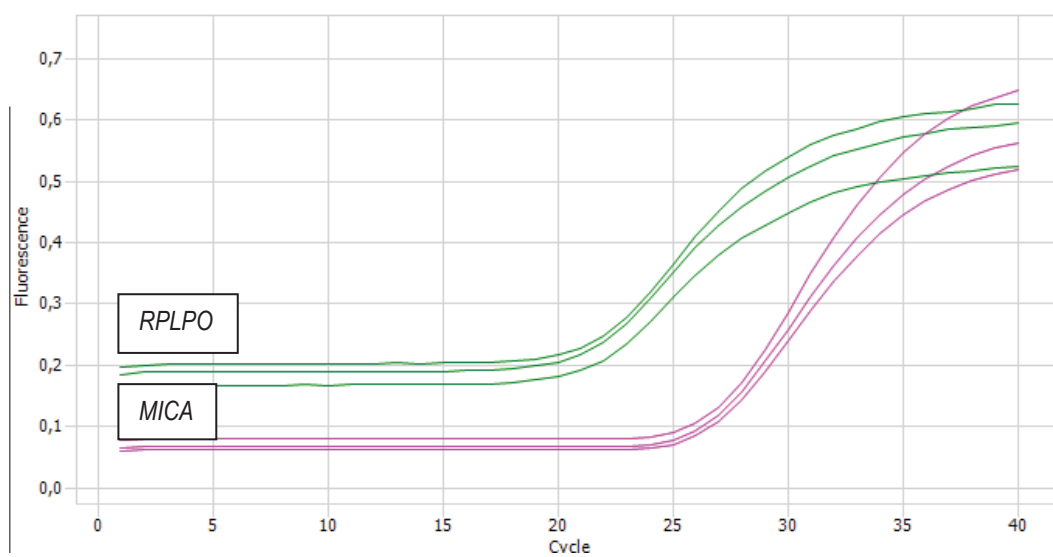


Figura A.8: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen *MICA* en células C2BBE1.

Los resultados crudos en la RT-qPCR de la expresión de PTPRK en el estudio con gliadina se recogen en las **Figuras A.9-A.11**.

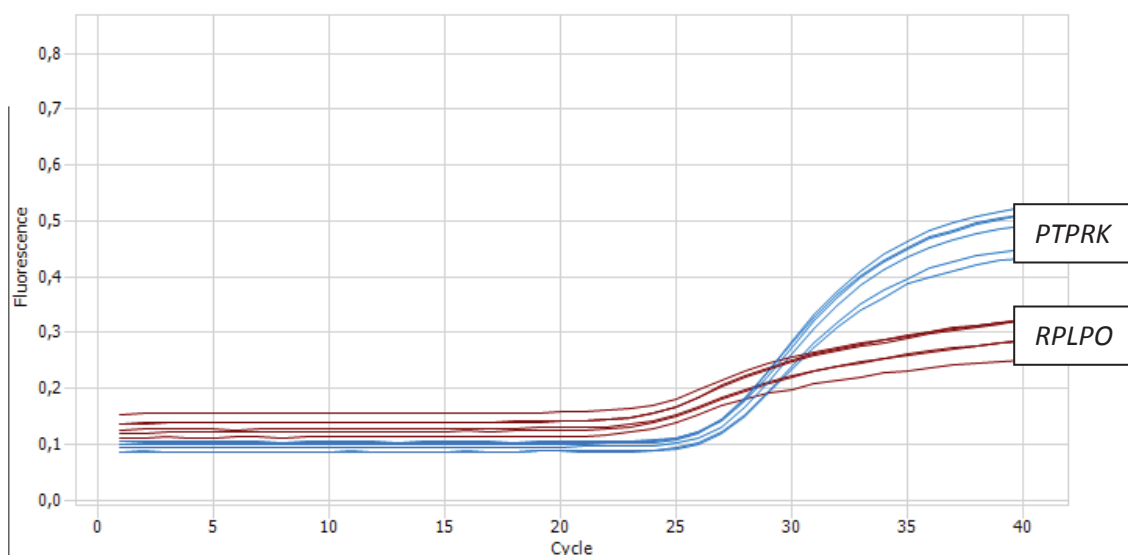


Figura A.9: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para las células SIN TRATAR con gliadina.

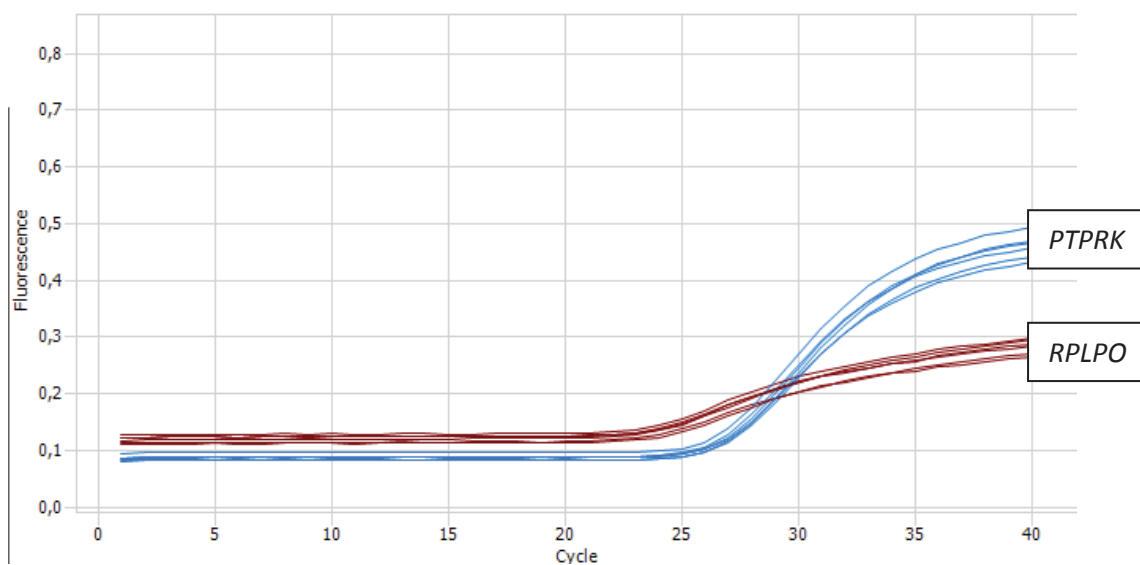


Figura A.10: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para las células TRATADAS CON BSA digerido con tripsina y pepsina.

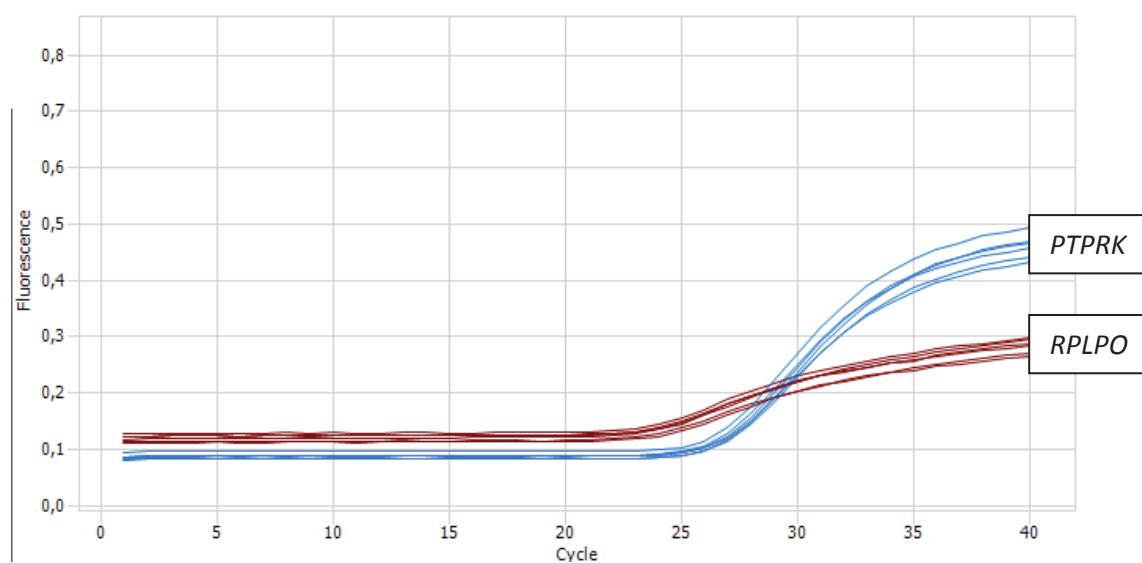


Figura A.11: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para las células TRATADAS CON GLIADINA digerida con tripsina y pepsina.

Los resultados crudos de la expresión de PTPRK dados por *Eco Illumina* tras realizar el proceso de silenciamiento se recogen en las Figuras A.12-A.17.

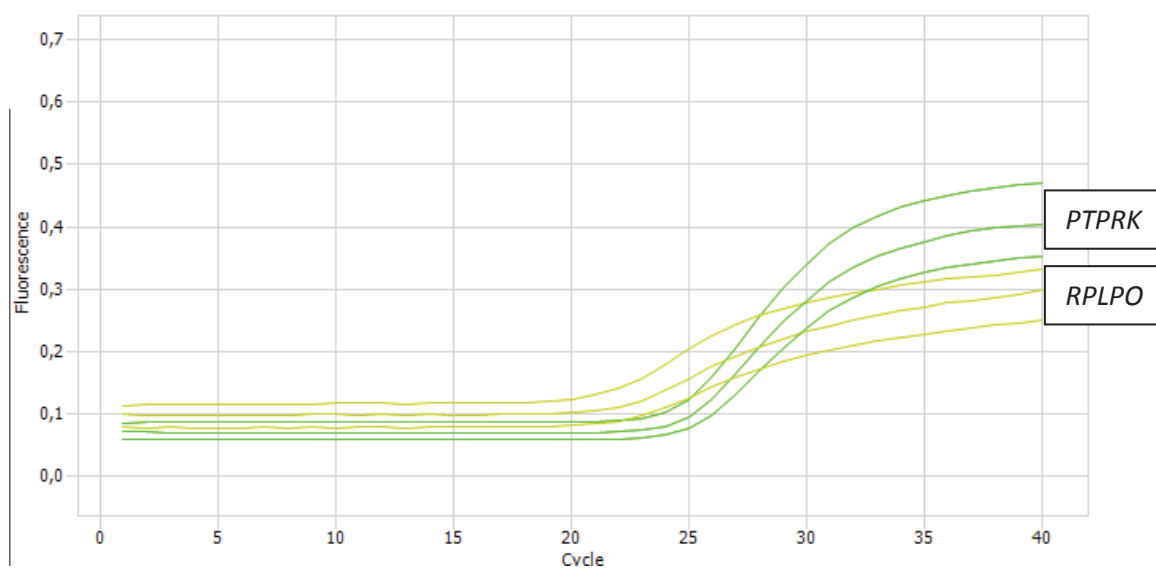


Figura A.12: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen PTPRK sin silenciar.

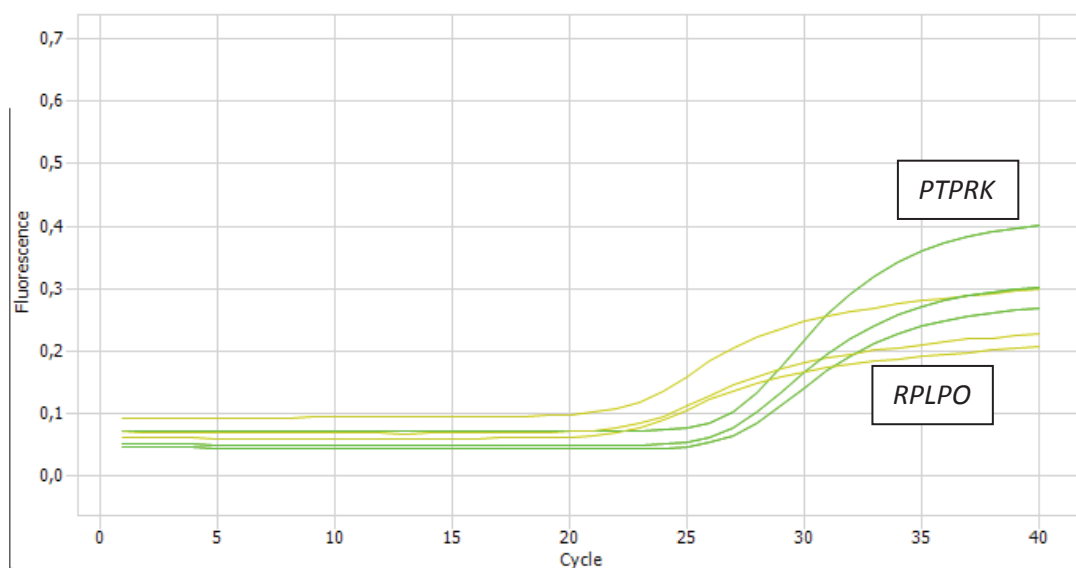


Figura A.13: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen PTPRK tras el silenciamiento.

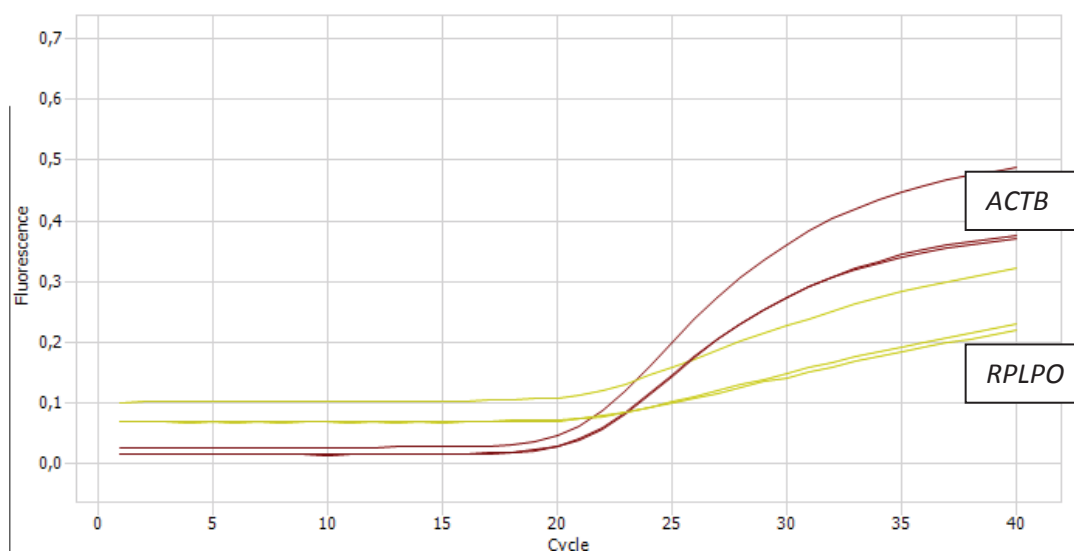


Figura A.14: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen ACTB previo al proceso de silenciamiento de PTPRK.

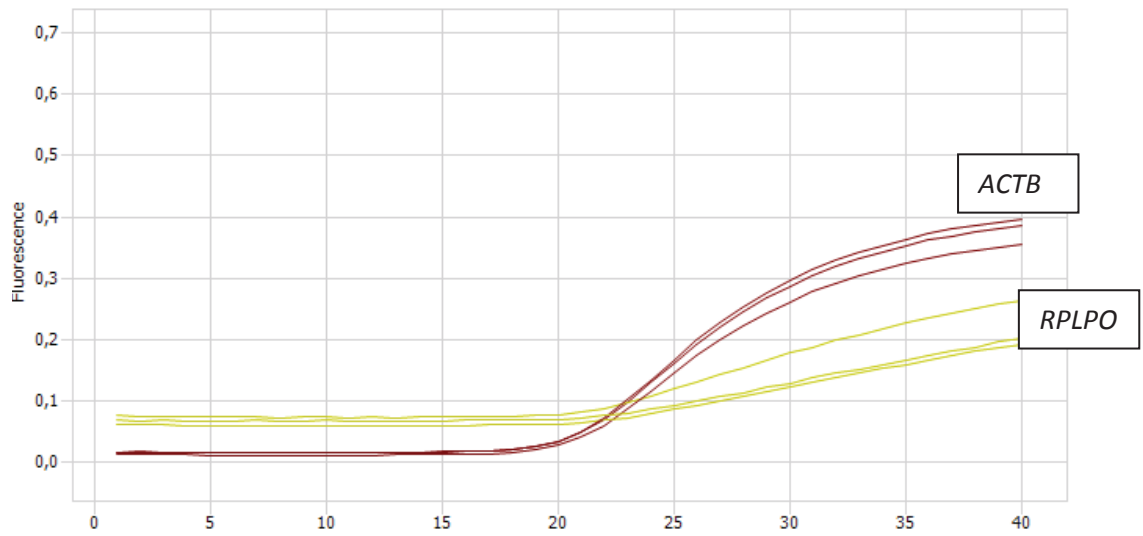


Figura A.15: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen ACTB tras el proceso de silenciamiento de PTPRK.

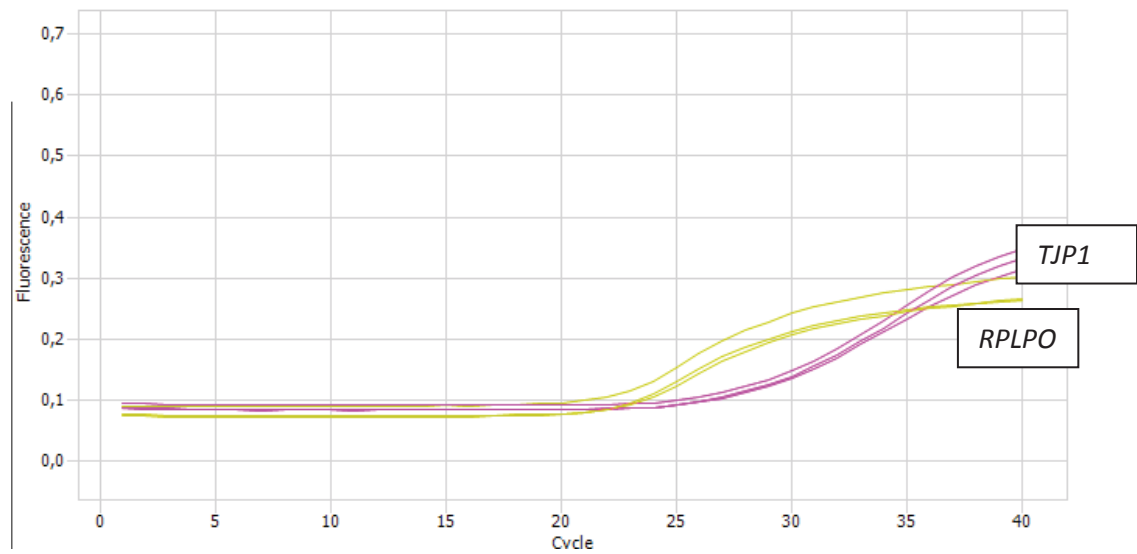


Figura A.16: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen TJP1 previo al proceso de silenciamiento de PTPRK.

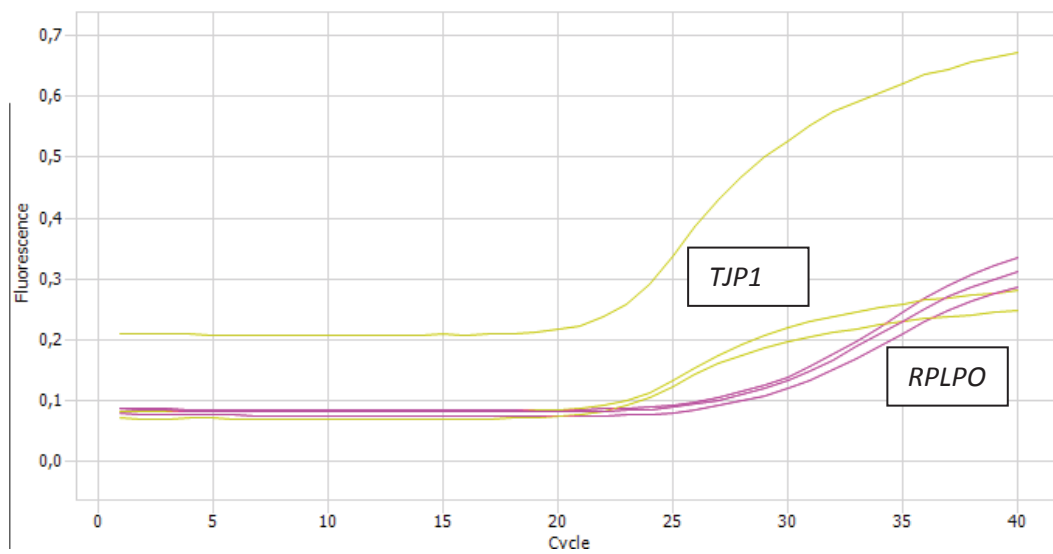


Figura A.17: Representación del progreso de cDNA amplificado en función del número de ciclos para el gen TJP1 tras el proceso de silenciamiento de PTPRK.