

Gradu Amaierako Lana

Biologiako Gradua

Lnc2-aren karakterizazio molekularra giza pankreako beta zeluletan

Egilea:

Amaiur Andres Llarena

Zuzendaria:

Izortze Santin Gomez

Kozuzendaria:

Ainara Castellanos Rubio

AURKIBIDEA

ABSTRACT	2
LABURPENA	3
1. SARRERA	4
2. HELBURUAK	8
3. MATERIALAK ETA METODOAK	9
3.1 Zelulen kultiboa	9
3.2 Tratamenduak eta PICaren transfekzioa	9
3.3 EndoC- β H1 zelulen frakzionamendua	10
3.4 RNA erauzketa eta RT-qPCR	10
3.5 <i>Lnc2</i> gainadierazpen bektorearen transfekzioa	11
3.6 Apoptosiaren neurketa EndoC- β H1 zeluletan	12
3.7 Analisi estatistikoak	12
4. EMAITZAK	12
4.1 <i>Lnc2</i> -ak adierazpen maila baxua du EndoC- β H1 zeluletan beste ehunekin konparatuta.....	12
4.2 Harizpi bikoitzeko RNA birikoak (PIC) eta hantura eragiten duten zitokinek (IL-1 β +IFN γ) <i>Lnc2</i> -aren adierazpena aldatzen dute pankreako beta zeluletan.....	13
4.3 PICak eta zitokinek zitoplasmatik nukleora <i>Lnc2</i> -aren translokazioa eragiten dute.....	14
4.4 <i>Lnc2</i> -aren gainadierazpenak <i>BTNL2</i> genearen adierazpena emendatzen du.	15
4.5 <i>Lnc2</i> -aren gainadierazpenak apoptosis emendatzen du EndoC- β H1 zeluletan.....	16
5. EZTABAIDA	17
6. ESKER ONAK	19
7. BIBLOGRAFIA	20

ABSTRACT

Type I diabetes (T1D) is an autoimmune disease in which due to the destruction of pancreatic beta cells, patients become insulin dependent for life. Both, environmental (e.g. viral infections) and genetic factors, contribute to T1D susceptibility. Accumulating scientific evidence support the implication of viral infections in T1D development. Thus, upon a viral infection in pancreatic beta cells, the immune system is activated, leading to pancreatic beta cell inflammation (insulinitis). Inflammation leads to the activation of several pro-inflammatory and pro-apoptotic pathways in beta cells that ends in pancreatic beta cell destruction.

In recent years, long non coding RNAs have been associated with T1D. Thus, the main objective of the present project was to characterize the function of a T1D-associated lncRNA named *Lnc2* at the pancreatic beta cell level. To this aim, pancreatic beta cells (EndoC- β H1) were exposed to pro-inflammatory cytokines or intracellular synthetic viral double stranded RNA (PIC) to create a pro-inflammatory environment and analyse the expression of *Lnc2*. Besides that, taking into account that *Lnc2* overlaps with *BTNL2* in the human genome, the effect of *Lnc2* on *BTNL2* expression was also studied.

The results showed that both, pro-inflammatory cytokines and PIC, upregulate *Lnc2* expression in beta cells. Moreover, these results revealed that *Lnc2* participates in the regulation of *BTNL2* expression at the pancreatic beta cell level. Finally, the results of this work suggested that *Lnc2* might play a role in pancreatic beta cells apoptosis.

In conclusion, *Lnc2* could be involved in pancreatic beta cell death, probably through the regulation of a gene that plays a role in apoptosis. Furthermore, since *Lnc2* overlaps with *BTNL2* in the human genome and *Lnc2* regulates *BTNL2* expression, the effect of *Lnc2* overexpression in beta cell apoptosis might be driven by *BTNL2*.

LABURPENA

1 motako diabetesa (DM1; *Diabetes Mellitus 1*) gaixotasun autoimmune bat da non, pankreako beta zelulen suntsipenaren ondorioz gaixoak insulina tratamenduarekiko dependente bihurtzen diren. DM1aren garapena faktore genetiko zein ingurune faktoreen (infekzio biralak, besteak beste) menpekoa da. Ebidentzia zientifiko ugari daude birusak eta DM1aren garapena erlazionatzen dituztenak. Hauen arabera, birus batek beta zelulak infektatzean, sistema immunitarioa aktibatzen da, pankreako irlatan hantura eraginez (insulitisa). Hanturak pankreako beta zeluletan zenbait bidezidor pro-inflamatorio eta pro-apoptotiko aktibatuko lituzke, pankreako beta zelulen suntsipena eraginez.

Azken urteetan, RNA luze ez kodetzaileak DM1arekin asoziatu dira eta, lan honetan, DM1arekin asoziatutako polimorfismoa duen lncRNA bat izan da aztergai, *Lnc2* deritzona. Horregatik, Gradu Amaierako Lan honen helburua *Lnc2*-aren karakterizazio molekularra egitea izan da, giza pankreako beta zeluletan bete dezakeen funtzioa aztertzeke asmoz. Horretarako, pankreako beta zelulak (EndoC- β H1) hantura sortzen duten zitokina eta harizpi bikoitzeko RNA birikoarekin (PIC) tratatu dira; beta zeluletan baldintza pro-inflamatorioak sortu eta, *Lnc2*-aren adierazpena aztertzeke. Horretaz gain, giza genomak *Lnc2*-arekin gainjarrita dagoen *BTNL2* genea ere aztertu da, *Lnc2*-ak gene horren adierazpenean izan dezakeen eragina zehaztuz.

Emaitzek adierazi dute *Lnc2*-aren adierazpena igo egiten dela beta zelulak zitokina zein PICarekin tratatzean. Gainera, *Lnc2*-ak nolabait *BTNL2* genearen adierazpena erregulatzen duela ikusi da. Horretaz gain, *Lnc2*-ak DM1ean ematen den pankreako beta zelulen apoptosian parte hartzen duela ikusi da.

Ondorioz, *Lnc2*-ak DM1ean pankreako beta zeluletan ematen den suntsipenean parte hartzen duela esan daiteke, apoptosian parte hartzen duen gene baten erregulazioaren bidez, adibidez. Gainera, genomak *BTNL2*arekin gainjarrita agertzen denez eta *Lnc2*-ak *BTNL2*aren adierazpena erregulatzen duenez, gerta daiteke *Lnc2* geneak beta zelulen apoptosian duen efektua *BTNL2* genearen bitartekoa izatea.

1. SARRERA

1 motako diabetesa (DM1; *Diabetes Mellitus 1*) pankreako beta zelulen heriotzaren ondorioz gertatzen den gaixotasun autoimmunea da. Beta zelulak irla pankreatikoetan kokatzen dira eta intsulina jariatzeaz arduratzen dira. Intsulinak glukosaren erregulazioan parte hartzen du zelulen glukosaren asimilazioan lagunduz; ondorioz, beta zelulen heriotzak hipergluzemia sortzen du gaixoetan, horrek beste hainbat ondorio ekartzen dituelarik (giltzurrun eta ikusmen arazoak, besteak beste). Horrela, DM1 duten indibiduoak intsulina tratamenduarekiko dependente bihurtzen dira haien bizitza osoan zehar, beraz, gaixotasuna kronikoa dela esan daiteke (Kelly et al., 2003). Sintoma ohikoenak poliuria (ohikoa baino gertu bolumen handiagoak kanporatzea), polifagia (ohikoa baino jangura handiagoa izatea) eta polidipsia (ohikoa baino egarri handiagoa izatea) dira. Normalean beta zelulen %90-95-a hiltzen denean detektatzen dira sintomak; hala ere, gaixotasuna beta zelulen bi heren ez funtzionalak izatean diagnostikatzea ere posible da. Haurtzaroan edo gaztaroan agertzen da batik bat, baina, helduaroan ere ager daiteke (Atkinson et al., 2014).

Faktore genetikoen eragin handia dute DM1aren garapenean. Azken urteetan, gaixotasun honekin erlazionaturiko hainbat gene ikertu dira; hala nola, giza antigeno leukozitarioren (*HLA: Human Leukocyte Antigen*) II motako molekulak (Atkinson eta Eisenbarth, 2001). Giza antigeno leukozitarioren geneek gaixotasuna pairatzeko arrisku genetikoen %50a azaltzen duten arren, badaude beste gene kandidato asko irla pankreatikoen inflamazioarekin eta beta zelulen apoptosiarekin erlazionatuta egon daitezkeenak (Santin eta Ezirik, 2013). Hala ere, genetikoki DM1 pairatzeko arriskua duten pertsonen ez dute zertan gaixotasuna pairatu behar; izan ere, ingurumen-faktoreek ere eragin nabarmena dute honen garapenean.

Hortaz, faktore genetikoen gain, ingurumen-faktoreak ere ikertu behar dira. Ingurumen-faktoreen artean infekzio biralak, dieta eta toxinak aipa daitezke, besteak beste (Butalia et al., 2016; Rewers eta Ludvigsson, 2016). Infekzio biralei dagokienez, hainbat ikerketen arabera, birusek beta zelulak infektatu eta erantzun autoimmunea induzi dezakete, beta zelulak apoptosira bideratzen dituzten bidezidorrak aktibatuz. Birus asko izan dira erlazionatuak DM1arekin; haien artean, enterobirusak dira aztertuenak. Yeung et al.-ek (2011) 33 ikerlan ezberdin batzen zituen lan bat egin zuten non, enterobirusaren presentzia DM1aren gaixoetan aztertu zuten. Lan horren arabera, DM1 zuten gaixoetan enterobirusak eraginiko infekzioaren aztarnak zeuden. Izan ere, Richardson et al.-en (2009) ikerlanean adibidez, immunodetekzioaren bidez enterobirusaren aztarnak aurkitu zituzten

DM1 pairatzen zuten indibiduo gehien irla pankreatikoetan. Bestalde, Krogvold et al.-ek (2015) DiViD (*Diabetes Virus Detection study*) deituriko proiektuan, DM1 zuten gaixoen gehiengoetan pankreako irlatan enterobirusarekiko espezifikoak ziren RNA sekuentziak eta kapsidearen VP1 proteina antzeman zituzten.

Horretaz gain, beta zelulen defizientzia gaixo askoren bizitzaren lehen urtean zehar hasten denez, eta, dieta umeek jasaten duten ingurumen faktore determinatzailea denez, bi horien arteko erlazioa aztertu izan da. Nahiz eta ez den erlazio eztabaiaezinik aurkitu elikagai zehatz baten eta gaixotasunaren artean, badaude dietak DM1aren garapenean eragina izan dezakela babesten duten ikerketak (Knip et al., 2010). Adibidez, eradoskitzeak funtzio babesgarria izan dezake, propietate antimikrobianoak eta antiinflamatorioak baititu eta Borch-Johnsen et al.-en arabera (1984), gaixotasunarekiko genetikoki sentikorak diren jaioberrien edoskitze eskasak beta zelulen infekzioa sustatu dezake. Edoskitzea onuragarria izan daitekeen bitartean, jaioberrietan behi esnea kaltegarria izan daitekela proposatu zuten Vaarala et al.-ek (2008). Behi esnea goizegi erabiltzen hasteak, mukosaren inflamazioa sustatu dezake eta hortaz, hestearen iragazkortasuna handitu. Horrek hestean zeharreko elikagaien antigenoen iragazkortasuna emendatzen du ere, prozesu autoimmuneak estimulatuz eta irla pankreatikoen inflamazioa sustatuz, azkenik beta zelulen heriotza ekarriko duelarik (Vaarala et al., 2008).

Ingurune faktoreen inplikazioen inguruan eztabaida dagoen arren, birusen inplikazioaren aldeko ebidentzia zientifikoak ugariak dira. Horrela, DM1ean ematen den beta zelulen suntsipena, genetikoki suszeptiblea den pertsona batek beta zeluletan infekzio biral bat pairatzearen ondorioa litzateke. Birus batek giza pankreako beta zelulak infektatzean, immune sistemako zelulak irla pankreatikoetan sartu eta zitokinak askatzen dituzte, IL1 β eta IFN γ batik bat. Horrek hantura sortzen du irla pankreatikoetan, insulitisa deritzona (Eizirik et al., 2009). Ondoren, jariatuak izan diren zitokinek beta zeluletan bidezidor pro-inflamatorio eta pro-apoptotikoak aktibatzen dituzte, beta zelulen suntsipena ematen delarik.

Faktore genetikoekin bueltatuz, azken urteetan ikerketa ezberdinek RNA luze ez kodetzaileak (LncRNA; *long non-coding RNA*) gaixotasun autoimmuneekin eta lan honetan aztergai den gaixotasunarekin asoziatu dira (Mirza et al., 2017; Wu et al., 2015). LncRNA-k proteina funtzionalik kodetzen ez duten 200 nukleotido edo gehiagoko transkriptoak dira (Ponting et al.,

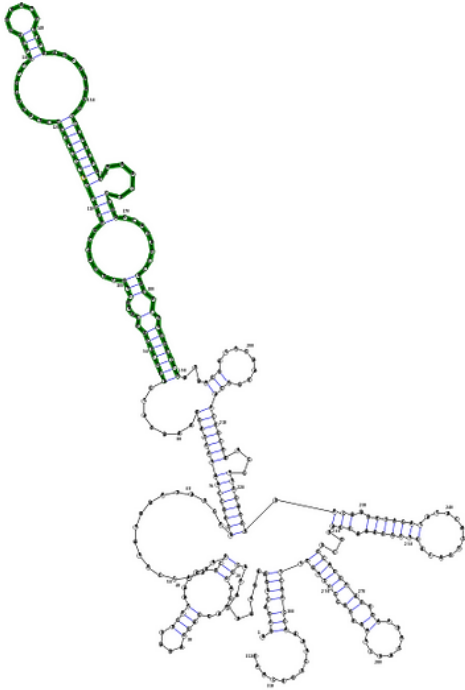
2009). Ikerketa ezberdinen arabera, autoimmunitatearekin eta gaixotasun autoimmuneekin erlazioa izan dezakete; gainera, interesgarria izan daiteke haien funtzioak ezagutzea gaixotasun autoimmuneen tratamendua bilatzeko orduan. Izan ere, lncRNA-en karakterizazio funtzionala egiteak, gaixotasun autoimmuneen garapena nola ematen den ulertzen lagunduko du (Wu et al., 2015). Horretaz gain, ikusi da zenbait ehunetan lncRNA-en adierazpena aldatzen dela inflamazioa eragiten duten zitokinen edo infekzio biralen presentzian (Marques-Rocha et al., 2015; Zhang eta Jeang, 2013). Beraz, DM1arekin erlazionatuta egon daitezkeen lncRNA-en karakterizazio funtzionala egitea interesgarria izan daiteke gaixotasunaren patogenesisian eduki dezaketen eragina aztertzeko. Adibidez, Gonzalez-Moro et al.-ek (2020) egindako ikerketan, *Lnc13*-ak DM1ean zuen eragina aztertu zuten. Ikusi zuten, giza pankreako beta zeluletan infekzio birala simulatzean (harizpi bikoitzeko RNA biriko sintetiko baten bidez), *Lnc13*-ren adierazpena emendatzen zela eta, aldi berean, *Lnc13*-ren gainadierazpenak STAT1en bidezidor pro-inflamatorioaren aktibazioa emendatzen zuela. Hortaz, pentsa daiteke *Lnc13*-ak STAT1ek beta zeluletan sortzen duen inflamazioaren sorreran parte hartzen duela.

Lan honetan aztergai izan den *Lnc2*-a aukeratzeko, hainbat pausu jarraitu ziren. Lehenengo, DM1arekin asoziatutako nukleotido bakarreko polimorfismoak (SNP; *single nucleotide polymorphism*) bilatu ziren, ondoren lncRNA-en datu baseetan bilatuz, SNP horiek lncRNA-tan kokatuta zeuden aztertu zen. LncRNA asko zeudenez, exoietan zeuden SNPak aukeratu ziren, eta azkenik, lncRNA-ren bigarren mailako egituran eragina zuten SNPak kontuan izanda, 10 lncRNA aukeratu ziren. LncRNA horien artean, lan honetan *Lnc2* deituko dugun lncRNA dago (NONCODE datu basean, NONHSAT251041.1 bezala izendatuta dagoena).

Esan bezala, *Lnc2*-ak DM1arekin asoziatutako polimorfismo bat du (rs1980493). Polimorfismo horrek, *Lnc2*-aren bigarren mailako egituran eragiten du. Hortaz, bi alelo ditu: DM1arekiko babeslea den aleloa (1a. irudia) eta DM1 garatzeko arriskua ematen duen aleloa (1b. irudia).

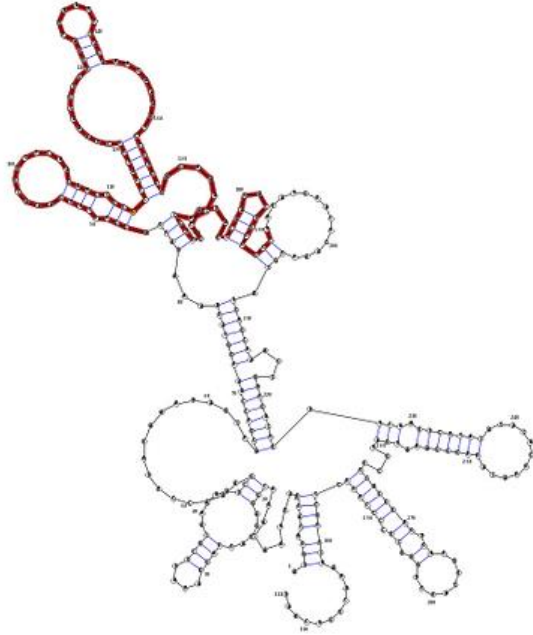
a

The optimal secondary structure of global wild-type sequence (1-313)*:
minimum free energy = -78.40 kcal/mol



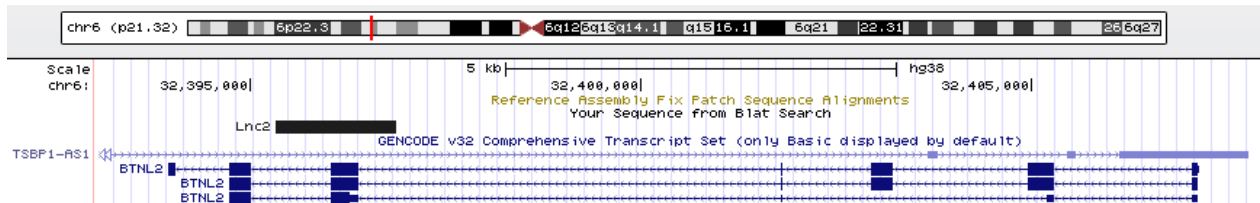
b

The optimal secondary structure of global mutant sequence (1-313)*:
minimum free energy = -77.40 kcal/mol



1. Irudia. *Lnc2*-aren bigarren mailako egitura. *a*: *Lnc2*-aren bigarren mailako egitura, rs1980493 polimorfismoan DM1arekiko babeslea den aleloa duenean. *b*: *Lnc2*-aren bigarren mailako egitura, rs1980493 polimorfismoan DM1 garatzeko arriskuarekin asoziatutako aleloa duenean. Irudia RHTtik (*Center for non-coding RNA in Technology and Health*) atera da.

Lnc2-aren kokapenari dagokionez, seigarren kromosoman aurkitzen da eta 1541 base pare ditu (chr6:32,395,326-32,396,867). 2. irudian ikusten den bezala, *Lnc2*-aren sekuentzia *BTNL2* gene kodetzailearen sekuentziarekin gainjarrita dago.



2. Irudia. *Lnc2* eta *BTNL2*ren kokapena genoman. *Lnc2*-aren sekuentzia (beltzez) *BTNL2* genearen isoforma ezberdinen sekuentziarekin (urdinez) gainjarrita dago. Irudia *UCSC Genome Browser*-etik (hg19) atera da.

LncRNA-en funtzio nagusietariko bat, geneen adierazpena kontrolatzea da, eta gainera, ohikoena *cis*-en kokatuak dauden geneen adierazpena kontrolatzea da. Horregatik, lan honetan *Lnc2*-aren karakterizazio funtzionala egiterakoan, *BTNL2* (*Butyrophilin Like 2*) genearen adierazpenean eduki dezakeen efektua aztertu zen. *BTNL2* geneak immune sistemarekin eta histokonpatibilitate konplexu nagusiarekin erlazionatuta dagoen proteina bat kodetzen du. Proteina hori T zelulen proliferazioa inhibitzeaz arduratzen dela ikusi da (Nguyen et al., 2006), baina pankreako beta zeluletan eduki dezakeen funtzioa ezezaguna da momentuz.

Aipatutako guztiagatik, lan honetan *Lnc2*-aren karakterizazio molekularra burutu da giza pankreako beta zeluletan.

2. HELBURUAK

Lan honen helburu nagusia *Lnc2*-aren karakterizazioa burutzea izan da, giza pankreako beta zeluletan izan dezakeen funtzioa, eta beraz, 1 motako diabetesean izan dezakeen eragina aztertzeke asmoz.

Horretarako, honako helburu estrategikoak zehaztu dira:

1. Pankreako beta zelulak zitokina (IL-1 β +IFN γ) eta harizpi bikoitzeko RNA birikoarekin (PIC) tratatzean, *Lnc2*-aren adierazpena aztertzea.
2. *Lnc2*-aren gainadierazpenaren bitartez, *Lnc2*-ak *BTNL2* gene kodetzailearen adierazpenean izan dezakeen eragina aztertzea.
3. *Lnc2*-aren gainadierazpenaren bitartez, *Lnc2*-ak pankreako beta zelulen apoptosian izan dezakeen inplikazioa aztertzea.

3. MATERIALAK ETA METODOAK

3.1 Zelulen kultiboa

EndoC- β H1, giza pankreako beta zelulen lerroaren kultiboa, 2 μ g/mL fibronektina eta %1 ECMrekin (*extracellular matrix*; matrize estrazelularra) tratatutako botila eta plaketan egin zen. EndoC- β H1 zelulak hurrengo osagaiekin aberastutako DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) medioan mantendu ziren: %2 BSA (*Bovine Serum Albumin*), 10 mM nikotinamida, 100 U/mL penizilina, 100 μ g/mL estreptomizina, 50 μ M β -2-merkaptotanol, 5.5 μ g/mL transferrina eta 6.7 ng/mL sodio selenitoa (Sigma-Aldrich). Transfekzio-esperimentuetarako medio berdina erabili zen baina %2 FBSrekin (*Fetal Bovine Serum*) eta antibiotikorik gabe.

3.2 Tratamenduak eta PICaren transfekzioa

Zelulak interleukina 1 β -rekin (IL-1 β ; 50 U/mL; R&D Systems) eta interferon γ -rekin (IFN γ ; 1000 unitate/mL; R&D Systems) tratatu ziren 48 orduz. Horretarako, zelulak 24 putzuetako plaketan erein ziren, putzu bakoitzean 250.000 zelula jarri zirelarik. Kontrol gisa erabiltzeko, putzu bat tratatu gabe utzi zen.

PICaren (*Polyinosinic:polycytidylic acid*) transfekzioa egiteko lipofekzioa erabili zen, hurrengo pausuak jarraituz:

1. Lipofectamine 2000 (1 μ L) (Invitrogen) eta Optimem medioa (50 μ L; GIBCO) nahastu eta 5 minutuz inkubatu zen.
2. PIC (0.75 μ L, 1 μ g/mL) (Invivogen) eta Optimem (50 μ L) nahastu eta 5 minutuz inkubatu zen.
3. Inkubazioaren ondoren, aurreko bi nahasteak elkartu (1:1 bolumenean) eta 20 minutuz inkubatu ziren.
4. Inkubazio denbora pasatzean, 400 μ L transfekzio-medio gehitu zitzaion nahasteari.
5. Transfekzio-nahastea 24 putzuetako plakan kultibatuta zeuden zelulei bota zitzaien. Putzu bateko zelulak ez ziren PICarekin transfektatu, kontrol gisa erabiltzeko.

PIC gabeko kontrolerako prozesu berdina jarraitu zen, baina PICaren ordez, Optimem medioa jarrita.

3.3 EndoC- β H1 zelulen frakzionamendua

Zelulen frakzioen banaketa egiteko, 60 mm-tako kultibo plaka batean 2 milioi beta zelula jarri ziren. Laburki, lehendabizi plakatik medioa kendu eta PBSrekin (*Phosphate-Buffered Saline*) garbitu zen. Ondoren, zelulak PBSan bersuspenditu ziren eta 1.5 mL-tako bi tutuetan banatu ziren, batetik frakzio nuklearra erauzteko eta bestetik zelulen erauzkin osoa. Bi tutuak zentrifugatu (1500 g, 5') eta gero, frakzio nuklearra erauzteko zelulak ondoko nahasketan bersuspenditu ziren: ur destilatua (600 μ L), PBS (200 μ L) eta C1 bufferra (200 μ L: .28 M sakarosa, 40 mM Tris-HCl pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 4% Triton X-100). Ondoren, izotzean 15 minutuz inkubatu ziren eta azkenik, zentrifugatu ziren (2500g 15'). Zentrifugazioa eta gero, gainjalkina kendu zen eta pelleta (frakzio nuklearra) β -2-merkaptetanola (3'5 μ L) zuen RA1 erauzketa bufferrean (350 μ L) bersuspenditu zen. Zelulen erauzkin osoa erauzteko, zuzenean RA1 bufferra eta β -2-merkaptetanola gehitu zen tutuan. Bi kasuetan, RNAREN erauzketa NucleoSpin RNA Kit-a (Macherey Nagel, Düren Germany) erabiliz egin zen.

3.4 RNA erauzketa eta RT-qPCR

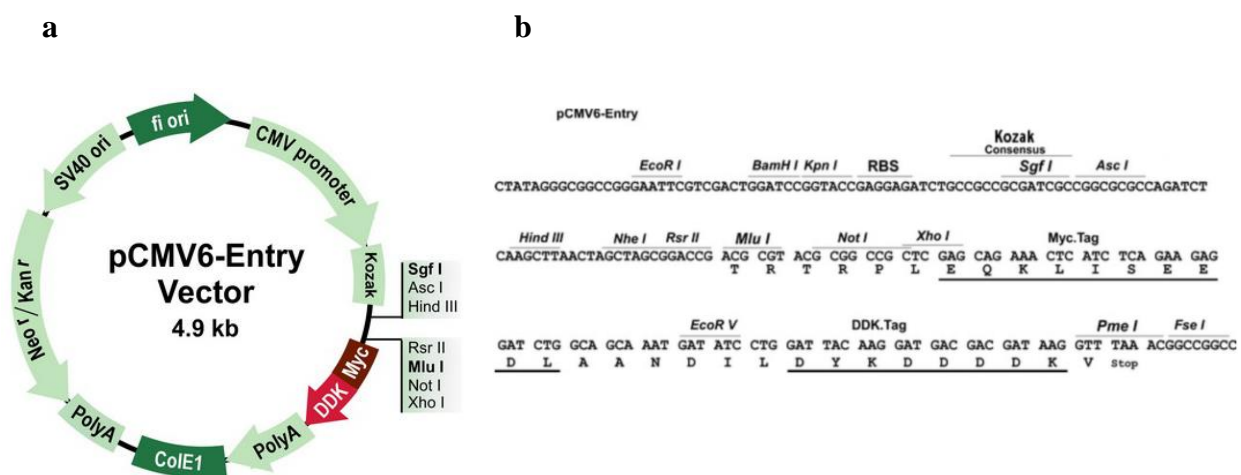
RNA EndoC- β H1 zeluletatik erauzi zen NucleoSpin RNA Kit-a (Macherey Nagel, Düren Germany) erabiliz. Erauzitako RNA, gene ezberdinen kuantifikazioa egiteko erabili zen RT-qPCR bidez, Sybr green metodoa erabilita (iQ SYBR Green Supermix, Bio-Rad). Intereseko geneen adierazpena neurtzeko, ondoko hasleak erabili ziren: *Lnc2* (F, 5'-CAATGGCATCTGCTAACCTTGG-3'; R, 5'-TGACAGTTTTGGCAGGGACAG-3'); *BTNL2* (F, 5'-TTTGGGCGAGGAGAAAATCG-3'; R, 5'-AGCAATCCCCAAACAAGCAG-3'); *HPRT* (F, 5'-ACCAGTCAACAGGGGACATAA-3'; R, 5'-CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC-3'); *RPLP0* (F, 5'-GCAGCATCTACAACCCTGAAG-3'; R, 5'-CACTGGCAACATTGCGGAC-3'); *Malat1* (F, 5'-GCTGTGGAGTTCTTAAATATCAACC-3'; R, 5'-TTCTCAATCCTGAAATCCCCTA-3').

EndoC- β H1 zeluletat gain, *Lnc2*-aren adierazpena beste 13 ehun ezberdinen RNA laginetan aztertu zen: timoa, kolona, birika, hestea, barea, garuna, urdaila, muskulua, gibela, giltzurruna, bihotza, plazenta (Human total RNA master panel II, Clontech) eta irla pankreatikoak (Tebu-bio).

qPCR-ak *Eco Illumina Real Time PCR* (BIO-RAD) aparatuan egin ziren, honako programa erabiliz: 95°C 30', 45 x (95°C 15', 60°C 1'), disoziazio kurba (baldintza lehenetsiak).

3.5 *Lnc2* gainadierazpen bektorearen transfekzioa

Lnc2-aren gainadierazpena egiteko aurretik laborategian sortutako gainadierazpen bektorea erabili zen. Laburki, *Lnc2*-a giza gibelaren cDNA-tik anplifikatu zen KpnI eta FseI errestrikzio lekuak zituzten hasleak erabiliz (F, 5'-GCCGCGTAC*CATGGACAGGATTAACATACGGAGT-3'; R, 5'-TAATAGGCCGG*CCGCTGGGATTACAGGCACCC-3'). Anplikoia pCMV6 bektore modifikatua klonatu zen (Origene, Rockville, MA, USA, Cat# PS100001) KpnI eta FseI errestrikzio entzimak erabiliz (3. irudia). Klonazioa ongi burutu zela ziurtatzeko, plasmidoak sekuentziatzera bidali ziren.



3. Irudia. a: *Lnc2*-aren gainadierazpen plasmidoa (pLnc2) sortzeko erabilitako bektorea. Bektore hau aldeztu aurretik modifikatua zegoen, Myc eta DDK etiketak kenduta zeudelarik. b: pCMV6 bektorean dauden KpnI eta FseI errestrikzio entzimen ituen sekuentziak.

Lnc2-aren gainadierazpena egiteko, 24 putzuetako plaketan 250.000 zelula jarri ziren putzu bakoitzean. *Lnc2*-aren gainadierazpen bektorearen transfekzioa egiteko lipofekzioa erabili zen, hurrengo pausuak jarraituz:

1. Lipofectamine 2000 (1 µL) eta Optimem media (50 µL) nahastu eta 5 minutuz inkubatu zen.
2. *Lnc2*-aren gainadierazpen bektorea (250ng putzu bakoitzeko) eta Optimem (50 µL) nahastu eta 5 minutuz inkubatu zen.
3. Inkubazioaren ondoren, aurreko bi nahasteak elkartu (1:1 bolumenean) eta 20 minutuz inkubatu ziren.
4. Inkubazio denbora pasatzean, 400 µL transfekzio-medio gehitu zitzaion nahasteari.

5. Transfekzio-nahastea 24 putzuetako plakan kultibatuta zeuden zelulei bota zitzaien.

Kontrol gisa, pCMV6 bektore hutsa erabili zen. Honen transfekzioa egiteko transfekzio protokolo berdina erabili zen.

3.6 Apoptosiaren neurketa EndoC- β H1 zeluletan

Plaketatik gainjalkina pelleteatu (700g, 5') eta 50 μ L PBSan bersuspenditu zen. Plakan atxikituta zeuden zelulak jaso eta 100 μ L PBSan bersuspenditu ziren. Gainjalkineko eta pelleteatutako zelulak (150 μ L guztira) 150 μ L "Caspase mix"-arekin (Caspase-Glo® 3/7 Assay System) nahastu ziren. Giro tenperaturan ordu betez inkubatu eta gero, 96 putzuetako plaka beltz batean lagin bakoitzaren 200 μ L bota ziren eta luminiszentzia neurtu zen Beckman Coulter DTX 880 irakurle batean.

3.7 Analisi estatistikoak

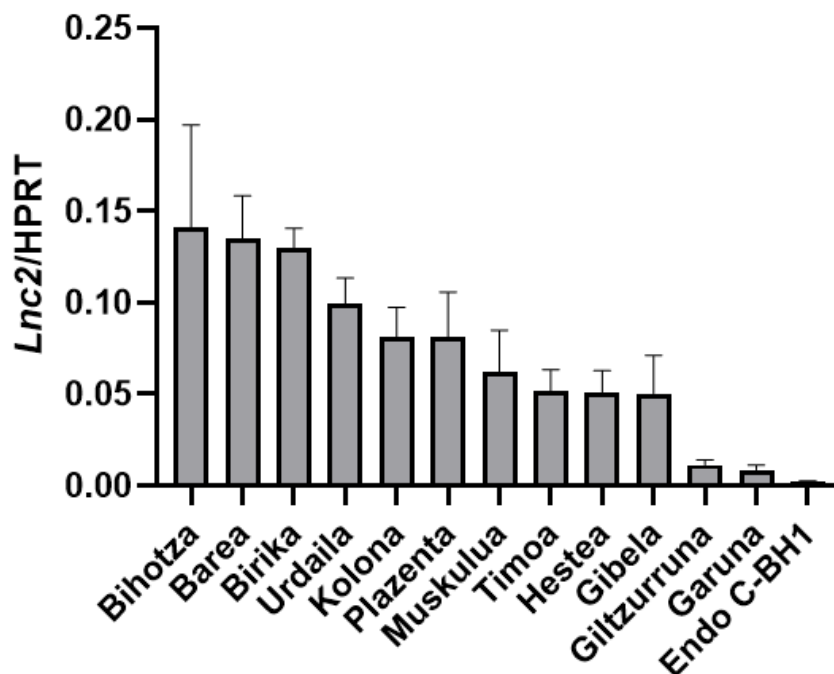
Emaitzak datuen batazbestekoa \pm SEM (*Standard Error Mean*; batazbestekoaren errore estandarra) moduan adierazi ziren eta esangarritasuna *Student's t-test*-aren bidez testatu zen; p-balioa 0.05 baino txikiagoa zen kasuetan, ezberdintasunak esangarritzat hartu ziren. Esangarritasuna kalkulatzeko eta grafikoak sortzeko *GraphPad* (Prism 8.0) programa erabili zen.

2020 urtean bizitzen ari garen COVID-19ren egoera dela eta, esperimentu batzuk behin edo birritan bakarrik errepikatu ahal izan ziren. Hori dela eta, kasu horietan ezin izan zen analisi estatistikorik aplikatu.

4. EMAITZAK

4.1 *Lnc2*-ak adierazpen maila baxua du EndoC- β H1 zeluletan beste ehunekin konparatuta.

Lnc2-ak ehun ezberdinetan duen adierazpenari dagokionez eta 4. irudian ikus daitekeen moduan, adierazpen balore altuenak bihotzean, barean eta birikan eman ziren. Bestalde, *Lnc2*-aren adierazpen-maila baxuenak, berriz, giza pankreako beta zeluletan (EndoC- β H1), garunean eta giltzurrunean izan ziren.



4. Irudia. *Lnc2*-aren adierazpena giza-ehun ezberdinetan. *Lnc2*-aren adierazpena bihotzean, barean birikan, urdailean, kolonean, plazentan, muskuluan, timoan, hestean, gibelean, giltzurrunean, garunean eta EndoC- β H1 zeluletan aztertu zen. Adierazitako datuak hiru erreplika esperimentalen batzbestekoa \pm SEM (*Standard Error Mean*; batzbestekoaren errore estandarra) dira.

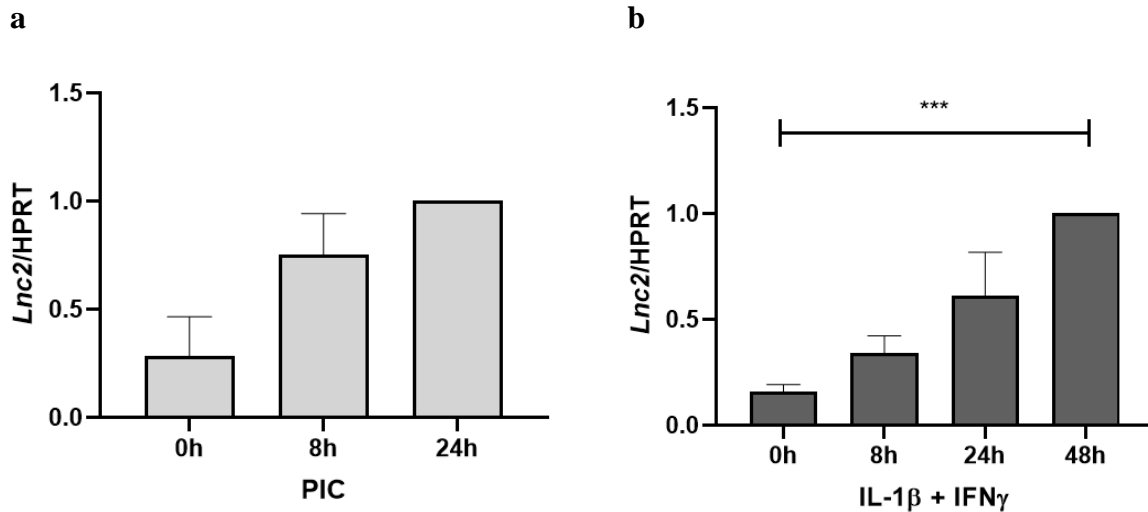
4.2 Harizpi bikoitzeko RNA birikoak (PIC) eta hantura eragiten duten zitokinek (IL-1 β +IFN γ) *Lnc2*-aren adierazpena aldatzen dute pankreako beta zeluletan.

1 motako diabetesaren patogenesisian infekzio birikoek eta hantura sortzen duten zitokinek eragina dutela ikusi da. Izan ere, bi estimulu horiek pankreako beta zelulen suntsipena eragiten duten zenbait bidezidor (apoptosia eta hantura, besteak beste) aktibatzen dituztela ikusi da. Hori dela eta, harizpi bikoitzeko RNA biriko sintetiko batek (PIC) eta hantura eragiten duten IL1 β eta IFN γ zitokinen nahasketak *Lnc2*-aren adierazpenean zuten eragina aztertu zen.

5a. irudian ikus daitekeen moduan, bazirudien PICaren transfekzioak *Lnc2*-aren adierazpena emendatzen zuela. Tratatu gabeko zelulekin konparatuta (0h), 8 orduara *Lnc2*-aren adierazpena 2.6 aldiz igo zen eta 24 orduara 3.5 aldiz, baina esperimentuen arteko aldakortasuna zela eta, ezberdintasunak ez ziren esangarriak izan.

Zitokinekin egindako tratamenduari dagokionez, *Lnc2*-aren adierazpena, tratamendua jarri eta 8, 24 eta 48 orduara neurtu zen. Egoera basalarekin (0h) konparatuta, *Lnc2*-aren adierazpenak gora

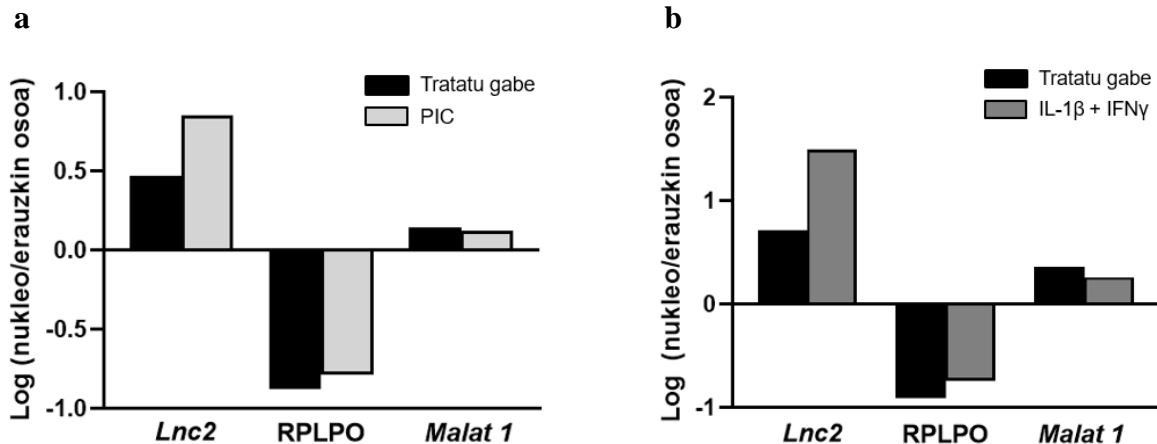
egin zuen neurtutako denbora guztietan. Horrela, tratamendua jarri eta 8 orduara adierazpena 2.18 aldiz emendatu zen, 24 orduara 3.88 aldiz handiagoa zen eta 48 orduara, 6.35 aldiz (5b. irudia).



5. irudia. PIC eta zitokinen eragina *Lnc2*-aren adierazpenean denbora tarte ezberdinetan. *a*: PICaren eragina *Lnc2*-aren adierazpenean 0, 8 eta 24 orduko denbora tartean. Adierazitako datuak 4 esperimenturen batzbestekoa \pm SEM (*Standard Error Mean*; batzbestekoaren errore estandarra) dira. *b*: Zitokinen eragina *Lnc2*-aren adierazpenean 0, 8, 24 eta 48 orduko denbora tartean. Adierazitako datuak 3 esperimenturen batzbestekoa \pm SEM (*Standard Error Mean*; batzbestekoaren errore estandarra) dira. Esangarritasuna *Student's t-test*-aren bidez testatu zen; *** $p < 0.001$.

4.3 PICak eta zitokinek zitoplasmatik nukleora *Lnc2*-aren translokazioa eragiten dute.

PICak eta zitokinek *Lnc2*-aren kokapen zelularrean duten eragina aztertzeko, zelulak tratamendu ezberdinekin jarri eta *Lnc2*-aren adierazpena aztertu zen nukleoan eta zelularen erauzkin osoan. 6a. irudian ikus daitekeen moduan, EndoC- β H1 zelulak PICarekin tratatzean, egoera basalarekin konparatuta, *Lnc2*-aren adierazpena nukleoan emendatzen zela zirudien. Bestalde, zitokinen tratamenduarekin berdina ikusi zen, hau da, egoera basalarekin konparatuta, zitokinekin tratatutako zeluletan *Lnc2*-aren adierazpena nukleoan handitzen zela zirudien (6b. irudia).



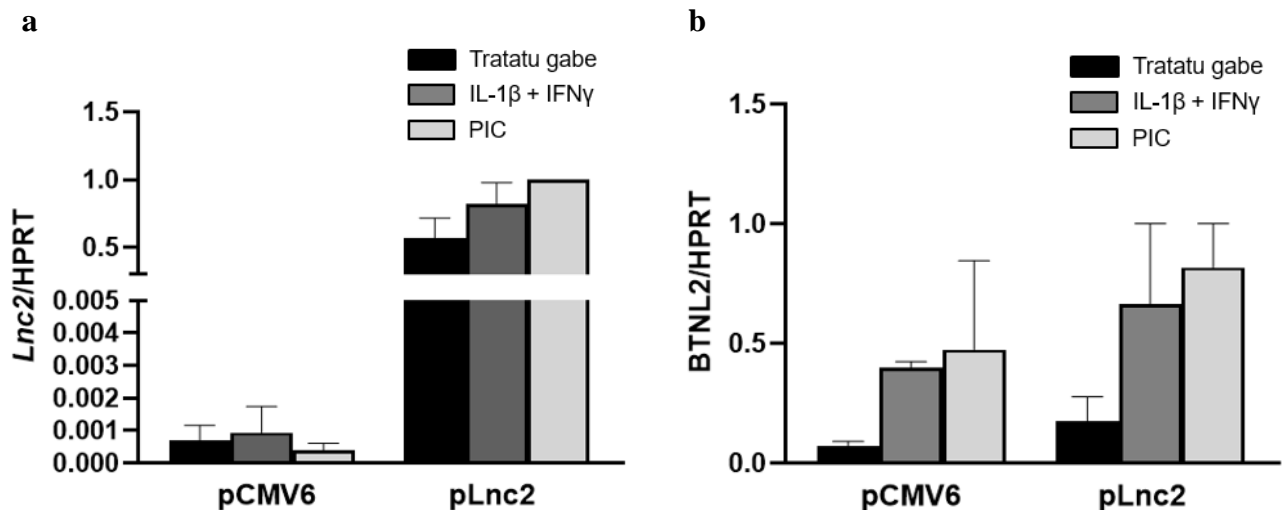
6. Irudia. *Lnc2*-aren adierazpena EndoC-βH1 zelulen nukleoan eta erauzkin osoan. *a*: *Lnc2*-aren adierazpena egoera basalean eta PICaren transfekzioa eta gero; adierazpenaren neurketa frakzio nuklearrean eta zelulen erauzkin osoan egin zen. Emaitzak nukleoaren eta erauzkin osoaren ratioaren logaritmo gisa adierazi dira. *b*: *Lnc2*-aren adierazpena egoera basalean eta zitokinen tratamendua eta gero; adierazpenaren neurketa frakzio nuklearrean eta zelulen erauzkin osoan egin zen. Emaitzak nukleoaren eta erauzkin osoaren ratioaren logaritmo gisa adierazi dira. Frakzioen kontrol gisa, RPLP0 (zitoplasmaren markatzailea) eta *Malat-1* (nukleoaren markatzailea) erabili ziren. Emaitzak esperimentu bakarrekoak dira.

4.4 *Lnc2*-aren gainadierazpenak *BTNL2* genearen adierazpena emendatzen du.

Lnc2-aren gainadierazpen bektoreak *Lnc2* genearen adierazpena aldatzen zuen aztertzeko, zelulak pCMV6 (kontrola) eta *Lnc2*-aren gainadierazpen bektorearekin (pLnc2) transfektatu ziren, eta ondoren, zelulak PICarekin edo zitokinekin tratatu ziren. 7a. irudian ikus daitezkeen bezala, pLnc2 bektorearekin transfektatutako zeluletan, pCMV6 kontrol bektorearekin konparatzerakoan, *Lnc2*-aren adierazpena 826 aldiz handiagoa zen egoera basalean (hau da, tratatu gabeko zeluletan). Zitokinekin tratatutako zeluletan berriz, igoera 871 alditakoa zen, eta PICarekin tratatzerakoan, 1633 aldiz handiagoa zen. *Lnc2*-aren gainadierazpen bektoreak *Lnc2*-aren adierazpena emendatzen zuen aztertutako hiru baldintzetan, baina ez zen baldintzen arteko ezberdintasunik ikusi.

Behin gainadierazpen bektoreak ongi funtzionatzen zuela ikusita, *BTNL2* genearen adierazpena neurtu zen. Kasu honetan, egoera basalean, *Lnc2*-a gainadierazitako zeluletan *BTNL2* genearen adierazpena 2.47 aldiz emendatu zela ikusi zen (7b. irudia). Zelulak zitokinekin edo PICarekin

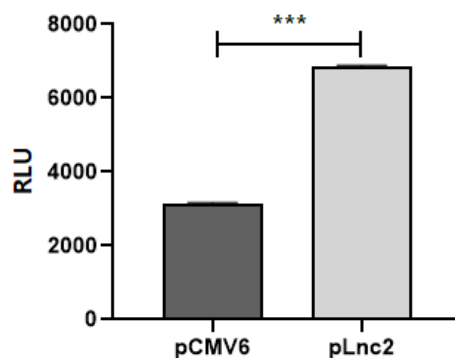
tratatzean, *Lnc2*-aren gainadierazpenak *BTNL2* genearen adierazpena emendatzen zuela zirudien, baina esperimenteren arteko aldakortasuna handia zenez, ezin izan zen konklusio argirik atera.



7. Irudia. *Lnc2* eta *BTNL2* geneen adierazpenak beta zeluletan *Lnc2* gainadieraztean. *a*: *Lnc2*-ren adierazpena, *Lnc2* gaiandierazi eta zitokinen edo PIC tratamenduaren ostean. *b*: *BTNL2*-ren adierazpena *Lnc2* gainadierazi eta zitokinen edo PIC tratamenduaren ostean. Lortutako datuak bi esperimenteren batzbestekoa \pm SEM (*Standard Error Mean*; batezbestekoaren errore estandarra) dira.

4.5 *Lnc2*-aren gainadierazpenak apoptosis emendatzen du EndoC-βH1 zeluletan.

Kaspasa 3/7-ren aktibitatea neurtuz, pLnc2 bektorearekin transfektatutako beta zelulen apoptosis bikoitza zela ikusi zen, pCMV6-rekin transfektatutako zelulekin konparatuta (8. Irudia).



8. Irudia. Kaspasa 3/7-ren aktibazioa *Lnc2* gainadierazita duten beta zeluletan. Zelulak pCMV6 bektorearekin (kontrola) edo pLnc2 bektorearekin transfektatu ziren eta apoptosis neurtu zen Kaspasa 3/7 aktibitatea neurtuz (RLU; *relative luciferase units*; luziferasa unitate arbitrarioak). Lortutako datuak hiru esperimenteren batzbestekoa \pm SEM (*Standard Error Mean*; batezbestekoaren errore estandarra) dira. Esangarritasuna *Student's t-test*-aren bidez testatu zen; *** $p < 0.001$

5. EZTABAIDA

RNA luze ez kodetzaileak DM1 gaixotasun autoimmunearekin asoziatu dira azken urteetan zehar (Mirza et al., 2017; Wu et al., 2015). Hala ere, lncRNA horien gehiengoak duen funtzioa oraindik ez da ezaguna eta jakinda eskualde ez kodetzaileak funtsezkoak izan daitezkeela gaixotasunarekin erlazionatutako geneen erregulazioan, interesgarria da lncRNA horien karakterizazio funtzionala egitea. Lan honetan aztergai izan den *Lnc2*-ak DM1arekin asoziatutako nukleotido bakarreko polimorfismo bat dauka eta polimorfismo horrek bere bigarren mailako egituraren eragiten du, lncRNA-k izan dezakeen funtzioan eragin dezakelarik.

Giza genomaren milaka RNA ez kodetzaile dauden arren, horien karakterizazioa nahiko urria da egun. Ikerketa honetan *Lnc2*-aren adierazpena aztertu zen ehun ezberdinetan. Bere adierazpen maila altuenak bihotzean, barean eta birikan izan ziren; eta baxuenak, aldiz, giza pankreako beta zeluletan, garunean eta giltzurrunetan. Nahiz eta bere adierazpen balore baxuenak giza pankreako beta zeluletan (EndoC- β H1) detektatu ziren, ezin daiteke baztertu lncRNA honek funtzio garrantzitsuren bat duenik zelula hauetan. Izan ere, beste hainbat ikerketetan ikusi den moduan, nahiz eta lncRNA-k orokorrean adierazpen maila baxua duten, funtzio biologiko garrantzitsuak bete ditzakete (Derrien et al., 2012; Seiler et al., 2017).

Giza pankreako beta zelularen heriotza, insulitisaren garapenaren ondorioz gertatzen da. Jakinaenez, sistema immuneko zelulak beta zeluletan infiltratzean eta horiek zitokinak (IL1 β eta IFN γ , besteak beste) jariatzean, ingurune pro-inflamatorioa sortzen da pankreako zeluletan (insulitisa). Horrek, beta zelulak apoptosira bideratzen ditu, ondorioz DM1 garatzen delarik (Eizirik et al., 2009). Gainera, aurreko ataletan azaldu bezala, hipotesi garrantzitsuenen artean, insulitisaren eragileetako bat infekzio biralak direla dago. Lan honetan ikusi zen, beta zelulak (EndoC- β H1) hantura eragiten duten zitokinekin eta infekzio birala simulatzen duen PICarekin tratatzean, *Lnc2*-aren adierazpena emendatzen zela. Hortaz, *Lnc2*-ak insulitisaren, eta beraz, DM1aren garapenean funtzioaren bat eduki dezakeela pentsa daiteke.

Bestalde, beta zeluletan *Lnc2*-aren kokapen zelularra aztertzean, PICak eta zitokinek zitoplasmatik nukleorako *Lnc2*-aren translokazioa eragiten zutela ikusi zen. Jakinda lncRNA-ek geneen adierazpena kontrolatzea dutela funtzio nagusizat, posible da *Lnc2*-ak DM1ean eragina duten geneen erregulazioan parte hartzea. Hau da, hantura eragiten duten zitokinen eta infekzio birala

simulatzen duen PICaren presentzian *Lnc2*-a pankreako beta zelulen nukleora translokatzan denez, DM1arekin asoziatutako geneen erregulazioan parte hartzen duela pentsa daiteke. Are gehiago, *Lnc2* genea *BTNL2* gene kodetzailearekin gainjarrita dago genomak. *BTNL2* proteinak beta zeluletan duen funtzioa jakina ez den arren, sistema immunean funtzio garrantzitsu bat duela ikusi da, T zelulen proliferazioaren erregulazioa, hain zuzen ere. Zehazki, ikusi da *in vitro* *BTNL2*ak T zelulen proliferazioa inhibitzen duela. Gainera, Tian et al.-ek (2019) ikusi zuten *BTNL2*-IgG2a Fc fusio proteina errekonbinantea saguetan *in vivo* erabiltzean, T zelulen proliferazioa, aktibazioa eta zitokinen jariapena jaitsi egiten zela; horrela, DM1aren patogenesisia NOD (*Non-obese diabetic*) saguetan hobetzen zelarik.

Kontuan izanik, lncRNA-ek batez ere *cis*-en kokatutako geneak erregulatzen dituztela, eta *Lnc2*-a *BTNL2*rekin genomak gainjarrita dagoela, pentsa daiteke *Lnc2*-ak *BTNL2*ren adierazpenaren erregulazioan parte hartu dezakeela.

Hortaz, ikerketa honetan *Lnc2*-aren gainadierazpenak *BTNL2*ren adierazpenean eraginik zuen aztertu zen. Egoera basalean *Lnc2* gainadieraztean, *BTNL2*ren adierazpena emendatzen zela ikusi zen. Beraz, giza pankreako beta zeluletan *BTNL2*ren funtzioaren inguruan informazioa ez dagoen arren, emaitza horrek adierazten du *Lnc2*-k *BTNL2*ren adierazpena erregulatzen duela, horrek DM1aren patogenesisian eraginen bat eduki dezakelarik. Aurrerantzean interesgarria izango litzateke, *BTNL2* genearen karakterizazio funtzionala egitea pankreako beta zeluletan duen funtzioa eta DM1ean eduki dezakeen efektua zehazteko.

Nahiz eta egoera basalean *Lnc2*-aren gainadierazpenak *BTNL2*ren adierazpena emendatzen zuen, *Lnc2* gainadierazitako zeluletan zitokina edo PICarekin tratamendua jartzean, esperimentuen arteko aldakortasuna handia izan zen eta ondorioz, ezin izan zen tratamendu horien eraginaren inguruan konklusio argirik atera. Hala ere, zitokina edo PICaren presentzian *Lnc2*-aren nukleorako translokazioa emendatzen zela ikusi zen, eta, jakinda egoera basalean *Lnc2*-ak nolabait *BTNL2*ren adierazpena erregulatzen duela, zitokina edo PICaren presentzian erregulazioa ere egongo dela pentsa daiteke. Baina, hori ziurtatzeko esperimentu gehiago egin beharko lirateke.

Aipatu beharra dago orain arte azaldutako emaitzetan, aurten jasan dugun COVID-19aren egoera dela eta, gehienez bi esperimentu egin direla. Nahiz eta lortutako grafikoetan joerak ikus

daitezkeen, ezin izan da analisi estatistikorik egin eta, beraz, esperimentuak errepikatzea komenigarria litzateke konklusio argiak ateratzeko.

Azkenik, *Lnc2*-a gainadieraztean pankreako beta zelulen (EndoC- β H1) apoptosi maila neurtu zen. Izan ere, DM1a gaixotasun autoimmune bat da non, insulitisaren garapenaren ondorioz beta zelulak apoptosiz hiltzen diren. Zeluletan *Lnc2*-a gainadieraztean, apoptosi maila bikoiztu zen kontrolarekin konparatuz. RNA ez kodetzaileen funtzio nagusia beste geneen erregulazioa izanik, *Lnc2*-ak beta zelulen apoptosian parte hartzen duen generen baten erregulazioan parte hartzea posible da. Horretaz gain, baliteke gene hori *BTNL2* izatea, baina arestian aipatu den bezala, *BTNL2* genearen funtzioa pankreako beta zeluletan ezezaguna da, eta ondorioz, esperimentu gehiago beharko lirateke beta zelulen apoptosiaren erregulazioan parte hartzen duen zehazteko.

Laburbilduz, lan honetako emaitzek iradokitzen dute *Lnc2*-a pankreako beta zelulen apoptosiarekin erlazionatuta dagoela. Seguruenik, apoptosiarekin erlazionatutako gene baten erregulazioaren bidez. Horretaz gain, genoman bere kokapen berean dagoen *BTNL2*ren adierazpenaren erregulazioan parte hartzen duela ikusi da. *BTNL2*k sistema immunean funtzio garrantzitsua betetzen du, baina pankreako beta zeluletan duen funtzioa ezezaguna izanik, etorkizuneko ikerketetan proteina horrek pankreako beta zeluletan duen funtzioa zehaztea garrantzitsua izan daiteke. Azkenik, *Lnc2*-aren efektua pankreako beta zelulen apoptosian *BTNL2*ren erregulazioaren bitartekoa den argitzeko esperimentu mekanistiko gehiago egin behar dira.

6. ESKER ONAK

Eskerrik asko Euskal Herriko Unibertsitateari, Gradu Amaierako Lan esperimentalaren burutzeko aukera emateagatik. Bestetik, eskerrrik asko Izortze Santin-i bere ikerketa proiektuan parte hartzen uzteagatik eta, hainbeste irakatsi izanagatik. Eta azkenik, eskerrrik asko Itziar Gonzalez, urte osoan zehar laborategian nirekin egon izanagatik eta ikerketa-mundua zer den erakusteagatik.

7. BIBLOGRAFIA

- Atkinson, M. A., & Eisenbarth, G. S. (2001). Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. *The Lancet*, 358(9277), 221-229. doi:10.1016/S0140-6736(01)05415-0
- Atkinson, M. A., Eisenbarth, G. S., & Michels, A. W. (2014). Type 1 diabetes. *The Lancet*, 383(9911), 69-82. doi:10.1016/S0140-6736(13)60591-7
- Borch-Johnsen, K., Mandrup-Poulsen, T., Zachau-Christiansen, B., Joner, G., Christy, M., Kastrup, K., & Nerup, J. (1984). Relation between breast-feeding and incidence rates of insulin-dependent diabetes mellitus: a hypothesis. *The Lancet*, 324(8411), 1083-1086. doi:10.1016/s0140-6736(84)91517-4
- Butalia, S., Kaplan, G. G., Khokhar, B., & Rabi, D. M. (2016). Environmental risk factors and type 1 diabetes: past, present, and future. *Canadian journal of diabetes*, 40(6), 586-593. doi:10.1016/j.jcjd.2016.05.002
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., ... & Lagarde, J. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome research*, 22(9), 1775-1789. doi:10.1101/gr.132159.111
- Eizirik, D. L., Colli, M. L., & Ortis, F. (2009). The role of inflammation in insulinitis and β -cell loss in type 1 diabetes. *Nature Reviews Endocrinology*, 5(4), 219-226. doi:10.1038/nrendo.2009.21
- Gonzalez-Moro, I., Olazagoitia-Garmendia, A., Colli, M. L., Cobo-Vuilleumier, N., Postler, T. S., Marselli, L., ... & Castellanos-Rubio, A. (2020). The T1D-associated lncRNA Lnc13 modulates human pancreatic β cell inflammation by allele-specific stabilization of STAT1 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(16), 9022-9031. doi:10.1073/pnas.1914353117

- Kelly, M. A., Rayner, M. L., Mijovic, C. H., & Barnett, A. H. (2003). Molecular aspects of type 1 diabetes. *Molecular Pathology*, 56(1), 1-10. doi:10.1136/mp.56.1.1
- Krogvold, L., Edwin, B., Buanes, T., Frisk, G., Skog, O., Anagandula, M., ... & Leete, P. (2015). Detection of a low-grade enteroviral infection in the islets of langerhans of living patients newly diagnosed with type 1 diabetes. *Diabetes*, 64(5), 1682-1687. doi:10.2337/db14-1370
- Knip, M., Virtanen, S. M., & Åkerblom, H. K. (2010). Infant feeding and the risk of type 1 diabetes. *The American journal of clinical nutrition*, 91(5), 1506S-1513S. doi:10.3945/ajcn.2010.28701C
- Marques-Rocha, J. L., Samblas, M., Milagro, F. I., Bressan, J., Martínez, J. A., & Martí, A. (2015). Noncoding RNAs, cytokines, and inflammation-related diseases. *The FASEB Journal*, 29(9), 3595-3611. doi:10.1096/fj.14-260323
- Mirza, A. H., Kaur, S., & Pociot, F. (2017). Long non-coding RNAs as novel players in β cell function and type 1 diabetes. *Human genomics*, 11(1), 17. doi:10.1186/s40246-017-0113-7
- Nguyen, T., Liu, X. K., Zhang, Y., & Dong, C. (2006). BTNL2, a butyrophilin-like molecule that functions to inhibit T cell activation. *The Journal of Immunology*, 176(12), 7354-7360. doi:10.4049/jimmunol.176.12.7354
- Ponting, C. P., Oliver, P. L., & Reik, W. (2009). Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell*, 136(4), 629-641. doi:10.1016/j.cell.2009.02.006
- Rewers, M., & Ludvigsson, J. (2016). Environmental risk factors for type 1 diabetes. *The Lancet*, 387(10035), 2340-2348. doi:10.1016/S0140-6736(16)30507-4
- Richardson, S. J., Willcox, A., Bone, A. J., Foulis, A. K., & Morgan, N. G. (2009). The prevalence of enteroviral capsid protein vp1 immunostaining in pancreatic islets in human type 1 diabetes. *Diabetologia*, 52(6), 1143-1151. doi:10.1007/s00125-009-1276-0

- Santin, I., & Eizirik, D. L. (2013). Candidate genes for type 1 diabetes modulate pancreatic islet inflammation and β -cell apoptosis. *Diabetes, Obesity and Metabolism*, 15(s3), 71-81. doi:10.1111/dom.12162
- Seiler, J., Breinig, M., Caudron-Herger, M., Polycarpou-Schwarz, M., Boutros, M., & Diederichs, S. (2017). The lncRNA VELUCT strongly regulates viability of lung cancer cells despite its extremely low abundance. *Nucleic acids research*, 45(9), 5458-5469. doi:10.1093/nar/gkx076
- Tian, X., Lin, Y., Cui, C., Su, M., & Lai, L. (2019). BTNL2-Ig Protein Attenuates Type 1 Diabetes in Non-Obese Diabetic (NOD) Mice. *Advanced healthcare materials*, 8(9), 1800987. doi:10.1002/adhm.201800987
- Vaarala, O., Atkinson, M. A., & Neu, J. (2008). The “perfect storm” for type 1 diabetes: the complex interplay between intestinal microbiota, gut permeability, and mucosal immunity. *Diabetes*, 57(10), 2555-2562. doi:10.2337/db08-0331
- Wu, G. C., Pan, H. F., Leng, R. X., Wang, D. G., Li, X. P., Li, X. M., & Ye, D. Q. (2015). Emerging role of long noncoding RNAs in autoimmune diseases. *Autoimmunity reviews*, 14(9), 798-805. doi:10.1016/j.autrev.2015.05.004
- Yeung, W. C. G., Rawlinson, W. D., & Craig, M. E. (2011). Enterovirus infection and type 1 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis of observational molecular studies. *Bmj*, 342, d35. doi:10.1136/bmj.d35
- Zhang, Q., & Jeang, K. T. (2013). Long noncoding RNAs and viral infections. *BioMedicine*, 3(1), 34-42. doi:10.1016/j.biomed.2013.01.001