

RNAren N⁶-metiladenosina (m⁶A) modifikazioaren rol berriak hesteko inflamazioaren garapenean eta tratamenduan

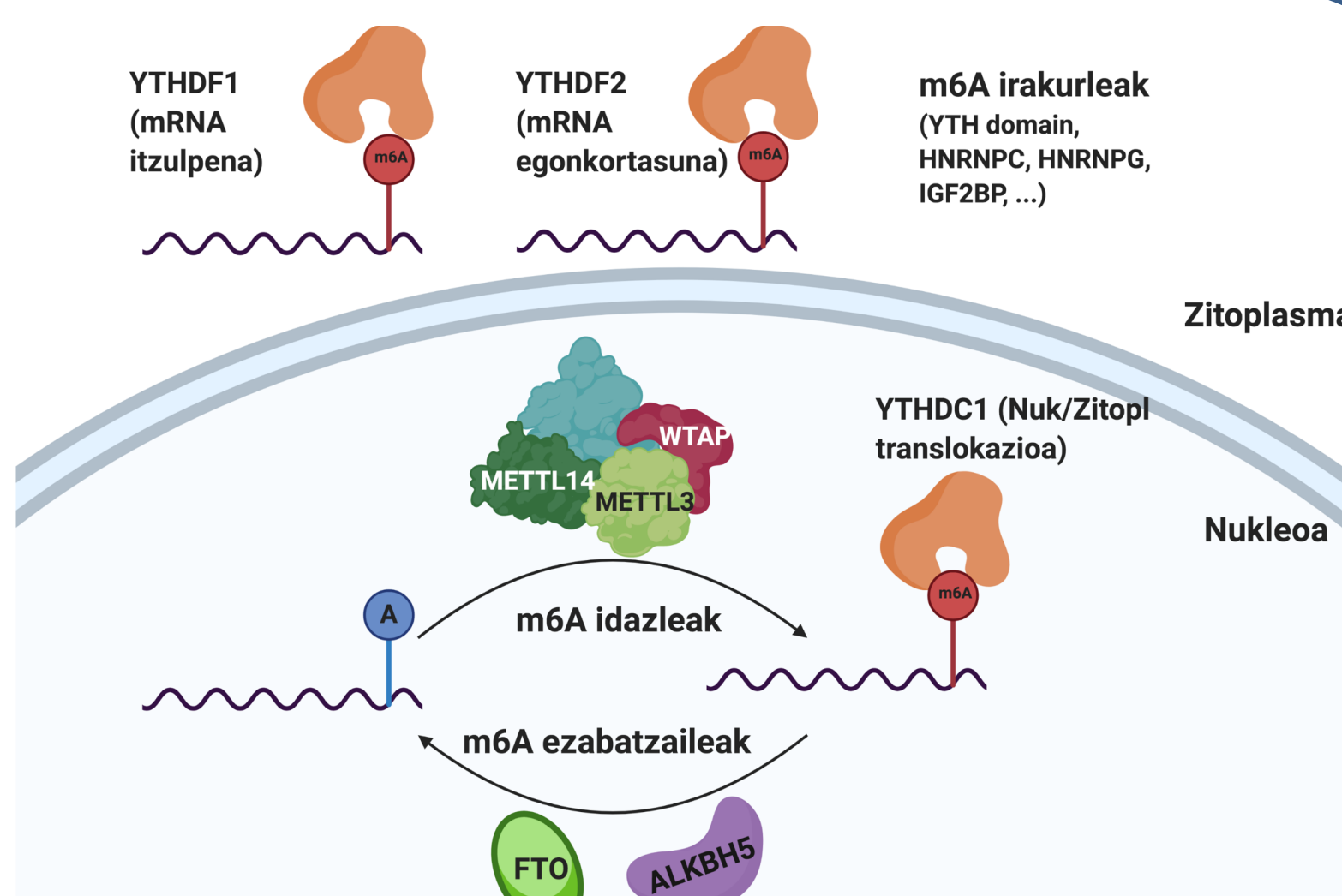
Ane Olazagoitia-Garmendia^{1,2}, Maialen Sebastian-DelaCruz^{1,2}, Iraia Garcia-Santisteban^{1,2}, Luis Manuel Mendoza¹, Alain Huerta³, Iñaki Irastorza⁴, Jose Antonio Rodriguez¹, Jose Ramon Bilbao^{1,2,5}, Ainara Castellanos-Rubio^{1,2,5,6}

¹Genetika, Antropologia Fisikoa eta Animalien Fisiologia Saila, UPV-EHU, Leioa. ²Biocruces Bizkaia Osasun Ikerketarako Institutoa, Barakaldo. ³Gaixotasun Intestinalak, Galdakao-Usansolo Ospitalea, Galdakao⁴Pediatria Saila, UPV-EHU, Leioa. ⁵CIBERDEM, Insitute de Salud Carlos III, Madril. ⁶Ikerbasque, Basque Foundation for Science, Bilbo.

Arloko ezagutza:

- Eritasun Zeliakoa (EZ) genetikoki sentikorrak diren pertsonetan glutena kontsumitzean garatzen den gaixotasun autoimmune konplexua da.
- EZrekin asoziatutako aldaera (SNP) asko identifikatu diren arren, haien funtzioa gehienetan ez da ezaguna.
- RNA mezulari (mRNA) eta RNA ez kodetzaileetan agertzen den aldaketa kimiko ugariena N⁶-metiladenosina (m⁶A) da.

- m⁶A idazle edo metilasek eta m⁶A ezabatzaile edo demetilasek m⁶A mailak kontrolatzen dituzte metilazio markak gehituz ala ezabatuz.
- m⁶A irakurle deitzen diren proteinek (YTHDF1 kasu) metilatuak dauden RNAk ezagutzen dituzte eta haien erregulazioan eragiten dute.



Hipotesia eta helburua

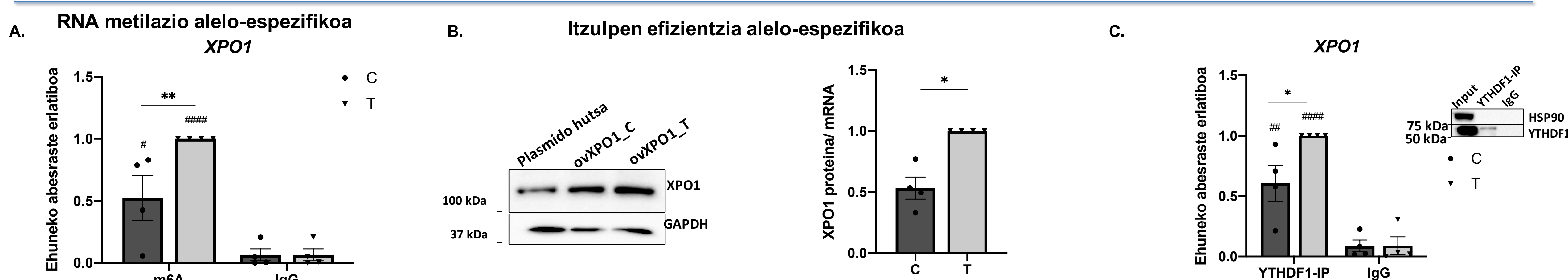
- EZri asoziatutako aldaera genomikoek RNAren metilazioaren eragina dute eta aldaketa horiek gaixotasunaren garapenean eragiten dute.

HELBURUA:

- EZri asoziatutako eta m⁶A marken inguruan dauden SNPen ikerketa egitea.
- Glutenak metilazio aldaketak eragiten dituen aztertzea.

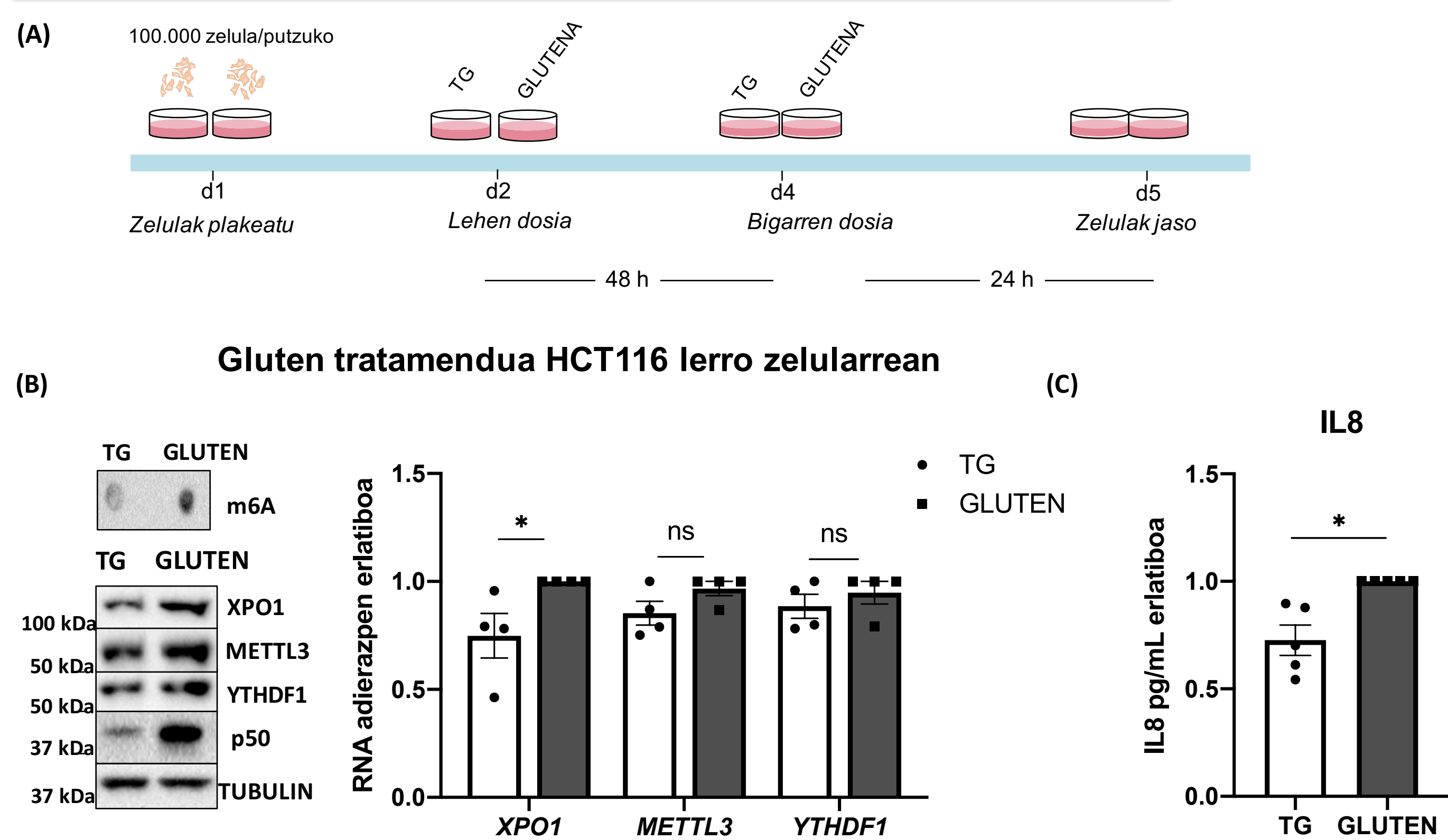
Emaitzak:

EZrekin asoziatutako XPO1en 5'UTRan dagoen SNParen arrisku aldaerak (T) metilazio maila altuagoa du eta itzulpenean eragiten du



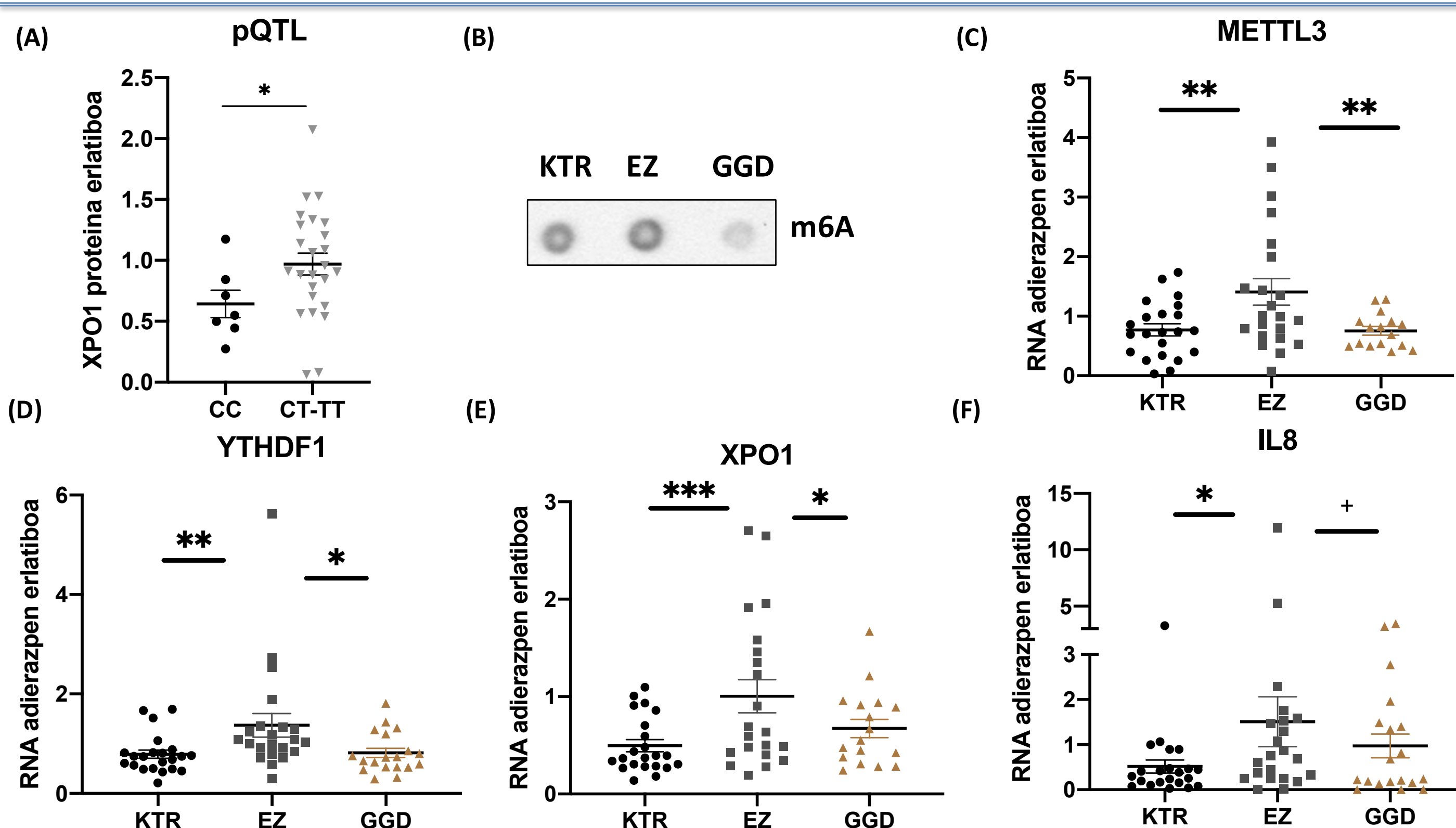
1. Irudia. (A) m⁶A antigorputza edo IgG kontrol negatiboa erabiliz HCT116 lerro zelularrean egindako immunoprezipitazioaren kuantifikazio alelo-espezifikoa qPCR bidez. (B) XPO1en 5'UTRaren itzulpen efizientzia alelo-espezifikoa. Eskubian, XPO1 proteina mailak adierazten dituen Western Blot argazkia, GAPDH kontrol moduan erabiliz. Ezkerrean, XPO1 proteina kuantifikazioa gainadierazitako XPO1 mRNA mailekiko erlatibizatua. (C) YTHDF1 m⁶A irakurlearekin immunoprezipitatutako XPO1 mRNAren kuantifikazio alelo-espezifikoa qPCR bidez. (* p < 0,05; ** p < 0,01; # p < 0,05; ### p < 0,01; #### p < 0,0001)

Glutenak m⁶A makinaria aktibatzen du, eta ondorioz, XPO1 mailak eta NFkB hantura-bidezidorra areagotzen dira



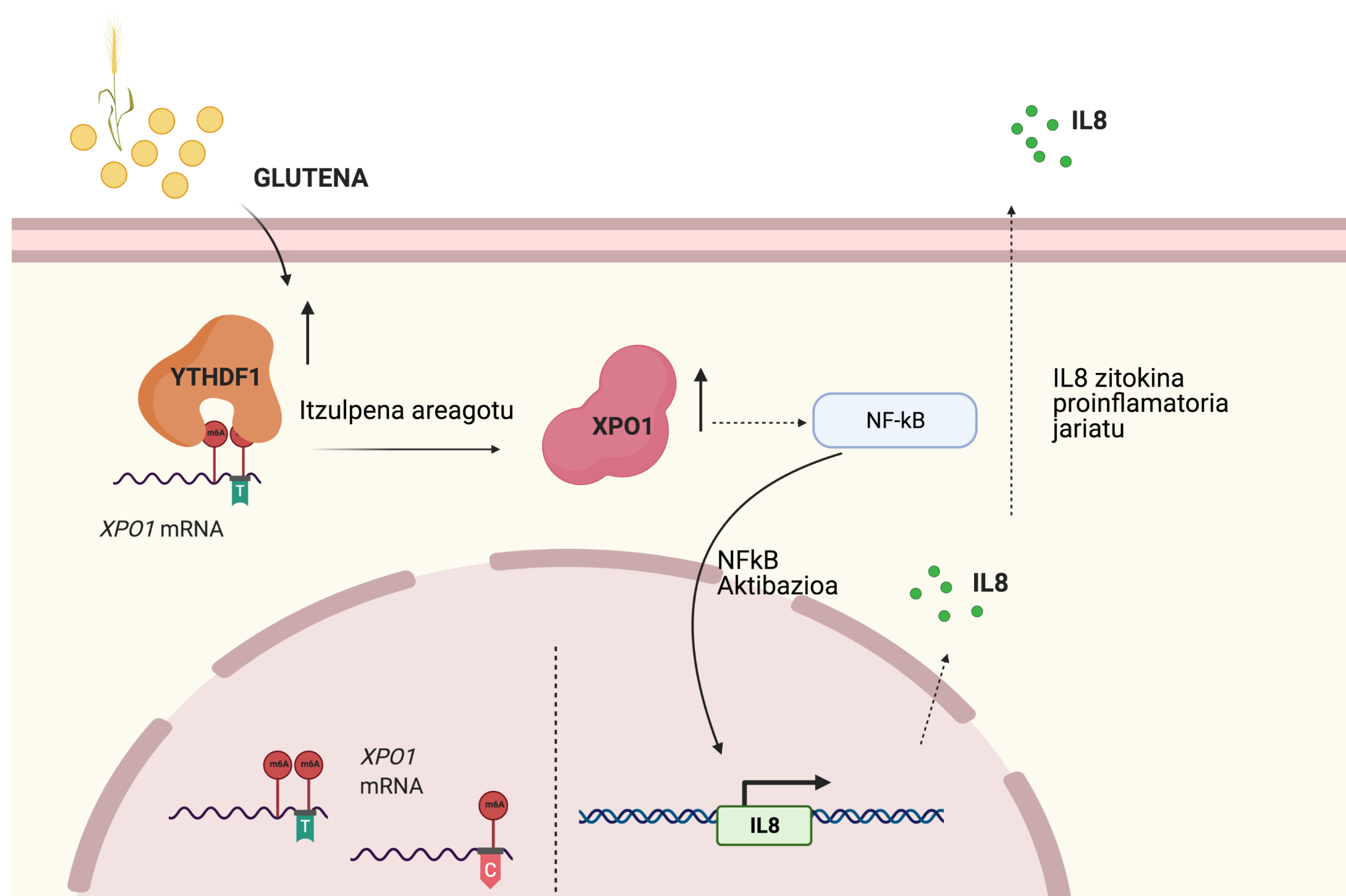
2. Irudia. (A) Gluten tratamendua HCT116 lerro zelularrean. (B) Ezkerrean goian, tratamendurik gabeko zeluletan (TG) edo glutenarekin trataturiko zeluletan (GLUTEN) m⁶A mailak Dot blot bidez kuantifikatuak. Ezkerrean behean, TG edo GLUTEN zeluletan m⁶A makinaria, XPO1 eta p50 NFkB unitatea WB bidez irudikatuak. Eskubian, m⁶A makinaria eta XPO1 mRNA kuantifikazioa qPCR bidez. (C) IL8 hantura zitokinaren kuantifikazioa ELISA bidez TG edo GLUTEN zelulen gainjalkinetan. (ns=ez esangarria * p < 0,05; ** p < 0,01; # p < 0,05; ### p < 0,01; #### p < 0,0001)

EZrekin asoziatutako arrisku aldaera duten gaixoei XPO1 proteina maila altuagoak dituzte eta glutenaren mendeko m⁶A, XPO1, METTL3 eta YTHDF1 mailak, baita ondorengo hantura efektuak aurkeztu dituzte



3. Irudia. (A) DNA eta proteina kontrolen hesteetako biopsietatik erauzi ziren, XPO1 mailak ELISA bidez neurtu eta rs3087898 genotipatu ziren. XPO1 proteina mailak babes genotipoa (CC) duten pertsonen eta arrisku aleloa dutenen artean (CT + TT) alderatu ziren. (B) RNA kontrolen biopsietatik (KTR), zeliako aktiboetatik (EZ) eta glutenik gabeko dietan egondako zeliakoetatik (GGD) erauzi zen. RNA metilazioa m⁶A dot blot bidez kuantifikatu zen. (C, D, E, F) m⁶A makinaria, XPO1 eta IL8 mRNA adierazpen kuantifikazioa qPCR bidez. (+p < 0,1; * p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001)

Ondorioak:



- Gaixotasun autoimmune eta inflamatorioekin asoziatutako SNP ez kodetzaileek m⁶A mailak alda ditzakete eta gaixotasunaren patogenesisan eragin dezakete.
- Glutenak m⁶A eta YTHDF1 areagotzea eragiten du, eta horrek XPO1 proteina mailak igotzea dakar.
- Gure datuek m⁶A makineriaren garrantzia azpimarratzen dute XPO1 mailak baldintzatzen baititu, horrek NFkBren adierazpena eta ondoren, IL8ren indukzioa eragiten du EZ gaixoetan.
- Gure ikerketak glutenaren aurrean erantzuten duen m⁶A-XPO1-NFkB bidezidorrak berria plazaratzen du, EZren patogenesis itxura dena eta gaixotasunaren balizko alternatiba terapeutiko berria izan daitekeena.

Esker onak: