

eman ta zabal zazu



Universidad del País Vasco Euskal Herriko Unibertsitatea

# ALDAERA EZ-KODETZAILEAK ETA EPITRANSKRIPTOMIKA: ERITASUN ZELIAKOAREKIN ASOZIATUTAKO EREMU BATEN AZTERKETA FUNTZIONALA

Doktorego Tesia

Ane Olazagoitia Garmendia

Leioa, 2022

Zuzendariak:

Ainara Castellanos Rubio

Jose Ramón Bilbao Catalá



Lan hau Ane Olazagoitia Garmendiak jasotako Eusko Jaurlaritzako Hezkuntza, Unibertsitate eta Ikerketa Saileko Beka Predoktoralak (PRE\_2017\_1\_0306) eta Espainiako Zientzia, Unibertsitate eta Berrikutza Ministerioak (PGC2018-097573-A-100) eta ISCIII Ikerketa proiektuak PI16/00258, Espainiako Ekonomia eta Lehiakortasun Ministerioak eta 'A way to make Europe' Europar Barasunak ERDF/ESF kofinantzatua, jasotako diru laguntzei esker burutu da.

<b>LABURDURAK</b>	<b>7</b>
<b>ARGITALPEN ORIGINALEN ZERRENDA</b>	<b>11</b>
<b>PROIEKTUAREN JUSTIFIKAZIOA ETA GARRANTZIA</b>	<b>14</b>
<b>1.SARRERA</b>	<b>16</b>
<b>1.1.  ERITASUN ZELIAKOA</b>	<b>18</b>
1.1.1.  Eritasun Zeliakoa	18
1.1.2.  EZren Patogenesisia	20
1.1.2.1.  Berezko Immunitate Sistema	20
1.1.2.2.  Immunitate Sistema egokitzalea	20
1.1.3.  EZren genetika	23
1.1.3.1.  MHC geneak	24
1.1.3.2.  Ez-MHC geneak	25
1.1.4.  EZri asoziatutako SNPen azterketa funtzionalak	28
<b>1.2.  EPITRANSKRIPTOMIKA</b>	<b>31</b>
1.2.1.  N <sup>6</sup> -metiladenosina RNA aldaketa	32
1.2.1.1.  m <sup>6</sup> A idazle, ezabatzaile eta irakurleak	34
1.2.1.2.  m <sup>6</sup> A kuantifikazio metodoak	39
1.2.1.3.  m <sup>6</sup> A metilazioa Inflamazioan eta Gaixotasunetan	41
<b>1.3.  NF-κB-ren                    ERREGULAZIOA,                    GENETIKATIK</b>	<b>45</b>
<b>EPITRANSKRIPTOMIKARA</b>	<b>45</b>
1.3.1.  NF-κB eta XPO1	48
<b>2.HELBURUAK</b>	<b>50</b>
<b>3.MATERIAL ETA METODOAK</b>	<b>54</b>
<b>3.1.  MATERIALAK</b>	<b>56</b>
3.1.1.  PT-Gliadina	56
3.1.2.  Giza paziente eta laginak	56
3.1.2.1.  Tratamenduak	58
3.1.3.  Lerro zelularrak	59
3.1.3.1.  Tratamenduak	59
3.1.4.  Sagu Ereduek	60

3.1.4.1. Tratamenduak	61
<b>3.2. METODOAK</b>	<b>62</b>
3.2.1. DNA, RNA eta proteina erauzketa	62
3.2.2. Gene adierazpen analisia	63
3.2.3. SNP genotipaketa	64
3.2.4. Pakete bioinformatikoak	65
3.2.4.1. RNAfold	65
3.2.4.2. MeT-DB V2.0	65
3.2.4.3. GEO datu-baseko miCLIP datuak	65
3.2.5. m <sup>6</sup> A detekzio metodoak	66
3.2.5.1. Dot Blot	66
3.2.5.2. m <sup>6</sup> A RNA immunoprezipitazioa	66
3.2.5.3. m <sup>6</sup> A RT-qPCR	67
3.2.5.4. m <sup>6</sup> A ELISA	69
3.2.6. Proteina kuantifikazio metodoak	69
3.2.6.1. Western Blot	69
3.2.6.2. ELISA	70
3.2.7. In vitro transkripzioa	70
3.2.8. Plasmidoen eraikuntza	71
3.2.9. Luziferasa Saiakuntza	71
3.2.10. Gainadierazpenak	72
3.2.11. Isilarazpenak	72
3.2.12. Zelulen frakzionamendua	73
3.2.13. RNA immunoprezipitazio (RIP) esperimentuak	73
3.2.14. Mugikortasun Elektroforetikoko Aldakuntza esperimentuak	74
3.2.15. Anlisi Estatistikoak	74
<b>4.EMAITZAK</b>	<b>75</b>
4.1. m <sup>6</sup> A METILAZIO HONDAR-ESPEZIFIKOEN KUANTIFIKAZIOA RT-qPCR METODO BERRI BATEN BIDEZ	77
4.2. m <sup>6</sup> A RNA METILAZIOA EZ-N	81

<b>4.3. XPO1 HAUTAGAIA: KARAKTERIZAZIO FUNTZIONALA EZ-KO HANTURA-INGURUNEAN</b>	<b>82</b>
4.3.1. rs3087898 genotipoaren eragina EZ pazienteetan	83
4.3.2. RNA metilazioa eta XPO1 mailak EZ pazienteetan	84
4.3.3. rs3087898 SNPa eta m <sup>6</sup> A RNA metilazioaren karakterizazio funtzionala XPO1en	86
4.3.3.1. rs3087898 SNPa eta m <sup>6</sup> A mailen eragina XPO1en <i>in vitro</i>	86
4.3.3.2. m <sup>6</sup> A mailen eragina XPO1en <i>in vivo</i>	92
4.3.3.3. XPO1en rola EZrekin lotutako hanturan	93
<b>4.4. GLUTENAREN EKARPENA m<sup>6</sup>A METILAZIOARI ETA XPO1 BIDEZIDORRARI</b>	<b>97</b>
4.4.1. Gluten estimulazioa: Giza biopsiak	97
4.4.2. Gluten estimulazioa: <i>in vitro</i> eredia	99
4.4.2.1. Glutena eta m <sup>6</sup> A metilazioa	99
4.4.2.2. Glutena eta m <sup>6</sup> A bidezko hantura	100
4.4.3. Gluten estimulazioa: <i>in vivo</i> eredia	103
4.4.3.1. Glutena eta m <sup>6</sup> A metilazioa	103
4.4.3.2. Glutena eta m <sup>6</sup> A bidezko hantura	106
<b>5.EZTABAIDA</b>	<b>108</b>
<b>6.ONDORIOAK</b>	<b>119</b>
<b>7.BIBLIOGRAFIA</b>	<b>123</b>

## LABURDURAK

<b>AGA</b>	(Anti-gliadin antibody) anti-gliadina antigorputzak
<b>ALKBH5</b>	AlkB homolog 5 RNA demetilasa
<b>APCs</b>	(Antigen presenting cells) zelula antigen aurkezlea
<b>CDS</b>	(Coding sequence) sekuentzia kodetzailea
<b>CT</b>	(Choleratoxin) kolera toxina
<b>DC</b>	(Dentritic cell) zelula dentritikoa
<b>DM1</b>	1 motako diabetesa
<b>DMEM</b>	(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) Dulbeccok modifikatutako Eagle medioa
<b>DTT</b>	Ditiotreitola
<b>EMA</b>	(Anti-endomysium antibody) anti-endomisio antigorputza
<b>EMSA</b>	(Electrophoretic Mobility Shift Assay) Mugikortasun Elektroforetikoko Aldakuntza esperimentuak
<b>eQTL</b>	(Expression Quantitative Trait Loci) lokusaren ezaugarri kuantitatiboa adierazpenean
<b>ESPGHAN</b>	(European Society of Pediatric Gastroenterology Hematology and Nutrition) Gastroenterologia, Hepatologia eta Elikadura Pediatrikoaren Europako Elkarte
<b>EZ</b>	Eritasun Zeliakoa
<b>FBS</b>	(Fetal Bovine Serum) behi-sero fetala
<b>FTO</b>	(Fat mass and obesity-associated protein) Gantz masa eta obesitateari lotutako proteina
<b>GEO</b>	(Gene Expression Omnibus) Omnibus gene adierazpena
<b>GGD</b>	Glutenik gabeko dieta
<b>GIB</b>	Giza immunoeskasiaren birusa
<b>GWAS</b>	(Genome wide association study) Genoma Osoko Asoziazio Azterketa
<b>HCMV</b>	(Human cytomegalovirus) giza zitomegalobirusa

<b>HLA</b>	(Human leukocyte antigen) Giza Antigeno Leukozitarioa
<b>I</b>	Inosina
<b>IEC</b>	(Intestinal epithelial cell) hesteko zelula epiteliala
<b>IEL</b>	(Intraepithelial lymphocyte) epitelio barneko infozitoa
<b>IFN</b>	Interferoia
<b>IκB-α</b>	(Inhibitor of kappa B alpha) kappa B alfa inhibitzailea
<b>IL</b>	Interleukina
<b>KO sagua</b>	Knockout sagua
<b>KTR</b>	Gizabanako kontrolak
<b>LD</b>	(Linkage disequilibrium) lotura desoreka
<b>LMB</b>	Leptomizina B
<b>lncRNA</b>	(long non-coding RNA) RNA luze ez-kodetzaileak
<b>LPS</b>	Lipopolisakaridoa
<b>m<sup>1</sup>A</b>	N <sup>1</sup> -metiladenosina
<b>m<sup>5</sup>C</b>	<sup>5</sup> -metilzitosina
<b>m<sup>6</sup>A</b>	N <sup>6</sup> -metiladenosina
<b>m<sup>6</sup>A-CLIP/ miCLIP</b>	(m <sup>6</sup> A individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation) m <sup>6</sup> A nukleotido bakarreko erresoluzioko erretikulazio eta immunoprezipitazioa
<b>m<sup>6</sup>A-LAIC-seq</b>	(m <sup>6</sup> A-level and isoform-characterization sequencing) m <sup>6</sup> A-maila eta isoformen karakterizaziorako sekuentziazioa
<b>m<sup>6</sup>A-QTL</b>	(m <sup>6</sup> A quantitative trait loci) lokusaren ezaugarri kuantitatiboa m <sup>6</sup> A aldaketan
<b>m<sup>6</sup>A-seq/ meRIP-seq</b>	(m <sup>6</sup> A-specific methylated RNA immunoprecipitation (IP) with next-generation sequencing) m <sup>6</sup> A RNA metilatu espezifikoen immunoprezipitazioaren (IP) osteko belaunaldi berriko sekuentziazioa
<b>m<sup>6</sup>Am</b>	N <sup>6</sup> -2'-O-dimetiladenosina
<b>m<sup>7</sup>G txapela</b>	<sup>7</sup> -metilguanosina txapela
<b>MAPK</b>	(mitogen-activated protein kinase) mitogenoek aktibatutako proteina kinasa



<b>METTL3</b>	Metiltransferasa 3
<b>MHC</b>	(Major histocompatibility complex) Histokonpatibilitate Konplexu Nagusia
<b>miRNA</b>	mikroRNA
<b>ncRNA</b>	(non-coding RNA) RNA ez-kodetzailea
<b>NF-κB</b>	(Nuclear factor kappa B) kappa B transkripzio-faktore nuklearra
<b>NGS</b>	(Next generation sequencing) Belaunaldi berriko sekuentziazioa
<b>NK</b>	(Natural killer) hiltzaile naturalak
<b>P/S</b>	Penizilina eta estreptabidina
<b>PA-m<sup>6</sup>A-seq</b>	(Photo-crosslinking-assisted m <sup>6</sup> A sequencing) foto-erretikulazioak lagundutako m <sup>6</sup> A sekuentziazioa
<b>PBS</b>	(Phosphate-buffered saline buffer) Fosfato tanpoidun gatz tanpoia
<b>PI</b>	Proteasa inhibitzailea
<b>pQTL</b>	(Protein quantitative trait loci) lokusaren ezaugarri kuantitatiboa proteina adierazpenean
<b>PTG</b>	Pepsina eta Tripsinaz digeritutako Gliadina
<b>RBM15</b>	(RNA Binding Motif Protein 15) RNA lotze-motibo 15 proteina
<b>RIP</b>	RNA immunoprezipitazioa
<b>RPMI</b>	(Roswell Park Memorial Institute medium) Roswell Park Memorial Institutuko medioa
<b>RT-QPCR</b>	(Real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction) denbora errealeko polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa
<b>SAM</b>	S-adenosilmetionina
<b>SCARLET</b>	(Site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography) gene-espezifikoko mozketak gehi markaketa erradioaktiboaren jarraian ligazio bidezko erauzketa eta geruza fineko kromatografia
<b>SNP</b>	(Single nucleotide polymorphism) Nukleotido Bakarreko

	Polimosfismoa
<b>SOCS</b>	(Suppressor of cytokine signaling) Zitokinen seinaleztapenaren zapaltzailea
<b>TG2</b>	(Tissue transglutaminase type 2) 2 motako transglutaminasa
<b>TGA</b>	(Anti-transglutaminase autoantibody) anti-transglutaminasa autoantigorputzak
<b>TLR</b>	(Toll-like receptor) toll moduko hartzailea
<b>UTR</b>	(Untranslated region) Itzuli gabeko eskualdeak
<b>VIRMA</b>	(Vir Like m <sup>6</sup> A Methyltransferase Associated) Vir moduko m <sup>6</sup> A metiltransferasa asoziatua
<b>WT sagua</b>	(Wild type mice) jatorrizko sagua
<b>WTAP</b>	(Wilms' Tumor 1-Associating Protein) Wilms tumore 1ekin asoziatutako proteina
<b>XPO1</b>	(Exportin 1) 1 esportatzailea
<b>YTH domeinua</b>	YT521-B homologia domeinua
<b>ZC3H13</b>	(Zinc Finger CCCH Domain-Containing Protein 13) CCCH Zink hatz domeinudun 13 proteina
<b>ψ</b>	Pseudouridina

## ARGITALPEN ORIGINALEN ZERRENDA

Doktorego tesi hau hurrengo argitalpenean dago oinarrituta:

**Olazagoitia-Garmendia A**, Zhang L, Mera P, Godbout JK, Sebastian delaCruz M, Garcia-Santisteban I, Mendoza LM, Huerta A, Irastorza I, Bhagat G, Green PH, Herrero L, Serra D, Rodriguez JA, Verdu EF, He C, Bilbao JR, Castellanos-Rubio A., *Gluten-induced RNA methylation changes regulate intestinal inflammation via allele-specific XPO1 translation in epithelial cells*. **Gut (2021)** Feb, gutjnl-2020-322566.

Tesi honetan zehar hurrengo argitalpenetan ere parte hartu dut lehen autore gisa:

**Olazagoitia-Garmendia A**, Castellanos-Rubio A., *Relative quantification of residue specific m<sup>6</sup>A RNA methylation using m<sup>6</sup>A-RT-QPCR*. **Methods Mol Biol (2021)** Jun; 2298: 185-195.

**Olazagoitia-Garmendia A**, Sebastian-delaCruz M, Castellanos-Rubio A., *Involvement of lncRNAs in celiac disease pathogenesis*. **IRCMB (2020)** Nov; 358: 241-264.

**Olazagoitia-Garmendia A**, Gonzalez-Moro I, Colli ML, Cobo-Vuilleumier N, Postler TS, Marselli L, Marchetti P, Ghosh S, Gauthier BR, Eizirik DL, Castellanos-Rubio A, Santin I., *The T1D-associated lncRNA Lnc13 modulates human pancreatic  $\beta$  cell inflammation by allele-specific stabilization of STAT1 mRNA*. **PNAS (2020)** Apr 21;117(16): 9022-9031.

**Olazagoitia-Garmendia A**, Santin I, Castellanos-Rubio A., *Functional implication of celiac disease associated lncRNAs in disease pathogenesis*. **Comput Biol Med. (2018)** Nov 1;102: 369-375.

Eta ko-autore gisa hurrengo argitalpenetan:

Castellanos-Rubio I, Arriortua O, Marcano L, Rodrigo I, Iglesias-Rojas D, Barón A, **Olazagoitia-Garmendia A**, Olivi L, Plazaola F, Fdez-Gubieda ML, Castellanos-Rubio A, Garitaonandia JS, Orue I, Insausti M. *Shaping Up Zn-Doped Magnetite Nanoparticles from Mono- and Bimetallic Oleates: The Impact of Zn Content, Fe Vacancies, and Morphology on Magnetic Hyperthermia Performance*. **Chem Mater (2021)** Apr, 33, 9, 3139–3154

Sebastian-delaCruz M, **Olazagoitia-Garmendia A**, Huerta Madrigal A, Garcia-Etxebarria K, Mendoza LM, Fernandez-Jimenez N, Garcia Casales Z, de la Calle Navarro E, Calvo AE, Legarda M, Tutau C, Irastorza I, Bujanda L, Bilbao JR, Castellanos-Rubio A. *A Novel Noninvasive Method Based on Salivary Inflammatory Biomarkers for the Screening of Celiac Disease*. **CMGH (2021)** May

Sebastian-delaCruz M, Gonzalez-Moro I, **Olazagoitia-Garmendia A**, Castellanos-Rubio A, Santin I., *The role of lncRNAs in gene expression regulation through mRNA stabilization*. **Non-Coding RNA (2021)** Jan 7, 3.

Sebastian-delaCruz M, **Olazagoitia-Garmendia A**, Gonzalez-Moro I, Santin I, Garcia-Etxebarria K, Castellanos-Rubio A., *Implication of m<sup>6</sup>A mRNA methylation in the susceptibility to inflammatory bowel disease*. **Epigenomes (2020)** 4,16.

Castellanos-Rubio I, Rodrigo I, **Olazagoitia-Garmendia A**, Arriortua O, Gil de Muro I, Garitaonandia JS, Bilbao JR, Fdez-Gubieda ML, Plazaola F, Orue I, Castellanos-Rubio A, Insausti M., *Highly Reproducible Hyperthermia Response in Water, Agar and Cellular Environment by Discretely PEGylated Magnetite Nanoparticles*. **ACS Appl Mater Interfaces (2020)** Jun 24;12(25):27917-27929.

Aldaregia J, Errarte P, **Olazagoitia-Garmendia A**, Gimeno M, Uriz JJ, Gershon TR, Garcia I, Matheu A., *ErbB4 Is Required for Cerebellar Development and Malignant Phenotype of Medulloblastoma*. **Cancers** (2020) Apr 17;12(4):997.

Jauregi-Miguel A, Santin I, Garcia-Etxebarria K, **Olazagoitia-Garmendia A**, Romero-Garmendia I, Sebastian-delaCruz M, Irastorza I, Spanish Consortium for the Genetics of Celiac Disease, Castellanos-Rubio A, Bilbao JR., *MAGI2 Gene Region and Celiac Disease*. **Front Nutr** (2019) Dec 19; 6:187.

Castellanos-Rubio A, Santin I, **Olazagoitia-Garmendia A**, Romero-Garmendia I, Jauregi-Miguel A, Legarda M, Bilbao JR., *A novel RT-QPCR-based assay for the relative quantification of residue specific m6A RNA methylation*. **Sci Rep** (2019) Mar 12;9(1):4220.

Sousa dos Santos R, Marroqui L, Velayos T, **Olazagoitia-Garmendia A**, Jauregi-Miguel A, Castellanos-Rubio A, Eizirik DL, Castaño L, Santin I., *DEXI, a candidate gene for type 1 diabetes, modulates rat and human pancreatic beta cell inflammation via regulation of the type I IFN/STAT signalling pathway*. **Diabetologia** (2019) Mar;62(3):459-472.

## PROIEKTUAREN JUSTIFIKAZIOA ETA GARRANTZIA

Eritasun zeliakoa (EZ) genetikoki sentikorrek diren pertsonetan glutena irenstean sortutako nahaste autoimmune kroniko bat da. Uste da prebentzioa ezinbestekoa izango dela nahaste hori desagerrarazteko, eta horretarako, aurreikuspenarako eta diagnostiko goiztiarreko mekanismo eraginkorrak garatu behar dira. Arrisku genetiko-faktore nagusiak aspalditik ezagutzen badira ere, ez dira nahikoak EZren garapena azaltzeko eta herentzia galdua deritzonak helburu nagusi izaten jarraitzen du arlo honetan. Gainera, gaur egun dagoen tratamendu eraginkor bakarra glutenik gabeko dieta zorrotz bat jarraitzea da, zeina atxikimendurako zaila den eta paziente guztientzat baliagarria ez dena.

Hori dela eta, ezinbestekoa da zehaztea zein gene, bidezidor eta erregulazio mekanismok parte hartzen duten gaixotasunaren suszeptibilitatean. Modu honetan, EZren garapenaren azpian dauden mekanismo patogenikoak hobeto ulertuko dira, eta gaixotasun hau izateko arriskua areagotzen duten markatzaile genetikoak eta epigenetikoak identifikatuko dira. Gainera, bidezidor konplexuen erregulatzailer nagusiak identifikatzeak esku hartzeko iturri berriak identifikatzen lagunduko du. Glutenik gabeko dieta, ziurrenik, zeliakoen tratamendu nagusia izango da; hala ere, tesi hau bezalako lanek alternatiba terapeutiko berriei ateak zabaltzen dizkiete. Gainera, aurkikuntza berriak beste gaixotasun konplexu eta autoimmune batzuetara estrapolatu eta gaixotasun genetikoak ulertzeko ikuspuntu berriak postulatu litezke.

EZren genetika eta epigenetika diseinatzeko, proiektu honek determinatzaile funtzionalak bilatzea izan du helburu, ikuspegi genetikoak eta hautagai horien azterketa funtzionalak *in vitro* eta *in vivo* erabiliz. Zehazki, doktorego tesi honetan geneen erregulazio geruza berri bat aztertu dugu, m<sup>6</sup>A RNA metilazioa, eta glutenak marka epitranskriptomiko honetan eta NF-κB hantura-bide gakoan duen inplikazioa aztertu dugu.



## **1.SARRERA**





## 1.1. ERITASUN ZELIAKOA

### 1.1.1. Eritasun Zeliakoa

Eritasun zeliakoa (EZ) desoreka inflamatorio konplexu, kroniko eta immunitarioa da. Glutenak kriptetako biloen atrofia eta hiperplasia sortzen dituen erantzun proinflamatorioa eragiten du heste meharrean, eta suszeptibilitate genetikoaren duten indibiduoetan garatzen da (Caio et al., 2019; S. M. Kim et al., 2015). Glutenaren aurkako T zelula proinflamatorio espezifikokoak, linfuzito intraepitelialen eraldaketa zitotoxikoa, epitelioko zelulen estresa eta berezko zitokina proinflamatorioen isurketa dira ezaugarri nagusiak (Dieli-Crimi et al., 2015; Ricaño-Ponce et al., 2016).

EZ klasikoak sintoma eta zeinu ugari ditu. Alde batetik, heste meharrean dagozkion ezaugarriak ager daitezke, beheakoa, sabeleko distentsioa edota okadak, adibidez. Bestetik, malabsortzioak eragindako sintomak, hala nola hazkuntzaren atzerapena (pisu baxua, gantz falta, ilea arintzea) edo narriadura psikomotorrak (muskuluen atrofia) gara daitezke (Feighery, 1999). EZrekin lotutako beste sintoma atipiko batzuk ere badaude: asaldura neurologikoak, akatsak hortzetako esmaltean, antzutasuna, osteoporosia, sintoma artikularrak eta entzima hepatikoen maila altuak (Mäki & Collin, 1997).

Beste gaixotasun autoimmuneekin gertatzen den bezala, EZk osagai hereditario handia du, anai-arrebei egindako azterketetan identifikatua (Greco et al., 2002; Nisticò et al., 2006). Faktore genetiko nagusiak histokonpatibilitate konplexu nagusiaren (ingelesez Major Histocompatibility Complex edo MHC) eskualdean daude, 6p21 eremu kromosomikoan. Eskualde horretan funtzio immuneak dituen gene ugari dago, eta gluten peptidoak CD4+ linfuzitoei aurkezteko gai diren DQ2 eta DQ8 EZren heredagarritasunaren proportzio handiena azaltzen dute (%30 inguru) (Dieli-Crimi et al., 2015).

Glutena, EZ eragiten duen kanpo faktore nagusia, alkohol monomerikoan disolbagarria den glutenina eta gliadina polimeroen nahasketa bat da, eta garia,

garagarra eta zekalea bezalako zerealetan dago. Gliadinak, glutenaren osagai gakoak, proteina konplexuak dira eta hesteetako entzimak ez dira guztiz digeritzeko gai (Silano et al., 2009). Digestio partzial horren azken produktua ostalariaren erantzuna eragin dezaketen peptidoen nahasketa bat da, eta beste mikroorganismo kaltegarriekiko esposizioaren antzeko erantzuna sor dezakete (hesteetako iragazkortasuna handitzea eta berezko erantzun immunitario eta egokitzaileak aktibatzea, kasu) (Jelínková et al., 2004; Lammers et al., 2011; Picarelli et al., 1999; Shan et al., 2002). Hesteko lumenean gelditzen diren gliadina zatiak substratu egokiak dira 2 motako ehunetako transglutaminasa (TG2) entzimarentzat. Entzima horrek glutenaren peptidoak desamidatu ditzake eta HLA-DQ2 edo HLA-DQ8 molekulekin lotzeko gaitasuna handitu. Horrela, glutenaren aurkako CD4+ T zelula bidezko Th1 erantzuna sortzen da. Gainera, *in vitro* egindako azterlanek ikusi dutenez, zenbait gliadina peptidok MHCren aurkezpenarekiko independentea den berezko erantzun immunitarioa ere aktiba dezake (Jabri & Sollid, 2009; Schuppan et al., 2009).

Gaur egun, EZ tratatzeko modu eraginkor bakarra bizitza osorako glutenik gabeko dieta zorrotza (GGD) da, sintoma gehienak egun edo asteetan hobetzen dituelako (Murray et al., 2004). Izan ere, azpi-tratatutako edo tratatu gabeko pazienteek konplikazioak izateko joera dute, hala nola garaiera baxua, nutrizio-urritasunak, osteoporosia, bigarren mailako nahasmen autoimmunitarioak, neoplasia gaiztoak, antzutasuna eta haurdunaldien emaitza txarrak (Y. Han et al., 2015; Lerner, 2010). Eraginkorra izan arren, zaila da GGD betetzea eta pazienteen bizi-kalitatea gutxitzen duela uste da (Samasca et al., 2014). Gainera, pazienteen azpitalde txiki batek EZ errefraktarioa garatzen du, hau da, sintomek, hestearen hanturak eta biloen atrofiak, irauten dute GGD modu hertsian jarraitzen duten arren (Rubio-Tapia & Murray, 2010). Zentzu honetan, terapia alternatibo seguru, eraginkor eta eskuragarriak garatzea beharrezkoa da.

### 1.1.2. EZren Patogenesisia

Predisposizio genetikoaz eta glutenarekiko esposizioaz gain, heste-hesiaren funtzioaren galera, berezko erantzun immune proinflamatorioa eta erantzun immune egokitzaille desegokia funtsezkoak dira EZ garatzeko.

#### 1.1.2.1. Berezko Immunitate Sistema

Azken hamarkadako ikerketek gaixotasunaren patogenian berezko erantzun immuneak duen garrantzia nabarmendu dute. Glutenak eragin toxiko zuzena erakutsi du epitelioan; izan ere, hantura zitokinak askatzen direla ikusi da, hala nola *IL15* eta *IL8*. Hesteetako zelula epitelialetan *IL15* zitokina aktibatzeak zelula immunitarioak eta linfuzito intraepitelialen funtzioa (ingelesez intraepithelial lymphocytes edo IEL) polarizatu ditzake, hau da, EZ aktiboan enterozitoak suntsitzea eragiten duten zelulen funtzioa moldatu. Izan ere, EZ duten gaixoen IELk zelula hiltzaile naturalen (ingelesez natural killer edo NK) aktibazio hartzaileak adierazten dituzte. Zelula epitelialen kaltearen eta estres-seinaleen aurrean hartzaile horiek hiltzeko, zitokinak isuritzeko eta ugaltzeko gaitasuna ematen diete IEL zelulei (Meresse et al., 2006). Bien bitartean, gliadinak eragindako *IL8* kimiokinaren ekoizpenak neutrofiloak aktibatzen ditu (Barone et al., 2014; Jelínková et al., 2004), EZren enteropatia abiarazteko ingurune bikaina sorturik (1. irudia).

Geroz eta ebidentzia gehiago dago epitelioko estresaren, heste meharreko biloen atrofia eta EZ aktiboaren hasieraren arteko urratsetan. Hala ere, oraindik ez dira identifikatu glutenaren estresaren seinale gisa ezagutzeko bide molekularrak.

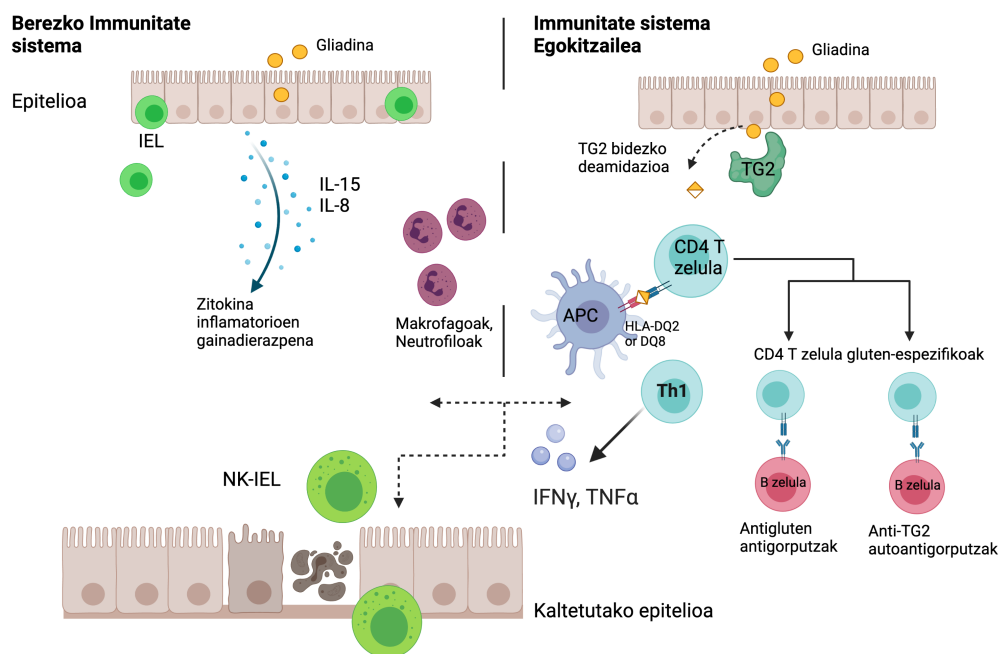
#### 1.1.2.2. Immunitate Sistema egokitzaillea

Eredu patogeniko onartuena glutenarekiko erreaktiboak diren CD4+ T zelulen estimulazioaren mendeko mekanismo immunitario egokitzaillean oinarritzen da. Zelula horiek EZ duten pazienteen hesteko mukosan daude, baina ez dira agertzen zeliakoak ez diren pertsonetan. Glutenaren zenbait peptidoren eta HLA-DQ2 edo HLA-DQ8 diren zelula antígeno-aurkezleen (ingelesez antigen presenting cell edo APC) arteko interakzio oso espezifikoaren ondorioa da erantzun immune egokitzaille

okerra (Ainara Castellanos-Rubio et al., 2009; Schuppan et al., 2009).

Genetikoki sentikorrak diren gizabanakoetan, glutenetik eratorritako peptidoek hesteetako epitelioa zeharkatzen dute eta TG2k desamidatzen ditu. HLA-DQ2 edota HLA-DQ8 APCek desamidatutako peptido horiek CD4<sup>+</sup> T zelula patogenikoei aurkezten dizkiete, Th1 bidezko erantzuna aktibatuz. Erantzun horren bidez, IFN $\gamma$  eta TNF $\alpha$  zitokina proinflamatorioak, anti-TG2 autoantigorputzak eta glutenaren aurkako antigorputzak sortzen dira (1. irudia).

CD4<sup>+</sup> T zelulen zeregina EZren fisiopatologian da guztiz ulertzen, HLA-DQ2 eta DQ8 molekulak beharrezkoak baitira, baina ez nahikoak EZ garatzeko. Ebidentzia batzuen arabera, enterozitoek jariatutako zitokina proinflamatorioak eta NK hartzailak dituzten IELak ere beharrezkoak dira. Uste da CD4<sup>+</sup> T zelula gluten-espezifikoak IELekin lankidetzan aritzen direla, eta ondorioz, zelula inflamatorioen *lamina propria*ren infiltrazioa, kripten hiperplasia eta biloen atrofia eragiten dutela (Jabri & Sollid, 2006; Schuppan et al., 2009).



**1. irudia.** EZren patogenesi-eredua. Gladinaren peptidoek berezko erantzun immunitarioa eta

egokitzaila aktibatzen dituzte. Alde batetik, berezko erantzun immunearen ondorioz, enterozitoen alterazioa gertatzen da. Enterozitoei positiboki erregulatzen dituzte hanturazko zitokinak, hala nola, *IL15* eta *IL8*, eta ondorioz, zelula immuneak *lamina propian* errekrutatzen dira. Bestalde, erantzun immune egokitzailaren ondorioz, CD4+ T linfuzitoak eta anti-TG2 eta antigluten B linfuzito espezifikoak aktibatzen dira. Gliadina peptidoak partzialki desamidatzen ditu TG2k eta HLA-DQ2/DQ8 APC zelulek ezagutu egiten dituzte, ondoren, T zelula laguntzaileetara aurkeztuz. T zelulek zitokina proinflamatorioak askatzen dituzte eta TG2ren aurkako autoantigorputzak sortzen dituzten B zelulak aktibatzen eta heltzen dituzte. Berezko erantzun immunearen eta erantzun immune egokitzaila aktiboaren arteko elkarrekintzak EZren enteropatia sortzen du. Biorenderrekin sortua.

EZren patogeniaren zenbait alderdi argitzeke dago, bereziki glutenak enterozitotetan estres-seinaleak eragiteko modua, glutenaren eta CD4+ T zelulen arteko interakzioa edota glutenaren peptidoak *lamina propria* nola igarotzen diren, besteak beste.

Gainera, infekzio birikoek edo mikrobiomaren konposizioak EZ garatea laguntzen dutela uste da, gaixotasunaren fisiopatologiaren konplexutasuna eta heterogeneotasuna areagotuz.

Hainbat azterlanek ikusi dute hesteetako infekzioek, baina ez arnasketakoek, areagotu egiten dutela autoimmunitate zeliakoa garatzeko arriskua. Gainera, birusek 1 motako IFNak estimulatzeak eta TLR7/TLR8 lokusa EZren arrisku-faktore genetiko gisa identifikatu izanak (Abadie et al., 2011; Silvester & Leffler, 2017; Stene et al., 2006), infekzio birikoek EZren patogenesisian zeregina izan dezaketela indartzen dute.

Sekuentziazioaren azken aurrerapenei esker, hesteetako mikrobiotaren desorekak edo disbiosiak gaixotasun gastrointestinalen eta nahasmen autoimmuneen patogenesisian izan dezakeen papera nabarmendu da (Maynard et al., 2012). Hainbat azterlanek erakutsi dute lotura bat dagoela EZren eta mikrobiomaren osaeraren artean (Chander et al., 2018; Olivares et al., 2018) eta hesteko mikrobiotaren osaeran eragina duten ingurumen-faktore askok EZren garapenean zeresana dutela ere uste da (Lionetti et al., 2014; Vriezinga et al., 2014). Disbiosiak ezagunak diren

gaixotasunaren eragileen ekoizpena bultzatzea izan daiteke gaixotasuna sortzeko bideetako bat. Hala ere, hipotesi horren ebidentzia gehiengoa zeharkakoa da, eta azterketa gehiago behar dira heste-mukosan disbiosiak zitokina horien adierazpen desorekatua nola bultza lezakeen azaltzeko.

Izan ere, asoziazioetik kausalitatera igaro ahal izateko, eskala handiko azterketa longitudinalak behar dira; infekzio birikoek eta hesteetako mikrobiotaren osaerak glutenarekiko tolerantzia-galeran eta suszeptibilitate genetikoaren duten pertsonengan eraginik izan dezaketen eta EZ nola eragin dezaketen zehazteko.

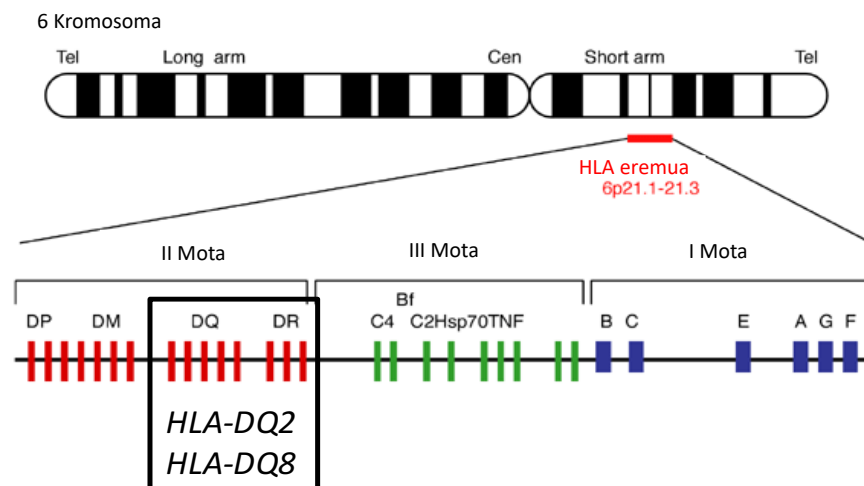
### **1.1.3. EZren genetika**

EZren herentzia-eredu zehatza zein den oraindik ez dakigun arren, EZk heredagarritasun handia duela jakina da (Nisticò et al., 2006). Heredagarritasun patroia ez-Mendeldar konplexuko gaixotasun poligenikoen artean sailkatzen da, eta bertan MHCko eta MHCkoak ez diren geneek parte hartzen dute. Gaixotasunarekiko suszeptibilitatearen aurrekari genetiko sendoaren ebidentzia EZ duten familietan egindako prebalentzia ikerketetatik dator. Bereziki, bikien bikoteak alderatzen dituzten azterketetatik, kasu horietan gaixotasunaren prebalentzian arrisku-faktore genetikoaren eta ingurumenekoaren proportzioa zenbatetsi baitaiteke. Ikerketa horien arabera, genetika funtsezko eragilea da, bai EZren sorreran, bai ondorengo garapenean eta %87 inguruko heredagarritasuna du (hau da, faktore genetikoei egotz dakiekeen EZ izateko arriskuaren proportzioa, ingurumeneko eragileekin alderatuta) (Greco et al., 2002).

EZ garatzeko arrisku genetikoaren %40, gutxi gorabehera, giza antigeno leukozitarioaren (ingelesez Human Leukocyte Antigen edo HLA) geneei dagokie; eta mapaketa fineko azterketek HLA ez diren eskualde gehigarriak erakutsi dituzte, zeinak, oro har, heredagarritasunaren %7 gehigarria osatzen duten (Caio et al., 2019).

### 1.1.3.1. MHC geneak

HLA geneak MHCren parte dira eta 6p21 eskualde kromosomikoan daude. Ereku honek erantzun immunearekin erlazionaturiko gene asko ditu eta lotura-desoreka (LD) handia zein kontserbatutako haplotipo-bloke hedatuak ditu ezaugarri. HLA geneek giza zelula gehienetan adierazten dira eta antigenoak aurkezten dituzten proteinak kodetzen dituzte, funtsezkoak izanik organismoak molekula propioak eta arrotzak bereiz ditzan (Ainara Castellanos-Rubio & Bilbao, 2018; de Haas et al., 2014). HLA geneen polimorfismoek peptidoekiko lotura-uneak moldatu eta modu eraginkorrean elkartu eta aurkez daitezkeen peptidoen lotura-ahalmena alda ditzakete.



## 2. Irudia. HLA geneak.

EZ garatzeko arrisku genetiko handiena II. motako HLA geneek kodetutako HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 heterodimeroen presentziatik dator (2. irudia). Kalkulatu da II. motako HLAREN aldaera klasikoek EZren heredagarritasunaren %23 azaltzen dutela. Gainera, HLA-DQ2 molekulek HLA-DQ8k baino asoziazio indartsuagoa dute EZrekin (Louka & Sollid, 2003); izan ere, HLA-DQ2ren homozigosiak hasiera goiztiarreko EZ garatzeko arriskua emendatzen du, glutenaren peptidoak CD4+ T zelulei aurkezteko eraginkortasun handiagoa duelako (Vader et al., 2003). Gaixotasunaren patogenesisian molekula horien zeregina funtsezkoa bada ere, herentzian duten ekarpena apala da. Gainera, HLA-DQ2 zein HLA-DQ8 ohikoak dira populazio orokorrean (%25-35), eta banako horietako proportzio txiki batek soilik



garatuko du EZ (Caio et al., 2019). Beraz, EZ garatzeko arrisku genetikoa areagotzen duten gene gehigarriak aurkitzeak gaixotasunaren patogenesian inplikaturata egon daitezkeen funtsezko bide berriak aurkitzera eramane dezake.

MHC eskualdearen konplexutasunak, batez ere gene ugariak, polimorfismo-maila altuak eta lotura-desoreka zabalak, oso zaila egin dute eskualde horretan arrisku-aldaira gehigarriak identifikatzea. Hala ere, MHC eskualdearen mapaketa finak, bost aldaira independente berri identifikatu ahal izan zituen eskualde horretan. Bost faktore horiek gaixotasunaren heredagarritasunaren %18 gehigarria azaltzen dute (Gutierrez-Achury et al., 2015). Oro har, MHCren arrisku-aldairei gaixotasunaren heredagarritasunaren %40 dagokie eta beraz, zati handi bat oraindik azaldu gabe dago.

#### 1.1.3.2. *Ez-MHC geneak*

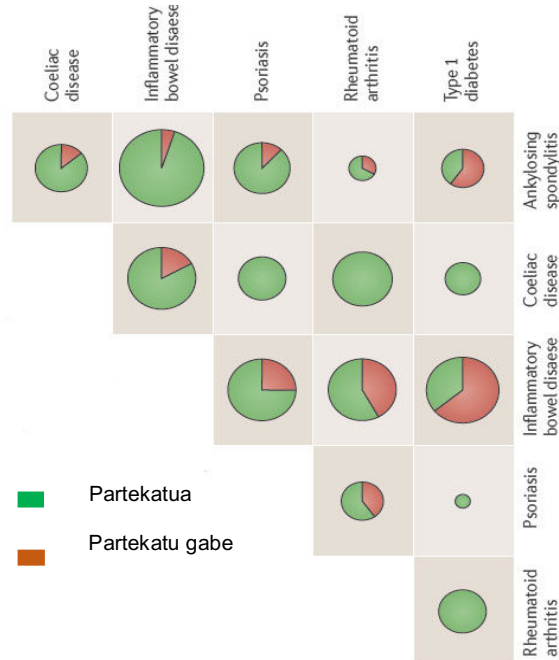
Denbora luzez, MHC eskualdean kokatutako aldaira genetikoak EZren arriskua faktore genetiko bakartzat hartu ziren. Hala ere, argi zegoen EZrekin lotutako HLA-DQ molekula ez zirela nahikoa EZren garapena eragiteko. Kaltetutako familien arteko lotura-ikerketetan oinarritutako ikuspegiak eta biztanleriaren baheketan oinarritutako asoziazio-azterketek MHC ez diren arrisku-gune berriak identifikatzen lagundu dute.

Familiarteko lotura azterketei esker, familia bateko kideek hainbat belaunalditan behin eta berriz eta modu sistematikoan heredatzen dituzten eskualde kromosomikoak identifika daitezke (Gujral et al., 2012; van Heel et al., 2005). Hala ere, MHC lokusean izan ezik, lotura-ikerketen emaitzak kontraesankorrak izan dira.

Gaixotasun konplexuen genetikaren benetako iraultza errendimendu handiko genotipatze-plataformekin iritsi zen, genoma osoaren asoziazio-azterketak (ingelesez Genome Wide Association Study edo GWAS) egingarri bihurtu baitzituzten. Teknologia berritzaile horiei esker, gaixotasunen eta ezaugarri konplexuen azterketa genetikoak lantzeko modua aldatu zen. GWAS tresna

boteretsu bat bihurtu da gaur egun; ikertzaileek lagin multzo handietan (kasuak eta kontrolak) DNA genomikoaren markatzaile genetiko ugari (polimorfismoak) eskaneatzea ahalbidetzen duena, gaixotasun jakin batekin lotutako aldaera genetikoak aurkitzeko helburuarekin. EZn egindako bi GWASek 5.000 paziente eta 10.000 kontrol inguru aztertu zituzten, eta HLAtik kanpoko 26 eskualde agertu ziren gaixotasunarekin asoziatuta (Dubois et al., 2010; Van Heel et al., 2007).

GWASen beste aurkikuntza nagusietako bat izan zen osagai genetikoaren zati bat EZ ez den bestelako gaixotasun immuneekin partekatzen dela. Horrek iradokitzen du patologia horiek bide molekular berdinen eraginpean egon daitezkeela (3. irudia) (Cotsapas et al., 2011; Kumar et al., 2014).

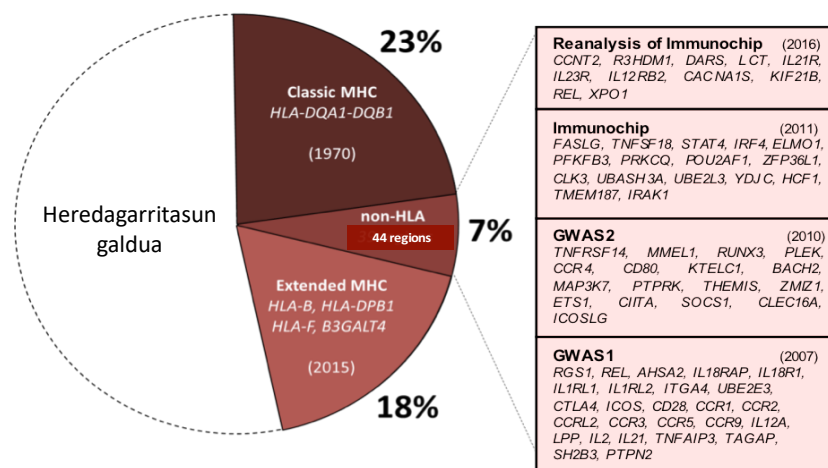


**3. Irudia.** Gaixotasun immune desberdinen artean partekatutako osagai genetikoak, (Parkes et al., 2013) moldatua.

Idea horretatik abiatuta, hainbat ikuspegi berri garatu eta asoziatutako eskualde berriak identifikatu dira (Festen et al., 2011; Smyth et al., 2008), batez ere, *ImmunoChip* proiektuarekin. GWAS plataformen diseinuak polimorfismo genetiko arrunten azterketan jarri zuen arreta osoa, eta ez zuen ahalbidetu edozein lokusetan gaixotasunarekin lotutako aldaera genetiko guztiak atzematea, ezta benetako

arrisku-aldaerak guztiak identifikatzea. Oraindik falta zen heredagarritasuna argitzeko eta aurkitutako seinaleak fintzeko garatu zen *ImmunoChip*, seinaleen kokapena eta gaixotasunen arteko konparaketa hobetuz. *ImmunoChip* erabiliz 12.000 kasu eta 12.000 kontrol inguru genotipatu ziren, eta EZrekin lotutako 13 eskualde gehigarri identifikatu ziren (Gosia Trynka et al., 2011). Ondoren, emaitzen berrazterketa batek EZrekin asoziatuiko bost eskualde genomiko berri identifikatu zituen (Garcia-Etxebarria et al., 2016).

Oro har, EZrekin lotutako 44 HLAtik kanpoko eskualde ezagun dira, eta bertan dauden 62 asoziazio-seinale independenteek arrisku genetikoaren %5 eta %7 arteko ekarpena gehitzen dute, orohar (4. irudia). Eskualde horietako batzuetan gene hautagai bakarra nabarmendu da, baina asoziatutako SNPetako 3 besterik ez daude proteinak kodetzen dituzten exonetan kokatuta. Beste zenbait kasutan, balizko gene eragileak proposatu dira, asoziazio-seinaleak 5' edo 3' eskualde erregulatzaileretatik gertu daudelako. Baina beste gaixotasun konplexu batzuekin asoziatutako SNPak bezala, aldaera gehienak genomaren eskualde ez-kodetzaileretan daude (gune promotoretan, areagotzaileretan edo are RNA ez-kodetzaileretan ere) (Ricaño-Ponce et al., 2016).



#### 4. Irudia. EZren heredagarritasuna.

GWASek eta ondorengo jarraipen-azterlanek EZ eragin dezaketen lokusen aurkikuntzan arrakastatsu izan diren arren, identifikatutako aldaerek ekarpen genetikoaren proportzio txikia baino ez dute azaltzen, eta askoz gehiago gelditzen dira oraindik aurkitzeko. Gainera, ziurrenik, GWASeko SNP gehienak ez dira kausazko aldaerak, eta uste da LDren ondorioz asoziatutako eskualdeak erakusten dituztela soilik; beraz, eskualde horiek sakonago aztertu behar dira.

Laburbilduz, EZren Genetika osatu gabe dago oraindik, eta ezagunak diren faktore genetikoek EZren heredagarritasunaren erdia azal dezakete gutxi gorabehera. Badago "heredagarritasun galdua" izeneko eten kritikoa, medikuntza genomikoan egindako ahalegin izugarriari oztopo egiten diena. Asoziatutako polimorfismoen ondorio biologikoak ulertzea oso lan zaila da eta oraindik ez da erabat osatu (Farh et al., 2015). Ildo horretan, ikuspegi berriak behar dira gaixotasunaren osagai genetikoak argitzeko. Marka epigenetikoak, DNAREN sekuentziatik independentea den informazio genomiko gisa ulertua, edota mikrobiomaren osaeraren azterketak geroz eta interes handiagoa duten eremuak dira (Fernandez-Jimenez et al., 2019).

#### **1.1.4. EZri asoziatutako SNPen azterketa funtzionalak**

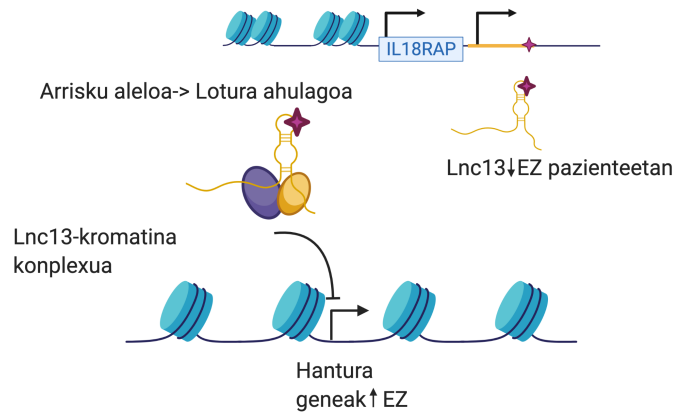
Asoziazio-seinaleen azpian dauden efektu funtzionalak ulertzeko saiakera gehienak inguruko geneen adierazpen-mailak aldatzen izan ditzaketen alterazioak bilatzera mugatu dira (ingelesez expression quantitative trait *loci* edo eQTL) eta emaitzak murrizak izan dira. Guzti horrek egoera konplexuagoa iradokitzen du EZren patogeniaren agertokian (Plaza-Izurieta et al., 2015).

Aipatu bezala, gaixotasun konplexuekin asoziatutako SNPen %85 baino gehiago genomaren eskualde ez-kodetzaileetan daude (gune promotoreetan, areagotzaileetan edo RNA ez-kodetzaileetan) eta horrek zaildu egiten du parte har dezaketen mekanismo molekularrak deskribatzea. Aurreko aurkikuntzek erakutsi dutenez, aldaketa fenotipikoekin lotutako aldaera genetiko ez-kodetzaileak eskualde erregulatzaile ehun-espezifikoetan daude askotan (Roadmap Epigenomics

Consortium et al., 2015). Ideia horrek interes handia piztu du gene ez-kodetzaileek gaixotasunekiko suszeptibilitatean duten eraginaren azterketan.

Berriki garatutako RNAren sekuentziazio-teknikak ez dira soilik ezagunak diren transkriptoetara mugatzen eta giza genoma ez-kodetzailearen ia %70ak transkripzio-jarduera baduela frogatu dute. Horrela, gaixotasunen patogenian inplikaturik egon daitezkeen RNA berriak identifikatzen lagundu dute (Ainara Castellanos-Rubio & Bilbao, 2018; Mowel et al., 2018). RNA ez-kodetzaileak (ingelesez non-coding RNA edo ncRNA) modu honetan sailka daitezke: ncRNA laburrak (<30 nukleotido) eta ncRNA luzeak (>200 nukleotido). RNA luze ez-kodetzaileak (ingelesez long non-coding RNA edo lncRNA) dira deskribatu berri diren elementu horien artean klaserik ugariena, eta prozesu biologiko desberdin asko erregula ditzaketen milaka lncRNA identifikatu dituzte (Robinson et al., 2020).

EZri asoziatutako SNPen izaera erregulatzaileraren adibidea *lnc13* izeneko lncRNA da, *IL18RAP* genetik gertu dagoena eta EZri lotutako rs917997 SNPa barne hartzen duena. *lnc13* lncRNAren ezaugarri funtzionalak EZrekin asoziatutako SNP intergenikoaren genotipoaren eraginpean daude, eta NF- $\kappa$ B bidezidorreko geneen adierazpenean funtsezko erregulatzailea dela frogatu da. *lnc13k* aldazio bezala funtzionatzen du, kromatinara lotzen den proteina-konplexu bat EZn aldatuak dauden zenbait geneen transkripzio gunera gehitzen laguntzeko, eta beren adierazpena inhibitzeko. EZren arrisku-aleloa daraman *lnc13* lncRNA ez da hain modu eraginkorrean lotzen proteina-konplexuari eta horrek hanturazko geneen adierazpena areagotzea eragiten du; azken finean, gaixotasunaren garapena bultzatzen du (5. irudia) (Ainara Castellanos-Rubio et al., 2016).



**5. Irudia.** EZri asoziaturiko rs917997 SNParen azterketa funtzionala. Olazagoitia-Garmendia et al. (2020) moldatua.

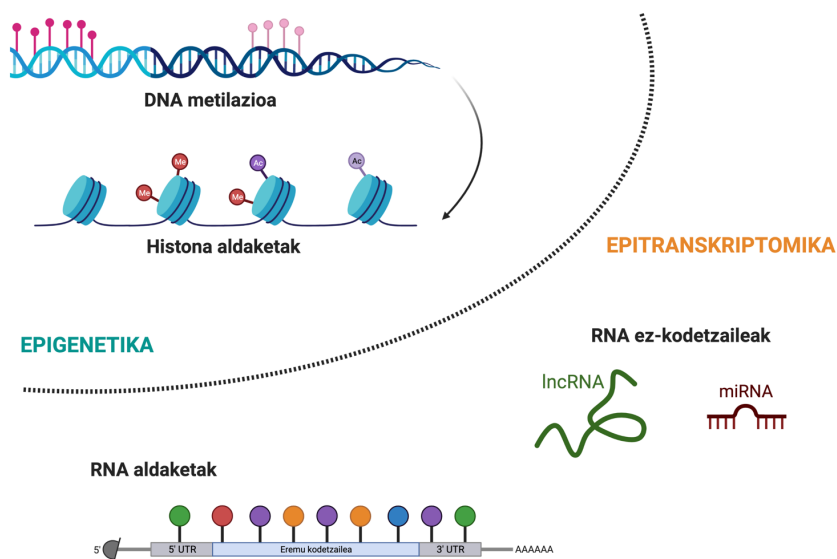
Nabarmentzekoa da *Inc13* modu berezian adierazten zela aztertutako ehunetan, eta horrek erakusten du bere funtzioa espezifikoa izan daitekeela zelula-motaren arabera. Gainera, hanturarekin lotutako beste SNP asko bezala, rs917997 beste gaixotasun autoimmunekin ere asoziatuta dago. EZren arrisku-aldaira T aleloa bada ere, babeslea da 1 motako diabetes mellitusaren (DM1) aurrean. Gure taldeak berriki argitaratutako lan batek *Inc13*ren funtzioa eta pankreako beta zelulen hantura aztertu zituen DM1en testuinguruan, eta *Inc13*ren mekanismo guztiz ezberdina aurkitu zuen. Era berean, asoziatutako SNP ez-kodetzaileentzat zelula-motaren testuinguruak duen garrantzia eta funtzioa nabarmendu zituen (Gonzalez-Moro et al., 2020).

Duela gutxi arte, proteinak kodetzen dituzten geneak genomaren eskualde funtzional bakartzat hartzen ziren, baina gaur egun oso argi dago eskualde ez-kodetzaileek ere badutela elementu erregulatzailerik, eta gene-erregulazioan funtsezko funtzioak betetzen dituzte. Beraz, gaixotasunekin asoziatutako aldaera ez-kodetzaileen ondorio funtzionalak argitzea lan zaila den arren, ezinbestekoa izango da gaixotasun immuneekin lotutako SNPek suszeptibilitate genetikoan duten eginkizuna argitzen laguntzeko.

## 1.2. EPITRANSKRIPDOMIKA

EZ pairatzeko joera genetikoa identifikatzeko ahalegin gehienak SNPen asoziazio-azterketetan oinarritu dira, baina orain arte identifikatutako aldaera genetiko arrunten ekarpena, HLA geneak barne, heredagarritasunaren %50 da, gutxi gorabehera. Hala ere, badago oraindik sakon analizatu gabeko informazio genomikoaren beste alderdi bat EZren patogenesisian parte hartu dezakeena, DNAREN sekuentzia aldaketatik independentea den Epigenetika, hain zuzen ere.

Epitranskriptomika esaten zaio RNAREN Epigenetikari eta Epigenetikaren adar horrek RNAREN aldaketak eta RNA ez-kodetzaileak biltzen ditu (6. irudia). Epitranskriptomikak funtsezko zeregina du moztitsasketa alternatiboan, esportazio nuklearrean, transkriptoen egonkortasunean eta itzulpenean. Gainera, marka epigenetiko horietan eragina izan dezaketen SNPek ere gero eta interes handiagoa piztu dute.

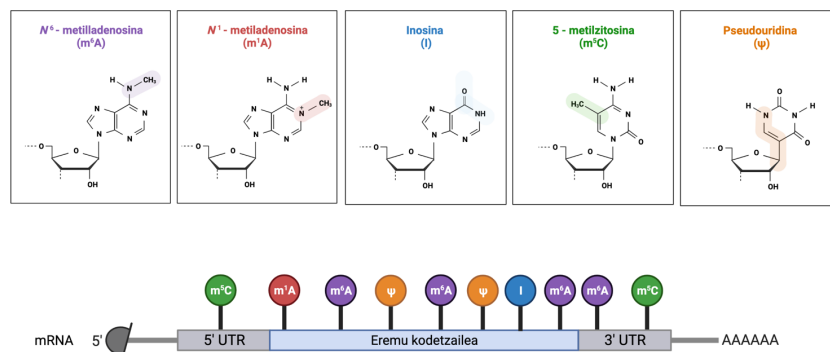


**6. Irudia.** Gaixotasunen patogenesisian parte hartu dezaketen marka epigenetiko eta epitranskriptomikoak. Biorenderrekin sortua.

Orain arte, 100 aldaketa kimikotik gora identifikatu dira RNAN (Machnicka et al., 2013). Modifikazio gehienak rRNA eta tRNAN aurkitu izan dira, eta mRNArenak berriz, ezohiko gertakaritzat hartu dira orain gutxi arte. Hala ere, berriki, mRNA

molekulen zenbait aldaketa identifikatu da, tartean N<sup>6</sup>-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012), N<sup>1</sup>-metiladenosina (m<sup>1</sup>A) (Dominissini et al., 2016), inosina (I) (Slotkin & Nishikura, 2013), 5-metilzitosina (m<sup>5</sup>C) (Squires et al., 2012) edo pseudouridina (ψ) (Carlile et al., 2014; Schwartz et al., 2014) (7. irudia). Horien guztien artean, m<sup>6</sup>A da mRNA eta lncRNAtan agertzen den modifikazio nagusia.

### mRNA Eukariotoen Ohiko Aldaketak



**7. Irudia** Ohiko mRNA aldaketak. Biorenderrekin sortua.

#### 1.2.1. N<sup>6</sup>-metiladenosina RNA aldaketa

1970eko hamarkadan N<sup>6</sup>-metiladenosina (m<sup>6</sup>A) RNAREN aldaketa kimiko ugariena zela ikusi zen lehen aldiz (Desrosiers et al., 1974). Hala ere, duela gutxi arte haren kokapen zehatzari buruz, agertzen den transkripto motei buruz edota m<sup>6</sup>A sortzen eta identifikatzen duten faktore zelularrei buruz gutxi zen jakina.

RNAtan m<sup>6</sup>A modifikazioa eragiten duen entzima 1990aren hamarkadaren amaieran identifikatu bazen ere, aldaketa horren inguruko interesa m<sup>6</sup>A mapatzeko genoma osoan azterketak egin zirenean handitu zen, m<sup>6</sup>Aren prebalentzia transkriptoma osoan agerian utzi baitzuten. Orduz geroztik, frogatu da m<sup>6</sup>A aldaketak RNAREN

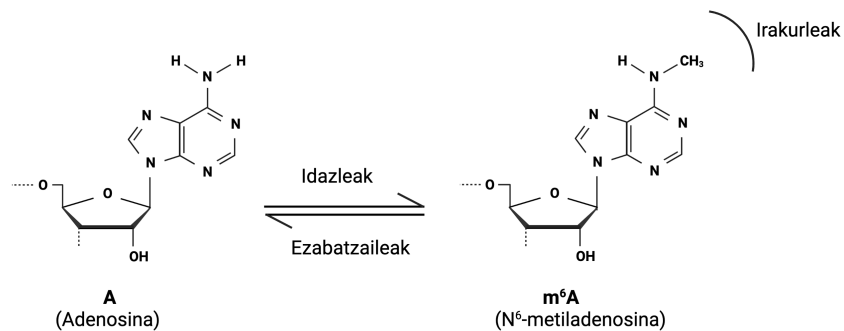


metabolismoaren hainbat alderditan parte hartzen duela eta berebiziko garrantzia duela prozesu zelular askotan. Hori dela eta, hainbat prozesu fisiologikotan adierazpen genikoa erregulatzeko geruza berri bilakatu da (Geula et al., 2015; Koranda et al., 2018; X. Wang et al., 2014, 2015).

RNA zelular ohikoetan adenosina guztien artean m<sup>6</sup>A %0,1etik %0,4ra bitartekoa da (C. M. Wei et al., 1975) eta batez ere DRACH kontsensu-sekuentzian gertatzen da (D = A, G edo U; R = G edo A; eta H = A, C edo U), batez ere R = G izanik (%70 inguru) (C. M. Wei et al., 1976; C. M. Wei & Moss, 1977). Geneen sekuentzia kodetzaileak (ingelesez coding sequence edo CDS), itzuli gabeko 3' eskualdeak (ingelesez untranslated region edo UTR) eta amaiera kodoien inguruak daude m<sup>6</sup>A marketan aberastuta. Hala ere, 5'UTRtan ere ageri dira eta belaunaldi berriko sekuentziazioan (ingelesez next-generation sequencing edo NGS) oinarritutako metodoek frogatu dute m<sup>6</sup>A ia RNA mota guztietan dagoela, lncRNA edo mikroRNAk (miRNA) barne (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012).

Arlo honetan egon den lorpen garrantzitsuenetakoa m<sup>6</sup>Aren erregulazioan inplikaturako proteinen aurkikuntza izan da. Gaur egun ezagunak dira m<sup>6</sup>A idazleak edo metilasak, hala nola N<sup>6</sup>-metiltransferasa proteiko konplexua (METTL3/METTL14) eta m<sup>6</sup>A ezabatzaileak edo demetilasak (FTO edo ALKBH5). Proteina horiek RNA molekuletako m<sup>6</sup>A mailak kontrolatzen dituzte, m<sup>6</sup>A metilazio markak gehitu edo ezabatuz (Huang et al., 2020). Bestaldek, m<sup>6</sup>A irakurleek RNA metilatuak identifikatu eta haien prozesamendua erregulatu dute (8. irudia), hala nola RNA nuklearren esportazioa, moztitsasketa, egonkortasuna, itzulpena edo miRNAren biogenesisia (Engel et al., 2018; Roignant & Soller, 2017; Shafik et al., 2016; P. Wang et al., 2016; Y. Yang et al., 2017; Zhu et al., 2014).

Are gehiago, m<sup>6</sup>A modifikazioa modu dinamikoan erregulatu da prozesu fisiologiko eta patologiko askotan, eta nahasmen askorekin lotu da, hala nola hantura, immunorregulazioa edota kartzinogenesiarekin (Siwei Wang et al., 2017; W. Wei et al., 2017).



## 8. Irudia. m<sup>6</sup>A RNA aldaketa. Biorenderrekin sortua.

### 1.2.1.1. m<sup>6</sup>A idazle, ezabatzaile eta irakurleak

#### 1.2.1.1.1. Idazleak

Nukleoan dagoen m<sup>6</sup>A metiltransferasa konplexuak edo "idazle konplexuak" m<sup>6</sup>A modifikazioa RNA ituetan jartzen du. Batez ere, METTL3 eta METTL14 heterodimeroek osatzen dute konplexua, beste zenbait proteina egokitzaila gehigarriekin batera.

METTL3, 70 kDa-ko proteina, 1997an identifikatu zen lehen aldiz, eta idazle konplexuaren osagai entzimatikoa da (Bokar et al., 1997). METTL3ren isilarazpenak HeLa eta HepG2 giza zeluletan m<sup>6</sup>A mailak gutxitzea dakar, eta aldi berean zelulen apoptosia eragiten du. Saguetan *Mettl3* ezabatze genomikoa enbrioientzat hilgarria izateak m<sup>6</sup>A metilazioaren garrantzi biologikoa azpimarratzen du (Geula et al., 2015). METTL14 aktibatzaile alosterikoa da eta RNA ituarekin bat egiteko gai da (J. Liu et al., 2014). Konplexuak S-adenosilmetionina (SAM) transferasaren metilo taldeen bidez instalatzen du m<sup>6</sup>A motiboa RNA ituetan (Bokar et al., 1997; J. Liu et al., 2014). WTAP moztitsaketa-faktorea da idazle-konplexuaren hirugarren osagai erabakigarria. Domeinu edo motibo ezagunik ez duen arren, WTAPek METTL3-METTL14 heterodimeroarekin bat egiten duela eta zeluletan m<sup>6</sup>A jartzen erregulatzen duela deskribatu da (Ping et al., 2014). WTAPek metilasa

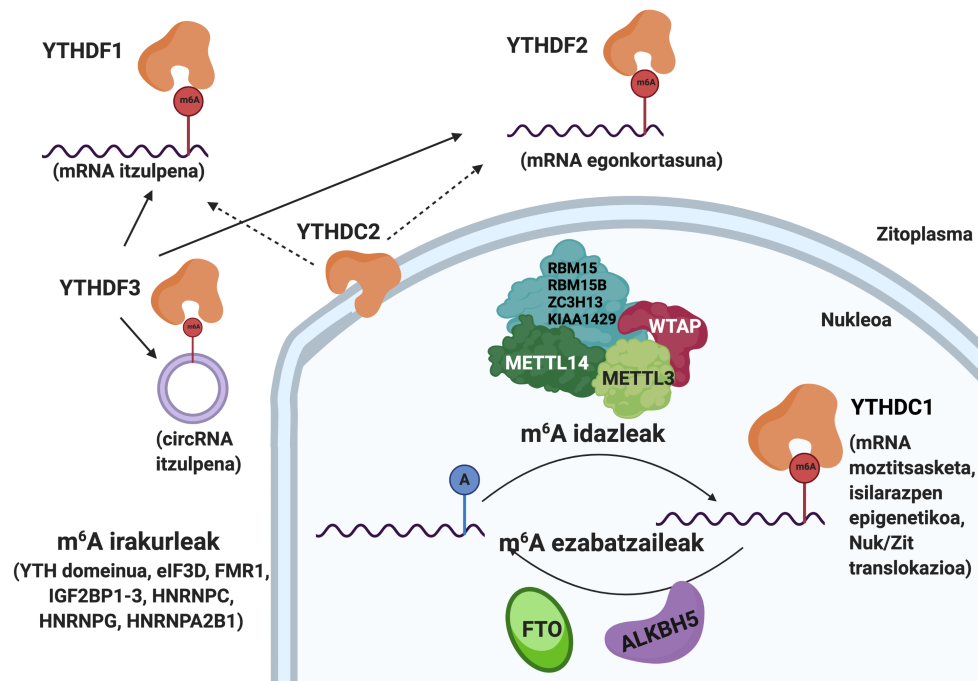
heterodimeroa gorputz nuklearretan kokatzea eta RNA ituak errekrutatzea ahalbidetzen du (Ping et al., 2014) (9. irudia). Idazle konplexuak ZC3H13, RBM15 edo RBM15B eta KIAA1429 (VIRMA izenez ere ezaguna) subunitateak ere hartzen ditu. ZC3H13k konplexuaren kokapen nuklearra mantentzen du (Wen et al., 2018) eta RBM15/15Bk (Patil et al., 2016) eta KIAA1429k (Schwartz et al., 2014) espezifikotasuna gehitzen dutela uste da.

Proteina idazle horiek DRACH kontsensu-sekuentzietako adenosinak metilatzen dituzte transkripzioan zehar. Transkripto bakoitzak metilazio-gune potentzial ugari dituen arren, m<sup>6</sup>A deposizioa mugatua da. Izan ere, RNA jakin batzuek baino ez dituzte m<sup>6</sup>A metilazio-markak, eta transkripto horietako kontsensu-guneen proportzio txikia baino ez dago metilatuta. Gainera, m<sup>6</sup>Aren estekiometria (metilatutako eta metilatu gabeko adenosinen arteko erlazioa) aldakorra da (Garcia-Campos et al., 2019; N. Liu et al., 2013; Zhang Zhang et al., 2019); beraz, deposizioaren espezifikotasunaren alderdi asko ez dira oraindik guztiz ezagunak.

Idazle konplexu kanonikoaz gain, badira m<sup>6</sup>A metiltransferasa gisa jarduten duten beste zenbait entzima. U6 RNA nuklear txikiak, MAT2A transkripto eta ziurrenik beste hainbat mRNA metilatzen ditu METTL16k (Pendleton et al., 2017); ZCCHC4k eta METTL5ek, aldiz, 18S eta 28S RNA erribosomikoei m<sup>6</sup>A markak gehitzen dizkiete (Ma et al., 2019; Van Tran et al., 2019). PCIF1k m<sup>6</sup>A metilazioa katalizatzen du m<sup>7</sup>G markadun mRNA molekulen transkripzio-hasiera gunean dauden 2-O-metilutako adeninetan, N<sup>6</sup>-2'-O-dimetiladenosina (m<sup>6</sup>Am) sortzeko (Akichika et al., 2019; Boulias et al., 2019; H. Sun et al., 2019).

#### 1.2.1.1.2. Ezabatzaileak

Aurkitu zen m<sup>6</sup>A metilo taldeak ezabatzen dituen lehenbiziko demetilasa FTO izan zen (Jia et al., 2011). Bestelako funtzioak ere dituen ALKBH5 demetilasa izaera geroago identifikatu zen (Zheng et al., 2013). Bai FTOk, bai ALKBH5ek Fe (II), a-KG eta substratuarekin bat egiten duten bi motibo aktibo dituen ALKB domeinua dute komunean, erdialdeko eskualdeetan (9. Irudia).



### 9. Irudia. M<sup>6</sup>A RNA modifikazioaren erregulazioa. Biorenderrekin sortua.

FTO eta ALKBH5ek ehun-espezifikotasuna eta kokapen intrazelular anitza erakutsi dituzte. Deskribatu denaren arabera, FTO oso ugaria da ehun adiposo eta garunean, eta ALKBH5 aldiz, testikuluetan adierazten da batez ere (Zheng et al., 2013). Beraz, FTO edo ALKBH5 bidezko demetilazioa ehun-espezifikoa izan daiteke.

FTOk m<sup>6</sup>A nahiz m<sup>6</sup>Am terminalak demetilatzeko gai da (J. Wei et al., 2018) eta ALKBH5k m<sup>6</sup>A demetilatzen du modu espezifikoa (Mauer et al., 2017; Zheng et al., 2013). Entzima ezabatzaile horiek m<sup>6</sup>A RNA aldaketa modu dinamikoan itzulgarria dela erakusten duten arren, azterketa sakonagoak beharrezkoak dira RNAREN demetilazioak bestelako testuinguru fisiologikoetan izan ditzakeen ondorioak ulertzeko.

#### 1.2.1.1.3. Irakurleak

m<sup>6</sup>Arekin elkartzeko gai diren proteina RNA-lotzaileei (ingelesez RNA-binding

protein edo RBP) m<sup>6</sup>A irakurleak esaten zaie. Proteina horiek m<sup>6</sup>A duten RNA molekulen funtzio erregulatuaren bitartekari dira, haien patuan eta ondorengo funtzioetan eraginez.

Gehien aztertu diren m<sup>6</sup>A irakurleak YTH domeinua duten proteinak dira, RNAn m<sup>6</sup>A bidez lotzen zaizkionak (F. Li et al., 2014; Xu et al., 2014, 2015; Zhu et al., 2014). YTH domeinudun bost proteina daude ugaztunen genomak: YTHDF proteina zitoplasmikoaren familia, oso antzeko hiru paralogo dituen (YTHDF1, YTHDF2 eta YTHDF3); ehun askotan adierazi eta batez ere nukleoan dagoen YTHDC1 (Nayler et al., 2000; Xiao et al., 2016) eta YTHDC2, adierazpen ehun-espezifiko duena eta nuklearra zein zitoplasmikoa izan daitekeena (Bailey et al., 2017; Wojtas et al., 2017) (9. irudia).

YTHDF proteinen artean antzekotasun handia dago aminoazidoen sekuentzietan, eta nahiz eta m<sup>6</sup>A duten mRNAren efektu espezifikoak ote dituzten eztabaidan egon, hainbat funtzio deskribatu dira kide bakoitzarentzat (Patil et al., 2018). YTHDF1ek eta itzulpenaren hastapen-faktoreek elkarri eragiten diotela ikusi da, m<sup>6</sup>A duten mRNAren itzulpena eragiteko (X. Wang et al., 2015); YTHDF2k berriz, CCR4-NOT deadenilasa konplexua errekrutatzen du YTHDF2ren N muturraren bidez, eta RNAren endekapena bideratzen du ugaztun-zeluletan (X. Wang et al., 2014). YTHDF3k m<sup>6</sup>A metilatutako RNAren itzulpena eta degradazioa bideratzen ditu (Shi et al., 2017). Gainera, m<sup>6</sup>A aldaera bereziki ugaria da RNA zirkularretan (ingelesez circular RNA edo circRNA), eta m<sup>6</sup>A marka bakar bat nahikoa da YTHDF3 errekrutatze eta eIF4G2 eta eIF3A itzulpenaren faktore abiarazleen bidez circRNAren itzulpena bultzatzeko (Y. Yang et al., 2017).

YTHDC1 m<sup>6</sup>A irakurle nuklear bat da, eta mRNAren mozti-sasketarekin (Kasowitz et al., 2018; Xiao et al., 2016), isilarazpen epigenetikoarekin (Patil et al., 2016) eta RNA metilatuen esportazio nuklearrarekin erlazionatu da (Roundtree et al., 2017).

YTHDC2 ugaria da testikuluetan eta mRNAren itzulpenean eta degradazioan parte

hartzen duela iradoki da (Hsu et al., 2017). YTHDC2 knock-out saguek batez ere espermatogenesiaren akatsak dituzte, eta horrek babesten du iradokitako funtzio testikulu-espezifikoa (Bailey et al., 2017; Hsu et al., 2017; Jain et al., 2018). Hala ere, online dauden datu-base genomikoen informazioaren arabera zelula immuneek YTHDC2 maila altuak adierazten dituzte, eta beraz, litekeena da irakurle horrek zelula immuneetan ere zeregina izatea.

YTH domeinudun m<sup>6</sup>A irakurleez gain, bereziki m<sup>6</sup>A duten RNArri lotzen zaizkien bestelako RBPak deskribatu dira. Horien artean daude eIF3D, FMR1, IGF2BP1-3, HNRNPC, HNRNPG eta HNRNPA2B1 (Alarcón et al., 2015; Arguello et al., 2017; Edupuganti et al., 2017; Huang et al., 2018; N. Liu et al., 2015, 2017; Meyer et al., 2015). Hala ere, proteina horien funtzio erregulaztaileak zein diren eta m<sup>6</sup>Arekin zuzenean lotzen diren edo m<sup>6</sup>A lotzaile kanonikoen bitartez zeharka lotzen diren ez dago oraindik argi. Gainera, m<sup>6</sup>Ak RNAREN bigarren mailako egitura aldatzeko duen joerak zaildu egiten du zehazten RNArri lotutako proteina zuzenean m<sup>6</sup>Arekin elkartzen den edo m<sup>6</sup>Ak aldatutako RNA egiturari lotzen zaion, irisgarritasuna handitu delako (Spitale et al., 2015; Zaccara et al., 2019).

**1.Taula.** m<sup>6</sup>A idazle, ezabatzaile eta irakurleen eta deskribaturiko funtzioen zerrenda.

Mota	Proteina	Funtzioa	Erreferentzia
<i>m<sup>6</sup>A idazleak</i>	METTL3	m <sup>6</sup> A aldaketa katalizatzen du.	(Bokar et al., 1997)
	METTL14	METTL3 laguntzen du substratua ezagutzen.	(J. Liu et al., 2014)
	WTAP	METTL3-METTL14 heterodimeroa gorputz nuklearretara eramaten du.	(Ping et al., 2014)
	ZC3H13	WTAP nukleoan ainguratzen du m <sup>6</sup> A metilazioa laguntzeko.	(Wen et al., 2018)
	KIAA1429	Metiltransferasaren osagaiak gidatzen ditu	(Schwartz et al., 2014)

		RNAren eremu espezifikoetara.	
	RBM15/RBM15B	m <sup>6</sup> A konplexuarekin lotzen da eta RNAren gune berezietara errekrutatzen du.	(Patil et al., 2016)
<b>m<sup>6</sup>A ezabatzaileak</b>	FTO	m <sup>6</sup> A aldaketa kentzen du.	(Jia et al., 2011)
	ALKBH5	m <sup>6</sup> A aldaketa kentzen du.	(Zheng et al., 2013)
<b>m<sup>6</sup>A irakurleak</b>	YTHDF1	mRNAren itzulpena sustatzen du.	(X. Wang et al., 2015)
	YTHDF2	mRNAren egonkortasuna murrizten du.	(X. Wang et al., 2014)
	YTHDF3	Itzulpenean edo endekapenean eragin dezake.	(Shi et al., 2017; Y. Yang et al., 2017)
	YTHDC1	RNAren moztitsasketa, isilarazpen epigenetikoa eta translokazio nuklearra sustatzen ditu.	(Kasowitz et al., 2018; Patil et al., 2016; Roundtree et al., 2017; Xiao et al., 2016)
	YTHDC2	Itzulpena edo mRNAren endekapena emendatzen ditu itu ehunetan.	(Hsu et al., 2017)

#### 1.2.1.2. m<sup>6</sup>A kuantifikazio metodoak

m<sup>6</sup>Aren aldaketek erregulatutako mekanismoak deszifratzeko interes geroz eta handiagoak batetik eta gaixotasunen garapenean duten inplikazioak bestetik areagotu dute m<sup>6</sup>A gune metilatuak identifikatzeko beharra. Gainera, gune indibidualen metilazio-egoerari buruzko informazio kuantitatiboa ematen duten teknikak interes berezikoak dira gaixotasunaren etapan arteko, prozesu zelularren arteko edo estimulu desberdinen aurretik eta erantzunaren ondorengo m<sup>6</sup>A mailak

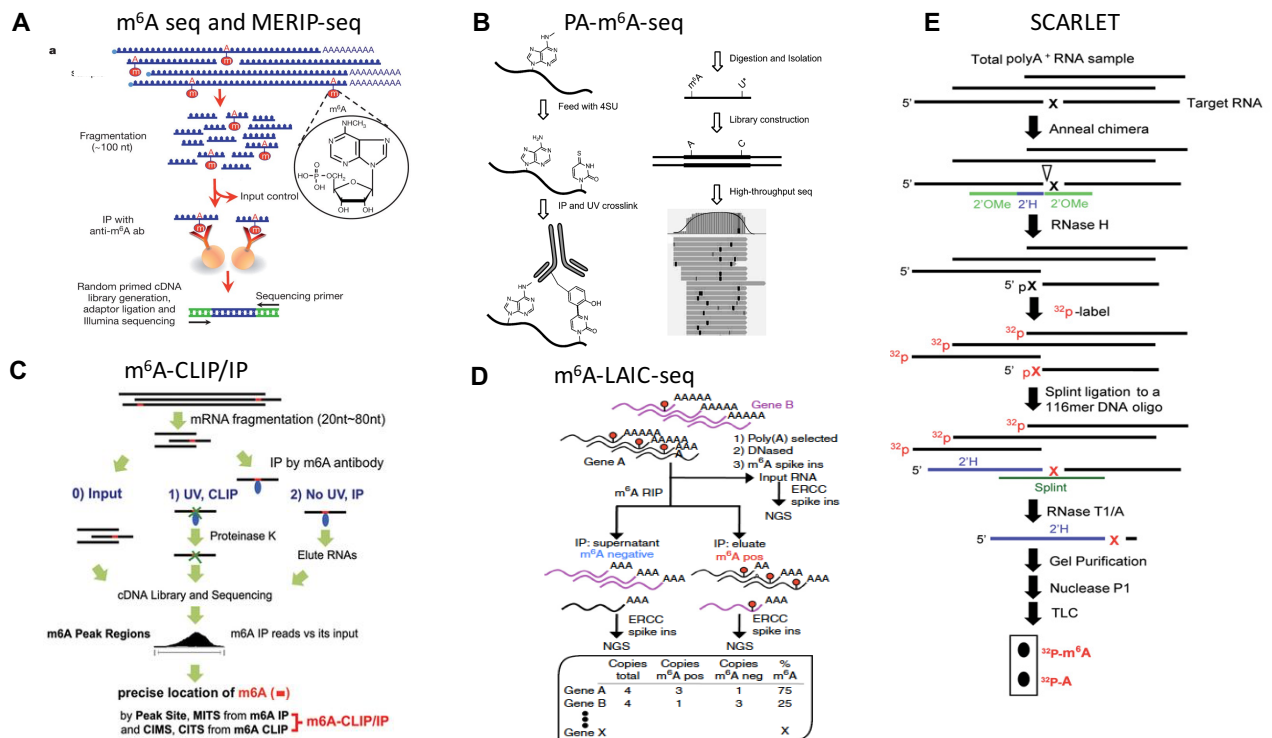
alderatzeko. Horretarako, hainbat teknika garatu dira, gehienak errendimendu handiko sekuentziazioan eta/edo m<sup>6</sup>Aren aurkako antigorputzen erabileran edo aldaketa kimikoetan oinarrituta. Horien artean sartzen dira, besteak beste, m<sup>6</sup>A RNA metilatu espezifikoen immunoprezipitazioaren (IP) osteko belaunaldi berriko sekuentziazioa (ingelesez m<sup>6</sup>A-specific methylated RNA immunoprecipitation (IP) with next-generation sequencing edo m<sup>6</sup>A-seq eta MERIP-seq) (10.A irudia) (Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012); foto-erretikulazioak lagundutako m<sup>6</sup>A sekuentziazioa (ingelesez Photo-crosslinking-assisted m<sup>6</sup>A sequencing edo PA-m<sup>6</sup>A-seq) (10.B irudia) (K. Chen et al., 2015); m<sup>6</sup>A nukleotido bakarreko erresoluzioko erretikulazio eta immunoprezipitazioa (ingelesez m<sup>6</sup>A individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation edo m<sup>6</sup>A-CLIP/IP eta miCLIP) (10.C irudia) (Ke et al., 2015; Linder et al., 2015); m<sup>6</sup>A-maila eta isoformen karakterizaziorako sekuentziazioa (ingelesez m<sup>6</sup>A-level and isoform-characterization sequencing edo m<sup>6</sup>A-LAIC-seq) (10.D irudia) (Molinie et al., 2016) edota gune-espezifikoko mozketak gehi markaketa erradioaktiboaren jarraian ligazio bidezko erauzketa eta geruza fineko kromatografia (ingelesez Site-specific cleavage and radioactive-labeling followed by ligation-assisted extraction and thin-layer chromatography edo SCARLET) (10.E irudia) (N. Liu et al., 2013).

Hala ere, teknika horiek guztiek protokolo luze eta neketsuak dituzte, teknikoki desafiatzaileak direnak. Gainera, gehienek errendimendu handiko sekuentziazioa edota m<sup>6</sup>A antigorputzak zein aldaketa kimikoak erabiltzea behar dute, eta ondorioz, ez dira laborategi guztientzat eskuragarri.

Era berean, zenbait polimerasek (adibidez BstI-k) m<sup>6</sup>A adenosinak erretrotranskribatzeko duten gaitasun murriztuan oinarritutako protokolo alternatiboak deskribatu dira (Harcourt et al., 2013; Shaoru Wang et al., 2016). Entzima horiek dagoeneko erabili dira gune espezifikoen m<sup>6</sup>A metilazio-mailak kuantifikatzeko, hasleen nukleotido bakarrez luzatuta eta luzapen-erreakzioaren produktuak poliakrilamidazko geleko elektroforesi bidez bereizita, baina esperimendu horiek ere denbora asko kontsumitzen dute (Harcourt et al., 2013;



Shaoru Wang et al., 2016; Zhou et al., 2015). Beraz, metodo eskuragarriak eta aplikatzeko errazak bereziki interesgarriak dira marka epigenetiko hau ulertzen laguntzeko eta gaixotasunen patogenesisian duen parte-hartzea argitzeko.



**10. irudia.** **A)** m<sup>6</sup>A-seq diagrama eskematikoa, Dominissini et al. 2012tik eraldatua. **B)** PA-m<sup>6</sup>A-seq diagrama eskematikoa, Chen et al. 2015tik eraldatua. **C)** m<sup>6</sup>A-CLIP/IP diagrama eskematikoa, Ke et al. 2015tik eraldatua. m<sup>6</sup>A-k eragindako trunkazio-guneak (MITS); gurutzaketak eragindako mutazio-guneak (CIMS; base bakarreko ordezkapenak, delezioak eta txertaketak barne) (C. Zhang & Darnell, 2011) eta gurutzaketak eragindako truntzio-guneak (CITS) (König et al., 2010). **D)** m<sup>6</sup>A-LAIC-seq diagrama eskematikoa, Molinie et al. 2016tik eraldatua. **E)** SCARLET diagrama eskematikoa, Liu et al. 2013tik eraldatua.

### 1.2.1.3. m<sup>6</sup>A metilazioa Inflamazioan eta Gaixotasunetan

m<sup>6</sup>Aren izaera dinamikoaren bidez, autoimmunitatearekin eta tolerantzia immunearekin lotutako hainbat bidezidorretan inplikatur dauden estres zelularren seinalei erantzun azkarra eman dakieke zelulak (Shulman & Stern-Ginossar, 2020;

Winkler et al., 2019). Horrek areagotu egin du m<sup>6</sup>A metilazioak nahasmen fisiopatologiko ugaritan duen paperari buruzko ikerketa azken urteotan.

#### 1.2.1.3.1. m<sup>6</sup>A Metilazioa eta Erantzun Inflamatorioa

Gaixotasun pulpar eta periapikaletan, infekzio bakterianoa faktore patogeniko garrantzitsua da (Feng et al., 2018) eta duela gutxiko aurkikuntzek adierazten dute METTL3ren adierazpena eta m<sup>6</sup>Aren aldaketa-mailak emendatuak daudela LPSrekin tratatutako giza hortz-muineko zeluletan. Gainera, METTL3ren isilarazpenak LPSk eragindako hanturazko zitokinen adierazpena murrizten du, *IL6* eta *IL8*, besteak beste. Horrez gain, hantura-erantzunetarako gakoak diren NF-κB eta MAPK seinaleztapen-bideak ere itzaltzen ditu.

#### 1.2.1.3.2. m<sup>6</sup>A Metilazioa eta Berezko Immunitate Sistema

Berezko immunitateak berebiziko garrantzia du erantzun immunearen lehen urratsetan, eta funtsezkoa da patogenoak ezagutu eta horien aurkako lehen erantzuna hasteko. RNAren aldaketek ezagutze-urrats horietan zeresana dutela iradoki da; izan ere, *in vitro* transkribatutako RNAri gehitzen zaizkion nukleotido eraldatuek (m<sup>6</sup>A barne) TLR3 eta RIG-I aktibazioa gutxiagotzen dute (Durbin et al., 2016; Karikó et al., 2005). Beraz, egun uste da birusek m<sup>6</sup>A bidez eraldatutako RNA birikoak erabiltzen dituztela, ostalariaren berezko immunitateak ezagut ez ditzan. RNA biralen presentzia duela 40 urte baino gehiago deskribatu zen, eta gaur egun m<sup>6</sup>A genomatik eta transkriptoetan duten birusen espektro zabal bat ezaguna da, norabide positibo eta negatiboko RNA genomatik birusak, erretrobirusak eta DNA birusak barne. Gainera, circRNAtako edo interferentziako RNA laburretako (siRNA) m<sup>6</sup>A aldaketek immunogenizitatea murrizten dutela dirudi, beren jardueran inolako eraginik detektatu ez bada ere (Imaeda et al., 2019).

Nahiz eta GIB-1 birusak kutsatutako CD4+ T giza zelulek m<sup>6</sup>A ugaritzea eragin dezaketen, bai T zeluletan, bai GIB-1 birusaren mRNAren (Lichinchi et al., 2016); kontrakoa dirudien m<sup>6</sup>A mekanismoa deskribatu da eragindako giza zitomegalobirus herpesbirusaren (ingelesez herpesvirus human cytomegalovirus edo HCMV)

infekzioari I motako interferoiak ematen dion erantzunean. m<sup>6</sup>A metilazioa murrizteak IFNBren mRNAren egonkortasuna handitzea eta IFN-b-ren ekoizpen iraunkorra areagotzea eragiten ditu, eta horrek birusen aurkako erantzun indartsuagoa eragiten du HCMVren hazkundera blokeatzeko (Winkler et al., 2019).

#### 1.2.1.3.3. m<sup>6</sup>A Metilazioa eta Immunitate Sistema Egokitzaila

m<sup>6</sup>Aren metilazioa T zelulen homeostasiarekin ere lotu izan da. Zitokinen seinaleztapena ezabatzen duten proteinen familiak (ingelesez suppressor of cytokine signaling edo SOCS) berebiziko garrantzia du T zelulen ugalketan eta bereizketan, eta bitxia bada ere, hiru SOCS geneek m<sup>6</sup>A metilazio-maila handiak dituztela aurkitu da. m<sup>6</sup>Aren aldaketak SOCS geneen mRNAren endekapena eragiten duela deskribatu da, eta horrek T zelula naifen ugalketa eta desberdintzapenerako birprogramatzea abiarazten du (H. B. Li et al., 2017; Palmer & Restifo, 2009). Beraz, aldaketa hori, seguruenik, funtsezko faktorea da homeostasi immunologikoa erregulatzeko eta hainbat gaixotasun autoimmune arintzeko.

Beste lan batek frogatu zuen m<sup>6</sup>Ak paper garrantzitsua jokatzen duela zelula dendritikoak (ingelesez dendritic cells edo DC) zelula heldugabeak izatetik T zelulen aktibatzaile eraginkorrak izaterainoko trantsizioan. Zelula horiek molekula koestimulatzaileak adierazten dituzte eta erantzun immune egokitzailaren hasiera sustatzen dute antigenoen aurkezpenaren bidez (Feng et al., 2018; H. Wang et al., 2019).

#### 1.2.1.3.4. m<sup>6</sup>A Metilazioa eta Mikrobioma

Hesteetako mikrobiotak ostalariaren fisiologia eta adierazpen genikoa modulatu ditu erabat ulertzen ez diren mekanismoen bidez. Duela gutxi egindako lan baten arabera, hesteetako mikrobiotaren aldakuntza lotuta dago itsuko m<sup>6</sup>A aldaketekin eta horiek metabolismoarekin, hanturarekin eta mikrobioen aurkako erantzunekin lotutako bidezidorretan eraginez (Jabs et al., 2020). Emaitza horiek nabarmentzen dute m<sup>6</sup>A modifikazioaren papera mikrobiotaren eta ostalariaren arteko komunikazio

maila gehigarri gisa.

#### 1.2.1.3.5. m<sup>6</sup>A Metilazioa eta Gaixotasun Autoimmuneak

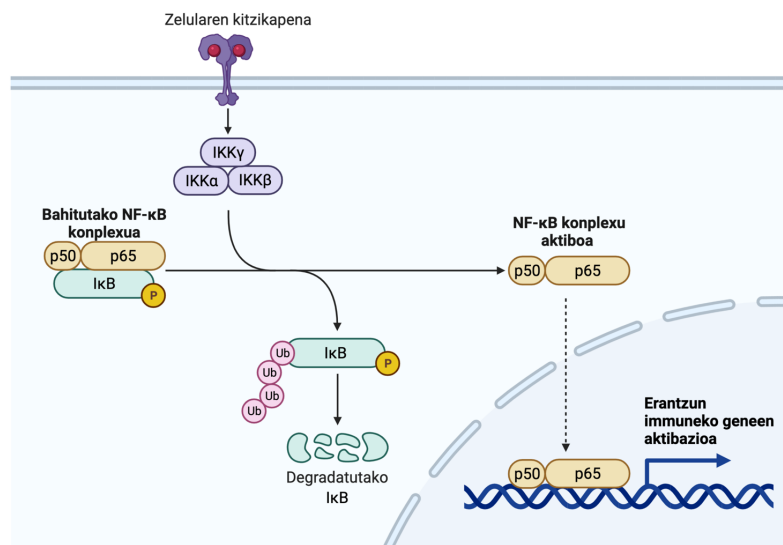
Prozesu biologikoen espektro zabal baten erregulazioan parte hartzen duenez, m<sup>6</sup>A metilazioa gaixotasun anitzekin lotu da nabarmen (Jiang et al., 2021; C. Yang et al., 2020). m<sup>6</sup>Ak minbiziaren hainbat urrats fisiopatologiko erregulatzen dituela deskribatu da, hala nola minbiziaren zelula amen pluripotentzia, minbizi-zelulen ugalketaren erregulazioa, kimioterapiaren eta erradioterapiaren aurkako erresistentzia edo tumoreen aurkako immunitatea (C. Yang et al., 2020). Gainera, asaldura neuronalak, hala nola nerbioen kalteak eta malformazioak; zenbait nahasmendu psikiatriko edota osteoporosia ere m<sup>6</sup>A metilazioak erregulatzen dituela deskribatu da. Azkenik, aldaketa hori gaixotasun metabolikoekin ere lotuta dago, obesitatearekin eta lipidoen edo glukosaren metabolismoarekin, hain zuzen ere (C. Yang et al., 2020).

T zeluletako RNAren metilazioaren perturbazioa kolitisaren garapenarekin asoziatu da berriki (Lu et al., 2020). Halaber, jakinarazi da *Ythdf1* galtzeak tumoreen hazkuntza eta ostalariaren biziraupena eragozten dituela sagu eredu batean (D. Han et al., 2019). Beraz, m<sup>6</sup>A edota YTHDF1 immunoterapiarako iturri potentzial berriak izan litezke, beste estrategia batzuekin batera.

Hala ere, gaixotasun immune eta inflamatorioekin erlazionatutako SNPek epitranskriptomaren aldakortasunean duten eragina ez da sistematikoki aztertu. Duela gutxi egindako azterlanak erakutsi zuen m<sup>6</sup>A-QTL (m<sup>6</sup>A Quantitative Trait Loci) direlakoak ugariak direla nahasmendu konplexuetan, tartean gaixotasun autoimmuneetan, eta horrek gaixotasun-espezifikoak diren azterketen beharra azpimarratzen du (Zijie Zhang et al., 2020). Beraz, EZrekin asoziatutako SNPek m<sup>6</sup>A markak alda ditzaketen modua eta ondorioz, glutena irensteak eragindako hantura-erantzuna bultzatzen duten mekanismo molekularrak erregulatzea hobeto ulertzeak gaixotasun horren patogeniari buruzko informazio-geruza erabat berria eman lezake, bai eta estrategia terapeutiko berriak garatzeko ateak ireki ere.

### 1.3. NF- $\kappa$ B-ren ERREGULAZIOA, GENETIKATIK EPITRANSKRIPATOMIKARA

NF- $\kappa$ B transkripzio-faktore nuklearrak berezko erantzun immunearen zein egokitzaileren funtsezko erregulatzailak dira, eta NF- $\kappa$ B seinaleztapenaren asaldurek nahasmendu immunologikoen patogenesisian laguntzen dute. NF- $\kappa$ B hantura-bitartekari oso ezaguna da, eta bere aktibazio deserregulatu gaixotasun autoimmuneetako inflamazio kronikoarekin lotuta dago. NF- $\kappa$ B-k hanturazko erantzuna eta erantzun immunitarioa erregulatzen ditu, gene espezifikoien adierazpena areagotuz (S. C. Sun et al., 2013; Viatour et al., 2005). Frogatu da NF- $\kappa$ B bidezidorra EZko mukosan gainadierazia dagoela modu konstitutiboan, bai eta NF- $\kappa$ B-k erregulatzen dituen zitokina proinflamatorioak, atxikipen-molekulak eta entzimen adierazpen genikoa gaixotasun zeliakoaren patogenian inplikatua daudela ere (Fernandez-jimenez et al., 2014; Maiuri et al., 2003).



**11. Irudia.** NF- $\kappa$ B bidezidorraren aktibazioaren irudi eskematikoa. Estimulazio aurrean, I $\kappa$ B fosforilatu eta degradatzen da IKK konplexuaren bitartez, NF- $\kappa$ B konplexu aktiboa askatuz. NF- $\kappa$ B konplexu aktibo askea nukleoan sartzeko gai da eta itu-geneen promotoreei lotzeko gai da immunitate- eta hantura-geneen transkripzioa aktibatzen. Biorenderrekin sortua.

DNA sekuentzia espezifiko batekin lotzeko gaitasuna duten transkripzio-faktoreen multzoak osatzen du NF- $\kappa$ B familia (Baldwin, 1996; Grilli et al., 1993). Zelula mota gehienetan, NF- $\kappa$ B RelA (p65) eta NF $\kappa$ B1 (p50) subunitateek osatuako heterodimero moduan existitzen da, beraz NF- $\kappa$ B familiako gene transaktibatzaile indartsuena izanik (Sunil et al., 2010). Normalean, NF- $\kappa$ B faktoreak zitoplasman bahituta egoten dira, proteina inhibitzaileen familiako kide bati elkarturik, hala nola kappa-B-alfa inhibitzaileari (I $\kappa$ B- $\alpha$ ) eta ankirina errepikapenak dituzten erlazionatutako proteinei (S. C. Sun et al., 2013). Zelulen estimulazioak zenbait seinaleztapen-gertaera kliskatzen ditu eta bidearen bukaeran, I $\kappa$ B-kinasa konplexuek (IKK) I $\kappa$ B-ren fosforilazioa, poliubikitinazioa eta proteosoma bidezko degradazioa eragiten dituzte. Ondorioz, NF- $\kappa$ B aktiboa nukleora sartzeko gai da eta zenbait itu-generen promotoreetako NF- $\kappa$ B ituetara lotzen da, haien transkripzioa areagotzeko (Viatour et al., 2005) (Fig11).

Hainbat eragilek aktiba dezake NF- $\kappa$ B, hala nola zitokinek, hazkunde-faktoreek, T zelulen mitogenoek, estres oxidatzaileak, bakterioek, birusek eta horien produktuek. Hainbat estimulak aktibatu ondoren, NF- $\kappa$ B-k hanturazko erantzun goiztiarrean inplikaturako gene askoren transkripzioa erregulatzen du, CXCL8 (IL8) (Roebuck, 1999) eta CXCL10 (Yeruva et al., 2008) kimiokinak barne. IL8 CXC kimiokina proinflamatorioa da, neutrofiloen kimiotaxia sustatzearekin eta degranulazioarekin lotua (Struyf et al., 2005). IL8 proteina zelula mota anitzek jariatzen dute, tartean IECK (Fusunyan et al., 1998; H. Kim et al., 2001). Gainera, frogatu da estres oxidatzailea, NF- $\kappa$ B-ren aktibazioa eta IL15aren gainadierazpena direla gliadinak enterozitoetan eragiten dituen ondorioen erantzuleak (Parmar et al., 2013). IL8 aldiz, glutenari erantzuten dion kimiokina da, eta ondorioz, pentsa daiteke bidezidorraren erregulazio egokia funtsezkoa dela berezko erantzunaren lehen urratsetan. Beraz, NF- $\kappa$ B-ren aktibazio akastunak edo erregulatu gabeak EZren autoimmunitatea eta hantura eragin ditzakete, eta beraz, NF- $\kappa$ B-ren seinaleztapenaren kontrol zorrotza oso garrantzitsua da.

Bidezidor horrek EZn duen garrantzia EZri lotutako aldaerak dituzten beste bitartekari giltzarri batzuetatik ere badator, hala nola REL eta TNFAIP3; aldaera heredagarriek bidezidor biologiko garrantzitsu horretan eta EZ pairatzeko predisposizioa areagotzean eragina izan lezaketela erakusten baitute (Fernandez-jimenez et al., 2014; G. Trynka et al., 2009).

Horrez gain, NF- $\kappa$ B bidezidorra kontrolatzen duten marka epigenetikoak ere deskribatu dira. Izan ere, EZdun pazienteen DNAren metilazio-maila eta geneen koespresioaren alterazioaren arteko korrelazioa aurkitu da, eta horrek iradokitzen du NF- $\kappa$ B-rekin erlazionatutako geneetan gene-promotoreen metilazioaren aldaketa koordinatua badela eta horrek gene-adierazpenean eragin lezakeela (Fernandez-jimenez et al., 2014).

Era berean, m<sup>6</sup>A metilazioa NF- $\kappa$ B bidezidorraren erregulazioan inplikaturik dagoela ikusi da. LPSrekin estimulatutako giza hortz-muineko zelulek m<sup>6</sup>A eta METTL3ren adierazpen-maila areagotuak erakutsi baitzituzten. METTL3 jaitsierak berriz, hanturazko zitokinen metaketa murriztu eta NF- $\kappa$ B eta MAPK seinaleztapen-bideen aktibazioa eragozten duela ikusi zen (Feng et al., 2018). Beste azterlan batek m<sup>6</sup>Aren *Mettl3* bidezko eragina deskribatu zuen DC zeluletan, T zelulen aktibazioan eta TLR4/NF- $\kappa$ B-k eragindako zitokinen ekoizpen handiagoaren sustapenean (H. Wang et al., 2019).

Emaitza horiek guztiek erakusten dute marka epigenetikoek NF- $\kappa$ B bidezidorra erregula dezaketela, baina ikerketa gehiago behar dira marka horiek NF- $\kappa$ B-ri nola eragiten dioten ezagutzeko eta erregulazio horrekin lotutako aldaerak EZren garapenean duten inplikazioa deskribatzeko.

### 1.3.1. NF- $\kappa$ B eta XPO1

XPO1 esportazio nuklearreko proteina da, eta hainbat zelula-prozesutan parte hartzen duten proteina eta RNA ugari bideratzen dituela deskribatu da (Sendino et al., 2018). I $\kappa$ B- $\alpha$  XPO1en zama da, zeinak NF- $\kappa$ B transkripzio faktorea inhibitzen duen, zitoplasman egoera inaktiboan bahituta edukita, era horretan NF- $\kappa$ B nukleoan sartzea eta DNA ituetara batzea saihesten baitu (Johnson, 1999; Krappmann & Scheidereit, 1997; Scott et al., 1993).

XPO1en gainadierazpena eta mutazioak hainbat neoplasia gaiztotan inplikatu dira, eta hainbat minbizi motatarako ito terapeutiko interesgarria bilakatu da (Gravina et al., 2014; Tan et al., 2014). Minbizi-zeluletan XPO1 gehiegi adieraztearen ondorioetako bat da gehiegizko I $\kappa$ B- $\alpha$ -ren zitoplasmarako esportazio nuklearra eragiten duela, eta bertan proteasomen bidezko degradazioak inaktibatzen du (Viatour et al., 2005). NF- $\kappa$ B-ren ondoriozko jarduera transkripzionalaren aktibazioak hantura eta tumorigenesia sustatzen ditu (Kashyap et al., 2016). Iradoki denez, I $\kappa$ B isoformen degradazio modu desberdinak mekanismo garrantzitsuak dira NF- $\kappa$ B aktibazioaren erregulazioan eta XPO1 erregulatzailerik interesgarria dela erakusten du (Maiuri et al., 2003).

Hain zuzen ere, Immunochiparen analisi berri batek XPO1ek EZrekin asoziatutako SNP bat aurkitu zuen genearen sekuentzia kodetzailearen 5'UTRan (Garcia-Etxebarria et al., 2016). Kontuan hartuta NF- $\kappa$ B-ren bidezidorra gainadierazia dagoela heste-mukosa zeliakoan, eta IL8 gainadierazia dagoela pazienteetan glutenarekiko estimulazioaren ondoren (Tye-Din et al., 2020), NF- $\kappa$ B-ren eta ur-behera dagoen IL8ren erregulazioan XPO1en funtzioa argitzeak ezagutza berriak ekar litzake EZren patogenesisia ulertzeko garaian.





## **2.HELBURUAK**



Lan honen bidez EZren patogenesisian aldaera genetiko ez-kodetzaileek eta epitranskriptomikak, m<sup>6</sup>A metilazioak hain zuzen ere, duten papera ulertu nahi da eta horretarako lau helburu nagusi definitu dira:

1. m<sup>6</sup>A metilazioa kuantifikatzeko teknika berri bat garatzea.
  - a. m<sup>6</sup>A metilazio gune-espezifikoak kuantifikatzea lerro zelular eta giza lagin desberdinetan.
  - b. Estimulu baten aurrean edota gaixotasun etapa desberdinetan m<sup>6</sup>A maila aldaketak kuantitatiboki neurtzea.
2. m<sup>6</sup>A metilazioaren inplikazioa EZn baieztatzea.
  - a. EZ pazienteetan m<sup>6</sup>A mailak kuantifikatzea.
  - b. EZ pazienteetan m<sup>6</sup>A makinariaren adierazpena zehaztea.
3. EZrekin asoziatutako rs3087898 SNP ez-kodetzailearen eta m<sup>6</sup>A aldaketaren inplikazioa *XPO1* genean aztertzea.
  - a. SNParen genotipoaren efektua m<sup>6</sup>A metilazioan ikertzea.
  - b. SNP ez-kodetzaileek *XPO1* bezalako hantura gene garrantzitsuetan eragin dezaketela erakustea.

4. m<sup>6</sup>A aldaketan eta erantzun inflamatorioan glutenaren implikazioa analizatzea.
  - a. Glutenak m<sup>6</sup>A metilazio mailak aldatzen dituen ikustea.
  - b. Glutenak eragindako metilazio aldaketen eragina EZn ezaugarri den hantura ingurunean aztertzea.

### **3.MATERIAL ETA METODOAK**



### 3.1. MATERIALAK

#### 3.1.1. PT-Gliadina

Pepsina-tripsina bidez digeritutako gliadina (PT-gliadina edo PTG) digestio entzimatico bidez prestatu zen, lehenago deskribatu bezala baina aldaketa txiki batzuekin (Jauregi-Miguel et al., 2019). Laburki, 2,5 g gliadina (Sigma-Aldrich, #G3375) 25 ml HCl 0,2 N-tan disolbatu ziren, eta gauean zehar 25 mg pepsinarekin (Sigma-Aldrich, #6887) inkubatu ziren 37°Ctan. NaOH 1 N erabiliz pH-a 7,4ra doitu zen, eta ondoriozko diluzioa, 25 mg tripsina (Sigma-Aldrich, #T9201) gehituz digeritu zen. Soluzioa gogor nahastu zen 37°C-tan 5 orduz, 100°C-tan irakin ordubetez, 2000 g-ra 10 minutuz zentrifugatu, gainjalkina iragazi eta ondoriozko disoluzioaren alikuotak -80°C-tan mantendu ziren erabili arte.

#### 3.1.2. Giza paziente eta laginak

Pediatriako pazienteetan, errekrutatzeke unean indarrean zeuden ESPGHANen (Gastroenterologia Pediatrikoko Hematologia eta Nutrizioko Europako Elkarte edo ingelesez European Society of Pediatric Gastroenterology Hematology and Nutrition) irizpideen arabera diagnostikatu zen eritasun zeliakoa, anti-gliadina (AGA), anti-endomisio (EMA) eta anti-transglutaminasa (TGA) antigorputzen determinazioa kontuan izanik. Heste meharraren biopsia baieztatzailea egin zen, eta analisiak subjektu guztien edo haien gurasoen baimen informatua lortu ondoren egin ziren.

Diagnostikatu berri ziren EZ paziente heldu guztiek TGA maila altuak zituzten, eta heste meharraren berezko anomalia histopatologikoak zituzten, bilioen atrofia, kripten hiperplasia eta epitelio barneko linfozitosis kasu. Laginak baimen informatuaren ondoren eta Columbiako Unibertsitateko erakunde-berrikuspeneko batzordeak onartutako protokolo bat erabiliz lortu ziren.

Azterlana Euskadiko Ikerketa Klinikoko Etika Kontseiluak onartu zuen (CEIC-E erref. PI2019133). Esperimentu guztiak jarraibide eta erregulazio egokien arabera



egin ziren. Paziente bakoitzaren duodeno distalaren biopsia laginak lortu ziren diagnosirako errutinazko endoskopia egitean. Pazienteetako batek ere ez zuen beste gaixotasun immunologiko konkomanterik. Kontroletako batek ere ez zuen heste meharraren hanturarik izan, ezta beste gaixotasun immunologikorik ere biopsia egin zen unean. Inork ez zuen inolako botikarik hartzen. Erabilitako giza laginei buruzko xehetasunak 2. taulan daude.

2. Taula. Giza laginen biopsien zerrenda.

	Dx	ORIGIN	AGE (years)	SEX	HLA	Celiac Serology	Marsh (0-3)
	ADULTS	CD n=6	100% USA	34.2 ± 19.5	83.3% FEMALE		100% +
16.7% MALE							
CTR n=22		31.8% USA 68.2% SPAIN	45.2 ± 11.3	77.3% FEMALE	13.6% DQ2	100% -	100% 0
				22.7% MALE	4.5% DQ8		
GFD n=6		100% USA	37.3 ± 11.4	33.3% FEMALE		100% -	83.3% 0
				66.7% MALE			16.7% 1
	Dx	ORIGIN	AGE (years)	SEX	HLA	Celiac Serology	Marsh (0-3)
	PEDIATRICS	CD n=28	100% SPAIN	4.6 ± 3.7	48.5 FEMALE	69.7% DQ2	81.8% +
51.5 % MALE					9.1% DQ2/ DQ8	12.1% -	80% 3
CTR n=16		100% SPAIN	8.1± 3.6	68.75% FEMALE	-	100% -	100% 0
				31.25% MALE			
GFD n=12	100% SPAIN	2 ± 0.7	69.2% FEMALE	69.2% DQ2	7.7% +	84.6% 0	
			30.8% MALE	23.1% DQ2/ DQ8	92.3% -	7.7% 1 7.7% 3	

3.1.2.1. *Tratamenduak*

Biopsien estimulazio esperimentuetarako, paziente zeliako aktiboengandik hartutako bi biopsia zati 4 ordutan zehar inolako konposaturik gabe edo PTG 250

µg/ml-ren presentzian inkubatu ziren, RPMI-1640 10X (Thermofisher, # 11875093) 150 µl medioan, 37°C-tan eta % 5ean CO<sub>2</sub>-n (12.Irudia).



**12.Irudia.** EZ aktibodun pazienteen biopsietan PTG estimulazio esperimentuen irudi adierazgarria.

### 3.1.3. Lerro zelularrak

Giza hesteetako HCT116 (# CCL-247) eta HCT15 (# CCL-225) lerro zelularrak eta HEK293FT enbrioi-giltzurruneko zelula-lerroa (# CRL-1573) American Type Culture Collection-etik (ATTC, Manassas, VA, AEB) eskuratu ziren. C26 sagu-hesteetako zelula-lerroa Beatriz Arteta doktoreak atseginez eman zuen.

Zelula-lerro guztiak fabrikatzailearen protokoloari jarraiki landu ziren RPMIn (Lonza, # 12-115F) % 10eko FBS (Millipore, Burlington, AEB. #S0115), 100 unitate/ml penizilina eta 100 µg/ml estreptomizina (Lonza, # 17-602E) gehigarriekin edo DMEMen (Lonza, Basilea, Suitza, # 12-604F) % 10eko FBS, 100 unitate/ml penizilina eta 100 µg/ml estreptomizina gehigarriekin.

#### 3.1.3.1. *Tratamenduak*

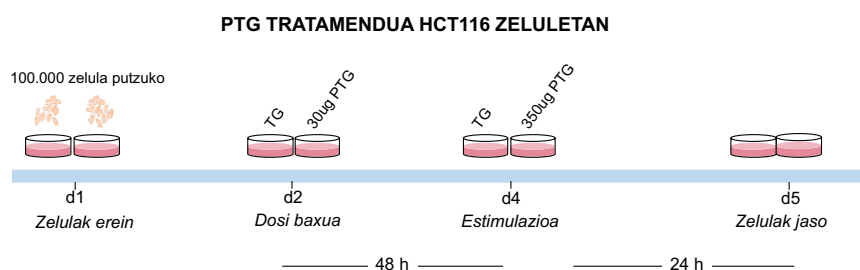
Zikloleuzina tratamenduetarako, HCT15 zelulak 100 mM zikloleuzinarekin inkubatu ziren (Sigma Aldrich, #A48105), RNA erauzi baino 3 ordu lehenago.

Aktionomizina esperimentuetarako, HCT116 zelulak 3 eta 6 orduz D aktinomizinarekin tratatu ziren (Sigma-Aldrich, #A9415), 5 µg/ml-ko azken kontzentrazioan, RNAren egonkortasun saiakuntzarako.

XPO1 eta NF-kB inhibitzeko, leptomizina B XPO1 inhibitzailea (LMB; Apollo Scientific, Cheshire, Erresuma Batua, #BIL2101) eta BAY-11-7082 NF-kB

inhibitzailea (Sigma Aldrich, #B5556-10MG) 6 ng/ml-ko eta 10  $\mu$ M-ko azken kontzentrazioan erabili ziren 24 eta 48 orduz, hurrenez hurren.

PTG estimulazioetarako, 100.000 HCT116 zelula erein ziren eta 37°C-tan inkubatu ziren gauean zehar. Hurrengo egunean, zelulak 30  $\mu$ g/ml PTG dosi baxuarekin 48 orduz inkubatu ziren. Ondoren, PTG tratamendua egin zen 350  $\mu$ g/ml-ko azken kontzentrazioan, eta, 24 orduren ondoren, gainjalkinak eta zelulak bildu ziren RNA eta proteinen analisisietarako (13. irudia).



**13. Irudia.** Gliadina bidezko *in vitro* tratamenduaren irudikapen eskematikoa. HCT116 zelulak 48 orduz hazi ziren dosi txikiko PTG kontzentrazioarekin (30  $\mu$ g/ml), eta ondoren, PTG dosi handiagoarekin (350  $\mu$ g/ml) tratamendua egin zitzaien 24 orduz.

### 3.1.4. Sagu Ereduak

PTG *in vivo* esposizio-esperimentuetarako, C57BL/6 saguak kontrol gisa (ingelesez wild type edo WT) erabili ziren, Janvier Labs-en (Frantzia) erosiak. Laburki, ugaltzaileak GGDn (Altromin #C1074) mantendu ziren gutxienez 4 astez eta esperimentuak egin ziren beren ondorengoak erabiliz.

EZ arrisku-eredu batean PTG *in vivo* esposizio-esperimentuak egiteko, patogeno espezifikoko gabeko HLA-DQ2 (DR3-DQ2 giza haplotipoa) eta CD4<sup>+</sup> sagu zeluladun sagu transgenikoak erabili ziren, jatorriz Melbourneko Unibertsitatean sortuak (de Kauwe et al., 2009). Tokiko animalien etika onespena lortu zen.

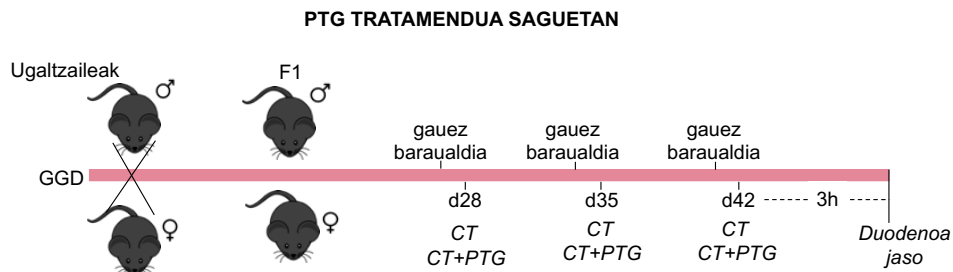
YTHDF1 irakurlea gure bidezidorrean aztertzeko, *Ythdf1* KO saguak He doktorearen laborategitik jaso ziren (D. Han et al., 2019) eta 4 astera sakrifikatu ziren. *Ythdf1* KO saguen duodenoaren ehun sekzioak RNA eta proteinak erauzteko prozesatu ziren.

#### 3.1.4.1. *Tratamenduak*

PTG *in vivo* esperimentuetan, C57BL/6 saguak ahoz sentibilizatu ziren 4 asteko adinean kolera toxina (CT) eta PTG (500 µg PTG + 25 µg CT) erabiliz astean behin 3 astetan zehar (Enzo Life Sciences, #BML-G117-000). Kontrol-saguen CT bakarrik jaso zuten. Kontrol-saguak eta PTGrekin tratatutakoak kaiola desberdinetan mantendu ziren, kontrol-saguen inolako PTG kutsadurarik jasan ez zezaten. Azken gavage-aren ondoren, saguak sakrifikatu eta duodenoaren sekzioak RNA eta proteinak erauzteko prozesatu ziren (14.irudia). Bartzelonako Unibertsitateko Animalien Esperimentaziorako Batzorde Etikoak (CEEA-UB) saguekin egindako prozedura guztiak onartu zituen. Tramiterako baimenak Kataluniako Generalitatetik lortu ziren, 2010/63/EB Europako Zuzentarauaren arabera.

EZ arrisku eredurako, HLA-DQ2 sagu taldeari ahoko zunda bidez 25 µg CT (Sigma Aldrich) eta 500ug PTG eman zitzaion astean behin, 3 astez. Kontrolek CT bakarrik jaso zuten. Sakrifikatzeko unean, sekzio duodenalak RNA erauzteko prozesatu ziren.

*Ex vivo* estimulazio-esperimentuetarako, WT eta *Ythdf1* KO saguen duodeno-frakzioetako zelula epitelial isolatuak bi gelaxkatan banatu ziren eta DMEM + %10 FBS eta P/Sn hazi ziren. PTG bidezko estimulazioa, zelula isolatu berrietan egin zen, PTG 250 µg/ml erabiliz 4 orduz, eta estimulatu gabeko zelulak kontrol gisa erabili ziren.



**14. Irudia.** Gliadina bidezko *in vivo* tratamenduaren irudikapen eskematikoa. Saguak zunda bidez elikatu ziren PTG eta CT (PTG) bidez 3 astez, astean behin. Kontrol-saguen (NT) CT bakarrik jaso zuten.

## 3.2. METODOAK

### 3.2.1. DNA, RNA eta proteina erauzketa

Gizakien biopsietarako, NucleoSpin TriPrep kita erabili zen (Macherey-Nagel, Düren, Alemania, #740966.50) fabrikatzailearen jarraibideei jarraituz. Proteina jalkinak RIPA tanpoian berreseki ziren (NaCl 150 mM, NP-40 % 1,0an, Na deoxikolatoa % 0,5ean, SDS % 0,1ean, TrisHCl 50 mM, EDTA 1 mM) 1x proteasa inhibitzaile koktel (PI) gehigarriarekin (Roche, Basilea, Suitza, # 11836153001).

Saguen laginetarako, Direct-zol RNA kita (Zymo research, Irvine, AEB. #R2053) erabili zen RNA erauzteko. Proteinak 2x PI-dun RIPA tanpoian lisatu ziren.

HCT116, HCT15, HEK293FT eta C26 lerro zelularretarako, RNA erauzketa NucleoSpin RNA kitaren bidez egin zen (Macherey Nagel, #740984.50) eta zelulak RIPA tanpoian lisatu ziren.

Giza hesteetako biopsien frakzio epitelial eta immune subzelularrak aurretik deskribatutako protokoloari jarraiki lortu ziren (Romero-Garmendia et al., 2018). Labur, zelulak mekanikoki bereizi ziren biopsia berrietatik errotazio-agitazioaren bidez, 10 ml RPMI mediotan %2 FBS, %1 DTT eta 5 nM EDTAn ordubetez. *Lamina propioa* eta debris 30 µm-ko (#130-041-407) aurretiazko banantze-iragazkien bidez ezabatu ziren eta zelula hilak ezabatzeko kit bat erabili zen (#130-090-101) zelula-bideragarriz osatutako esekidura homogenea prestatzeko. Zelula biziak CD45

mikroperla magnetikoz markatu ziren (#130-045-801) FcR blokeo-erreaktiboaren presentzian (#130-059-901) antigorputzen markatzearen espezifikotasuna handitzeko. Antigorputzen bidez markatutako zelulen esekidura bereizketa-magnetikoko zutabe batean aplikatu zen (#130-042-201). Markatu gabeko CD45-zelulak (batez ere CD326 + epitelial frakzioa) fluxu jarraituan bildu ziren, eta CD45+ zelulak zutabea imanetik kendu ondoren berreskuratu ziren.

### 3.2.2. Gene adierazpen analisia

500-1000 ng RNA erabili ziren erretrotranskripzio erreakziorako, iScript cDNA sintesi kita erabiliz (BioRad, CA, AEB, #1708890). Adierazpen-balioak q-PCR bidez zehaztu ziren, Taqman (ThermoFisher, Waltham, MA) adierazpen genikoko entseguak erabilia, edo Sybr Green (iTaq SYBR Green Supermix, Bio-Rad, #1725124) eta hasle espezifikoak erabilia. HPRT genea kontrol endogeno gisa erabili zen, bai giza laginetan, bai sagu-laginetan. Erreakzioak BioRad CFX384 makina batean egin ziren eta produktu bakar baten amplifikazioa ziurtatzeko urte-kurbak aztertu ziren. qPCRaren neurketa guztiak duplikatuan egin ziren, eta adierazpen-mailak  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodoaren bidez aztertu ziren. Taqman gene adierazpen saiakuntza eta hasle guztiak 3. eta 4. taulan daude zerrendatuta.

*IL8*ren adierazpena giza hesteetako biopsia osoetan, baita kontrol ez-zeliakoen eta gaixotasun aktiboa duten pazienteen frakzio epitelial eta immuneetan ere, gure taldeak egindako RNAseq bateko datuak erabiliz aztertu zen (Fernandez-Jimenez et al., 2019).

**3. Taula.** Erabilitako qPCR hasleen zerrenda.

Gene	Primer Sequence
XPO1 (5'UTR)	Fw: TGTTCCAGTCTTTGCTGCTG Rv: AAGGCTCGCCTAAACTTTCC
METTL3	Fw: TCGAGAGCGAAATTTTCAAC Rv: GGAGATAGAGAGCCTTCTGAACC
YTHDF1	Fw: ACCTGTCCAGCTATTACCCG Rv: TGGTGAGGTATGGAATCGGAG
HPRT	Fw: ACCAGTCAACAGGGGACATAA Rv: CTCGTGGGGTCCTTTTCACC
TUG1	Fw: ATTCCACGACCATGGTTGTC Rv: ATTCACCACCAACCACACAG
SOCS1	Fw: AGACCCCTTCTCACCTCTTG Rv: AGTTAAGCTGCTACAACAACCAG
IL8	Fw: ACTGAGAGTGATTGAGAGTGGAC Rv: AACCCCTCTGCACCCAGTTTTC
5'UTR Xpo1	Fw: GGTGGGAAAACCTGTGAAACCC Rv: ACTGCTTCTTCCTTCTGTCC
Ythdf1-/-	Fw: CCTGCATTCTCAGCATGG Rv: GCTCCAGACTGTTTCATCC
Hprt	Fw: CTGGTGAAAAGGACCTCTCGAAG Rv: CCAGTTTCACTAATGACACAAACG
Mip2a	Fw: CCAACCACCAGGCTACAGG Rv: GCGTCACACTCAAGCTCTG
Cxcl1	Fw: CTGGGATTACCTCAAGAACATC Rv: CAGGGTCAAGGCAAGCCTC

**4. Taula.** Erabilitako qPCR entseguen zerrenda.

Gene	Assay ID
<i>XPO1</i>	C__16006954_10
<i>MALAT1</i>	Hs00273907_s1
<i>RPLPO</i>	Hs99999902_m1
<i>Mettl3</i>	Mm01316319_m1
<i>Ythdf1</i>	Mm00620538_m1
<i>Rplpo</i>	Mm00725448_s1

**3.2.3. SNP genotipaketa**

rs3087898 SNParen genotipaketa giza biopsietatik erauzitako DNA laginetan egin zen rhAmp SNP entsegu espezifiko bat erabiliz (IDT, Newark, NJ, AEB) fabrikatzailearen jarraibideei jarraituz.



### 3.2.4. Pakete bioinformatikoak

#### 3.2.4.1. *RNAfold*

Vienna RNA web orrialdean eskuragarri dagoen RNAfold web zerbitzaria (Hofacker, 2003) *XPO1*en 5'UTR alelo espezifikoaren egitura sekundarioa iragartzeko erabili zen. RNAfold web zerbitzariak 7.500 nt arteko kate bakarreko RNA sekuentzien egitura sekundarioak aurreikusten ditu.

#### 3.2.4.2. *MeT-DB V2.0*

MeT-DB V2.0 m<sup>6</sup>A datu-basea (H. Liu et al., 2018) *XPO1*en 5'UTRan m<sup>6</sup>A gailurren existentzia ebaluatzeko erabili zen. MeT-DB V2.0 datu baseak transkriptoma osoko m<sup>6</sup>A gailurrak eta nukleotido bakarreko m<sup>6</sup>A gunek iragartzen ditu, RNA metilatuen immunoprezipitazio sekuentziario (MeRIP-Seq) lagin bilduma zabalean oinarrituta. Ikerketa ezberdinetako m<sup>6</sup>A gunek bistaratzen laguntzeko genoma arakatzailerak eskaintzen du. Ikerketa ezberdinetako m<sup>6</sup>A guneen erlazioa ikusteko erabiltzaileak geneetan edo kokapen genomikoan oinarrituta egin ditzake bilaketak.

#### 3.2.4.3. *GEO datu-baseko miCLIP datuak*

HCT116 zelulen m<sup>6</sup>A nukleotido bakarreko erresoluzioko erretikulazio eta immunoprezipitazio datuak (ingelesez m<sup>6</sup>A individual-nucleotide-resolution cross-linking and immunoprecipitation edo miCLIP) GEO biltegitik (GSE128699) deskargatu ziren. SRR8767363 eta SRR8767364 sekuentzia aginduak, GEOko (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) GSM3682895 eta GSM3682896 esperimenterako HCT116 WT zelulen m<sup>6</sup>A mapaketa (miCLIP) emaitzei dagozkienak hurrenez hurren, Sequence Read Archive-tik (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>) lortu ziren eta irakurketak *XPO1*en 5'UTR sekuentziarekin lerrokatu ziren NCBI Nucleotide Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) erabiliz. Lerrokatzeak testu arrunteko fitxategi gisa deskargatu ziren, eta posizio bakoitzean guztizko bat-etortzeen eta desegokitzeen kopurua MS Excel erabiliz zenbatu zen.

### 3.2.5. m<sup>6</sup>A detekzio metodoak

#### 3.2.5.1. *Dot Blot*

300 ng RNA nitrozelulosa-mintz batean gurutzatu ziren UV erabiliz. Mintza % 5 esne % 0,1 PBSTn (% 0,1 Tween PBSn) blokeatu zen. Mintza gau osoan inkubatu zen m<sup>6</sup>A antigorputz batekin (1:200) (Abcam, Cambridge, Erresuma Batua, #ab151230) 4°C-tan. % 0,1eko PBSTtan garbitu ondoren, mintzak untxiaren aurkako HRP-konjugatutako bigarren mailako antigorputz batekin inkubatu ziren (1:10000) (Santa Cruz Biotechnology, #sc-2357) eta mintza Clarity Max ECL Substrate erabiliz errebelatu zen (BioRad, #1705062).

#### 3.2.5.2. *m<sup>6</sup>A RNA immunoprezipitazioa*

Zelula-lerroetan, lagin bakoitzeko alde zurreratik garbitutako 4 µg RNA frakzionatu ziren RNA frakzionatzeko tanpoiarekin (100 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub>), 3 minutuz 95°C-tan berotuz eta berehala izotzetan jarriaz. Giza hesteetako biopsietatik isolatutako frakzio epitelial eta immuneetarako, 18 giza biopsia frakzioko multzoa erabili zen talde bakoitzeko 2 µg RNA izanik guztira. RNAREN % 10 input gisa gorde zen. 1 µg m<sup>6</sup>A antigorputz (Abcam, #ab151230) eta kontrol-antigorputz (IgG, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, AEB, #sc-2025) agarosa A bolatxoekin (GE Healthcare, Chicago, AEB) akoplatu ziren biraketa gurril batean 1 orduz 4°C-tan inkubatuz. Ondoren, bolatxoak bi aldiz garbitu ziren erreakzio tanpoi batean (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, % 0,1 NP-40). Antigorputzekin akoplatutako bolatxoei RNA frakzionatua gehitu eta 3 orduz inkubatu zen 4°C-tan gurril birakari batean. Ondoren, bolatxoak 2X garbitu ziren erreakzio-tanpoiean, 2X gatz baxuko tanpoi batean (50 mM NaCl, 10 mM TrisHCl eta % 0,1 NP-40) eta 2X gatz altuko tanpoiean (500 mM NaCl, 10 mM TrisHCl eta % 0,1 NP-40). Azken garbiketaren ondoren, bolatxoak lisi tanpoi batean berreseki ziren eta RNA erauzketa PureLink RNA erauzteko kitarekin (Invitrogen, Carlsbad, AEB, #12183016) egin zen. Giza hesteetako HCT116 zelula lerroan *SOCS1* eta *HPRT* kontrol positibo eta negatibo

gisa erabili ziren hurrenez hurren. C26 sagu-heste zelula lerroan *Hprt* eta *Rplp0* erabili ziren kontrol positibo eta negatibo gisa, hurrenez hurren.

### 3.2.5.3. *m*<sup>6</sup>A RT-qPCR

*m*<sup>6</sup>A metilazioaren kuantifikazioa RT-qPCR metodo simple eta errentagarri berri baten bidez ebaluatu zen (A. Castellanos-Rubio et al., 2019; Olazagoitia-Garmendia & Castellanos-Rubio, 2021).

Erretrotranskripziorako (RT) erabilitako hasleak baldintza zehatz batzuk kontuan hartuta diseinatu ziren (15.A. irudia). Lehenik, adenosina kandidatu baten metilazio erlatiboa neurtzeko alderantzizko hasle positibo bat (+) diseinatu zen *m*<sup>6</sup>A motibo baten barruan (DR-**A**-CH). Haslearen 3' muturreko azken nukleotidoak *m*<sup>6</sup>A hautagaiaren ondoan egon behar du. Ondoren, alderantzizko hasle negatibo bat (-) diseinatu zen hurbileko A batean (*m*<sup>6</sup>A motibo baten barruan ez dagoena), eta (+) haslearen eskualdearekin gainjartzen ez zena. Haslearen 3' muturreko azken nukleotidoak A ez-metilatuaren ondoan egon behar du.

qPCRrako hasleen diseinurako, BstI entzimaren retrotranskripzio-ahalmen txikiagoa hartu behar da kontuan, honek cDNA produktu laburragoak sortuko dituelako. Hori dela eta, qPCR hasleak zenbat eta hurbilago egon RT hasleetatik, orduan eta hobeto.

*m*<sup>6</sup>A-erretrotranskripzio erreakziorako, 75-150 ng RNA, hasle bakoitzeko 100 nM, 50 uM dNTP eta 0.1U BstI (NEB) edo 0.8U MRT (ThermoScientific) erabili ziren. PCR zikloen baldintzak hauek izan ziren: 50 °C -15 min, 85 °C-3 min, 4°-∞.

qPCRrako, erretrotranskripzio-erreakzioaren 1,5 ul, hasle bakoitzeko 100 nM eta 2X iTaq SYBR Green (BioRad) erabili ziren. Erreakzioak Illumina Eco Real Time System batean egin ziren eta produktu bakar baten amplifikazioa ziurtatzeko urte-kurbak aztertu ziren (15.B irudia).

Datuak aztertzeko, (+) hasleak erabiliz bi entzimen arteko Ct-en aldea kalkulatu zen:  
 Delta (+) = Ct BstI (+) - Ct MRT (+).

Ondoren, (-) hasleak erabiliz bi entzimen arteko aldea kalkulatu zen:

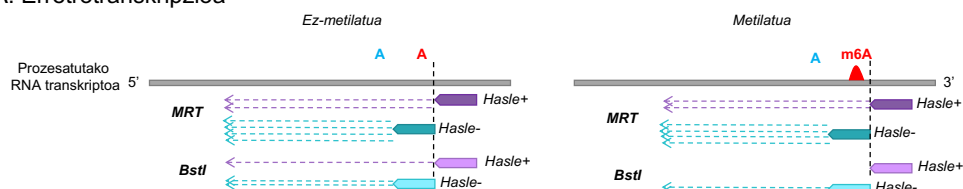
Delta (-) = Ct BstI (-) - Ct MRT (-).

Delta (+) > Delta (-) bada m<sup>6</sup>A hautagaia metilatutzat jotzen da, Delta (+) ≤ Delta (-) baldin bada, aldiz, m<sup>6</sup>A hautagaia ez-metilatzat hartzen da.

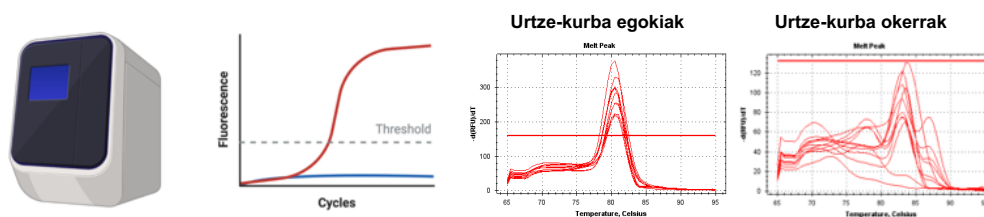
m<sup>6</sup>A maila erlatiboak kalkulatzeko  $2^{-((Ct\ Bst\ (-) - Ct\ MRT\ (-)) / (Ct\ Bst\ (+) - Ct\ MRT\ (+))}$  formula erabili zen; non 0,5etik gorako balioak metilazio positibotzat hartu ziren eta 0,5 azpitik metilazio negatibo gisa.

### m<sup>6</sup>A-RT-QPCR

#### A. Erretrotranskripzioa



#### B. qPCR bidezko kuantifikazioa



**15. Irudia.** m<sup>6</sup>A RNA-metilazioaren kuantifikazio hondar-espezifiko erlatiboak m<sup>6</sup>A-RT-QPCR erabiliz. (Olazagoitia-Garmendia & Castellanos-Rubio, 2021)tik moldatua.

HCT116 zelula-lerroan *XPO1*en 5'UTRko metilazio espezifikoa baieztatzeko ere erabili zen RT-qPCRan oinarritutako metodo hau. 3 m<sup>6</sup>A motiboetarako (+) hasle desberdinak eta (-) hasle bat, guztiak *XPO1*en 5'UTRn kokatuak, diseinatu ziren. *TUG1* eta *HPRT* kontrol positibo eta negatibo gisa erabili ziren hurrenez hurren. Erabilitako hasleen sekuentziak 5.Taulan daude.

**5. Taula.** *TUG1* kontrol positibo eta *HPRT* kontrol negatiboarentzat erabilitako hasleen sekuentziak.

Haslearen izena	Haslearen Sekuentzia
HPRT+	CCTCCTACAACAACTTGTCTGGAATT
HPRT-	CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC
HPRTF	ACCAGTCAACAGGGGACATAA
TUG1+	TTCCAGTGAGCCCGCTTGCTAAAAG
TUG1-	ATTCACCACCAACCACACAGCC
TUG1F	ATTCCACGACCATGGTTGTC
XPO1.1+	ACAGGCAGCAGCAGAAGCGGCAGGAGTAGG
XPO1.2+	AGGGAAGGGGGAGGGAACGGGGTCAAG
XPO1.3+	GGGGAGACGCTCTGCTGCCAGTTGCAG
XPO1-	AAGGCTCGCCTAAACTTTCC
XPO1F	AAGGCTCGCCTAAACTTTCC

#### 3.2.5.4. *m*<sup>6</sup>A ELISA

HCT116 zeluletan zein kontrolen, EZ paziente aktiboen eta glutenik gabeko dieta batean dauden EZ pazienteen hesteetako laginetan *m*<sup>6</sup>A mailak zehazteko, merkatuan eskuragarri dagoen *m*<sup>6</sup>A ELISA kit baten erabili zen (Epigentek, NY, AEB, # P-9005-96).

### 3.2.6. Proteina kuantifikazio metodoak

#### 3.2.6.1. *Western Blot*

Zelulak RIPA tanpoiean (150 mM NaCl, % 1,0 NP-40, % 0,5 NaDeoxycholate, % 0,1 SDS, 50 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) lisatu ziren proteinak erauzteko. Laemmli tanpoia (62 mM Tris-HCl, 100 mM ditiotreitol (DTT), % 10 glizerol, % 2 SDS, 0,2 mg/ml bromofenol urdina, % 5 2-mercaptoetanol) gehitu zitzairen eta ondoren bero bidezko desnaturalizazioa egin zen. Proteinak % 10eko SDS-PAGE geletan migratu ziren. Elektroforesiaren ondoren, proteinak nitrozulodosazko mintzetara transferitu ziren Transblot-Turbo Transfer System (Biorad) erabiliz eta TBSTn (20 mM Tris, 150 mM NaCl eta %0,1 Tween 20) diluitutako %5 gantz gabeko esnetan blokeatu ziren giro-temperaturan 1 orduz. Mintzak gau osoan inkubatu ziren 4°C-tan antigorputz

primarioekin 1:1000 -1:5000 TBSTn diluituta. Peroxidasa-konjokaturiko saguaren aurkako (1:10000 diluzioa gantz gabeko esne %2,5ean) edo untxiaren aurkako (1:10000 diluzioa gantz gabeko esne %2,5ean) bigarren mailako antigorputza 1 orduz giro-tenperaturan inkubatu ondoren banda immunoerreaktiboak Clarity Max ECL Substrate (BioRad, # 1705062) erabiliz agerian utzi ziren. Banda immunoreaktiboak Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS (BioRad) erabiliz detektatu eta ImageJ softwarearen bidez kuantifikatu ziren.

Western Blotting egiteko honako antigorputz hauek erabili ziren: XPO1 (Cell Signalling, Leiden, Herbehereak, #46249S), METTL3 (Abcam, #195352), YTHDF1 (Abcam, #220162), YTHDF1 (Proteintech, Rosemont, AEB, #17479-1-AP),  $\beta$ -ACTIN (Santa Cruz Biotechnologies, #sc47778),  $\alpha$ -TUBULIN (Sigma-Aldrich, #T9026 eta Cell Signalling, #2144S), HSP90 (Cell Signalling; #4874), H3 (Abcam; #ab1791) , p50 (Abcam, #ab7971), GAPDH (Novus, St Louis, MI, AEB, #ND300-221) eta GAPDH HRP (Santa Cruz Biotechnologies, #sc-166574 HRP).

#### 3.2.6.2. ELISA

Giza biopsietatik edo zelula-hazkuntzako gainjalkinetatik proteina-estraktuak bildu ziren giza XPO1 proteina-mailak (Cloud-Clone Corp, Houston, AEB, #SEC258Hu) eta jariatutako IL8 kimiokina-mailak zehazteko. Kuantifikazioak komertzialki eskuragarri dagoen ELISA kita (I+D Systems, Abingdon, Erresuma Batua; #D8000C) erabiliz egin ziren fabrikatzailearen argibideak jarraituz.

#### 3.2.7. In vitro transkripzioa

*TUG1* aplikioia T7 sekuentzia duen aurreranzko hasle bat erabiliz anplifikatu zen. Purifikatu ondoren, 100 ng DNA erabili ziren *in vitro* transkripziorako Takara kiteko (Clontech) T7 polimerasa eta rNTPak erabiliz eta fabrikatzailearen argibideak jarraituz. IVT produktua Direct-zol miniprep kitarekin (Zymo Research) purifikatu zen.

### 3.2.8. Plasmidoen eraikuntza

*XPO1*en 5'UTRa rs3087898 SNPrako T edo C aleloa zuten giza cDNAetik amplifikatu zen eta pIS0 bektore eraldatu batean klonatu zen (Addgene, #12178) NcoI errestrizio guneak erabiliz.

pLKO.1-TRC Cloning bektorea (Addgene, #10878) pLKO.1-shMETTL3 eta pLKO.1-shYTHDF1 plasmidoak eraikitzeko erabili zen. Addgene-en protokoloari jarraituz, shRNA giza *METTL3* (AAGGAACAATCCATTGTTCTCGAGAACAATGGATTGTTCTT) eta *YTHDF1* (AACGGCAGAGTCGAAACAACTCGAGTTTGTTCGACTCTGCCGTTT) isilarazteko diseinatu ziren.

Aleloen gainadierazpen espezifikoaren esperimentuetarako, *XPO1* 5'UTR sekuentzia eta giza luzera osoko *XPO1* proteina (1071 aminoazido) kodetzen duen cDNA jarraian duten ugaztun-espresio-plasmidoak sortu genituen. Bi plasmido ezberdin sortu ziren, *5'UTR-XPO1\*T* eta *5'UTR-XPO1\*C* izenekoak, rs3087898 T edo C aleloak dituztenak, hurrenez hurren. Plasmido hauek sortzeko, lehenik *XPO1* cDNA zati partzial bat, 187 nukleotidotik stop kodoira doana, PCR bidez amplifikatu zen, aurretik deskribatutako pEYFP-CRM1 plasmido bat erabiliz (Rodríguez & Henderson, 2000) txantilo gisa. PCR produktu hau pEYFP-C1 bektorean (Clontech) klonatu zen Sall/BamHI fragmentu gisa. Ondoren, plasmido hartatik EYFP kodetzen duen sekuentzia NheI/Sall zati gisa kendu zen, eta *XPO1* 5'UTR duen eta *XPO1* cDNAren lehen 187 nt-ekin fusioatutako zati batekin ordezkatu zen, bi urratseko gainjartze PCR metodoa erabiliz sortu zena.

### 3.2.9. Luziferasa Saiakuntza

150000 zelula putzuko hazi ziren eta transfekzioa X-TremeGENE HP DNA transfekzio erreaktiboarekin (Sigma-Aldrich, #6366546001) egin zen 250 ng plasmido bakoitzeko erabiliz eta 48 orduz zelulak bilduz. Kontrol gisa pIS0 bektore hutsa erabili zen. Dual-Luciferase Reporter Assay System kita (Promega, Madison, AEB, #E1910) fabrikatzailearen protokoloari jarraituz erabili zen.

### 3.2.10. Gainadierazpenak

METTL3 gainadierazpen esperimentuetarako, 250 ng Addgene-eko plasmido (#53739) erabili ziren. 150000 zelula putzuko hazi eta transfektatu ziren X-TremeGENE HP DNA transfekzio errektiboa erabiliz (Sigma-Aldrich, #6366546001) eta zelulak transfektatu eta 48 ordura bildu ziren.

XPO1 gainadierazpenerako, *5'UTR-XPO1\*T* edo *5'UTR-XPO1\*C* plasmidoen 1 µg erabili ziren. 100000 zelula putzuko hazi ziren eta transfekzioa X-TremeGENE HP DNA transfekzio errektiboarekin egin zen (Sigma-Aldrich, #6366546001) 48 orduz.

### 3.2.11. Isilarazpenak

Partikula birikoak horrela sortu ziren HEK293FT zeluletan: 1 µg pLKO.1 shRNA plasmido, 750 ng psPAX2 packaging-plasmido (Addgene, #12260) eta 250 ng pMD2.G envelope-plasmido (Addgene, #12259) X-TremeGENE HP DNA (Sigma-Aldrich, #6366244001) transfekzio-erreaktiboa erabiliz transfektatu ziren. Antibiotikorik gabeko DMEM medioan inkubatu ziren zelulak 37°C-tan. Transfekzio-medioa DMEM hazkuntza medio freskoarekin ordezkatu zen, eta bi aldiz bildu zen partikula birikoak zituen medioa; 24 ordu eta 48 ordu igaro ondoren. Bildutako medioak zentrifugatu eta partikula birikoak lanerako alikuota gisa gorde ziren -80°C-tan. HCT116 zelulak sh-METTL3, sh-YTHDF1 edo pLKO.1-ekin (kontrol negatibo gisa) infektatu ziren eta hautaketa puromizinarekin erresistentziaren bidez (2 µg/mL) egin zen.

PTG bidez estimulatutako zeluletan YTHDF1 isilarazteko, YTHDF1-en aurkako 2 siRNA ezberdinen 30 nM (IDT, # hs.Ri.YTHDF1.13.1 eta hs.Ri.YTHDF1.13.2) edo 30nM siRNA kontrol negatibo (IDT # 51-01-14-01) transfektatu ziren PTGrekin sentibilizatutako zeluletan, 350 µg/mL-ko PTG tratamendua baino 16 ordu lehenago, Lipofectamine RNAimax errektiboa erabiliz (Thermo Fisher Scientific).



### 3.2.12. Zelulen frakzionamendua

Konpartimentu nuklearretan eta zitoplasmatikoetan RNA kantitateak kuantifikatzeko, nukleoak C1 lisi-tanpoia erabiliz isolatu ziren (1,28 M sakarosa, 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, % 4 Triton X-100). *XPO1-T/C*, *MALAT1* (kontrol nuklearra) eta *RPLPO* (kontrol zitoplasmikoaren) mRNA kantitateak q-PCR bidez neurtu ziren eta RNA horien zelula osoko kantitatearekin alderatu ziren.

Konpartimentu nuklear eta zitoplasmatikoetako proteina kantitateak kuantifikatzeko, zelulak NARA tanpoiean (10 mM HEPES pH 7,9, 10 mM KCl, 0,1 mM EDTA) proteinasa inhibitzaile (PI) gehigarriarekin berreseki ziren eta izotzetan inkubatu ziren 10 minutuz. NP-40 % 0,05eko azken kontzentrazioa gehitu ondoren, lisatuak izotzetan inkubatu ziren 5 minutuz eta 400 g-tan zentrifugatu ziren 2 minutuz. Gainjailkina frakzio zitosolikoa zen. Pelleta 3 aldiz garbitu zen NARA tanpoiarekin eta berriro eseki NARC tanpoiean (20 mM HEPES, 400 mM NaCl, 1 mM EDTA) + PI. 4°C-tan 30 minutuz astindu eta 16000 g-tan zentrifugatu zen 10 minutuz. Gainjailkina frakzio nuklearra zen.

### 3.2.13. RNA immunoprezipitazio (RIP) esperimentuak

RIP esperimentuetarako, HCT116 zelulak RIP tanpoi batean lisatu (150 mM KCl, 25 mM Tris, 0,5 mM DTT, % 0,5 NP-40, PI), izotzetan mantendu 15 minutuz eta xiringa baten bidez homogeneizatu ziren. Lisatuak aldeztu aurretik A-Agarosa proteina bolatxoekin (GE Healthcare, Chicago, AEB) garbitu ziren ordubetez gurpil-birakari batean 4°C-tan. A-Agarosa bolatxoak % 20 BSArekin blokeatu eta aurrez garbitutako lisatuekin eta 1 µg anti-IgG antigorputzarekin (kontrol negatiboa; Santa Cruz Biotechnologies, #sc-2025) edota intereseko antigorputzarekin (METTL3, Abcam edo YTHDF1, Abcam) nahastu ziren. Gauean zehar 4 °C-tan gurpil-biragailu batean inkubatu ondoren, bolatxoak hiru aldiz garbitu ziren RIP tanpoiarekin, hiru aldiz gatz baxuko tanpoiarekin (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, % 0,1 NP-40) eta hiru aldiz gatz altuko tanpoiarekin ( 500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, % 0,1 NP-40). Garbitu ondoren, bolatxoan % 70 RNA erauzteko tanpoi batean eskegi zen eta %

30 WBrako erabili zen. *SOCS1* eta *HPRT* kontrol positibo eta negatibo gisa erabili ziren hurrenez hurren.

### **3.2.14. Mugikortasun Elektroforetikoko Aldakuntza esperimentuak**

Lisatu nuklearrak bektore huts batekin edo *XPO1\**T** forma gainadieraziz transfektatutako HCT116 zeluletatik prestatu ziren, izotzetan C1 lisi tanpoiarekin 15 minutuz inkubatuz eta 15 minutuz 700 g-tan zentrifugatuz nukleoak bilduaz. Nukleoak mugikortasun elektroforetikoaren aldakuntza esperimendu (ingelesez electrophoretic mobility shift assay edo EMSA) lisi tanpoiarekin (50 mM KCl, 25 nM HEPES, 125 uM DTT eta % 0,5 NP-40) erauzi ziren. Mugikortasun elektroforetikoaren aldakuntza esperimentuak egiteko 40 µg erauzkin nuklear 50 µl erreakzio-bolumen EMSA lotze-tanpoiarekin (50 µg BSA, 20 mM Tris, 50 mM KCl, 0,05 % NP-40, % 5 glizerola, 10 mM-tan b-merkaptotanol, 1 mM EDTA eta 0,1 M DTT) eta LASAGNA TFBS web zerbitzarian (Lee & Huang, 2013) deskribatzen den *IL8* promotorearen NF-kB kontsensu-sekuentzia duten fluoreszentsiaz markatutako 60 nM oligorekin inkubatu ziren 30 minutuz giro-tenperaturan. Lehiaketa saiakuntzarako, etiketatu gabeko oligoetatik 10x gehitu zitzaion erreakzioari. Ondoren, laginak % 1eko agarosa gel batean kargatu ziren eta 60 V-tan migratu ziren 2 orduz.

### **3.2.15. Analisi Estatistikoak**

Datuak gutxienez hiru erreplika biologikoren batez besteko eta errore estandar gisa adierazten dira. Batez besteko konparaketak Student t-testaren, Mann Whitney testaren edo ANOVA testaren bidez egin ziren. Korrelazio-analisiak Pearson-en korrelazioa erabiliz egin ziren. Estatistikoki esangarritasun maila  $p < 0,1$ ean ezarri zen.

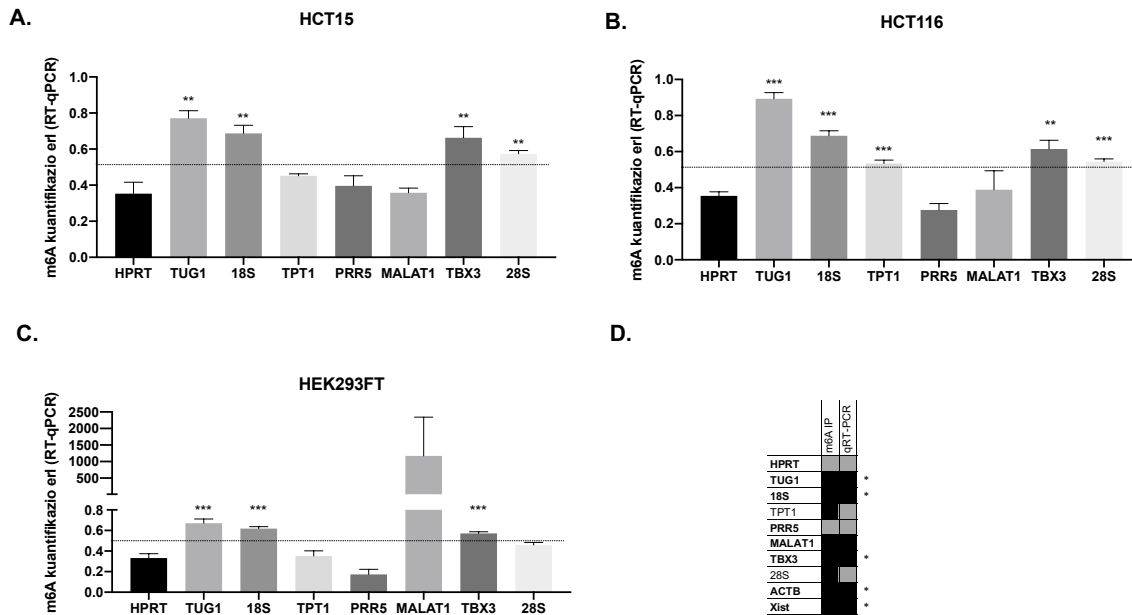
## **4.EMAITZAK**



#### 4.1. m<sup>6</sup>A METILAZIO HONDAR-ESPEZIFIKOEN KUANTIFIKAZIOA RT-qPCR METODO BERRI BATEN BIDEZ

Lehen aipatu bezala, m<sup>6</sup>A metilazioa kuantifikatzeko dauden metodoak neketsuak dira edota errendimendu handiko sekuentziazioa eskatzen dute, laborategi guztientzat eskuragarri ez dena. Ildo honetan, gure taldeak metodo berri bat deskribatu du, non m<sup>6</sup>A gune-espezifikoen kuantifikazioa lortzen den BstI entzimak RNA metilatuak erretrotranskribatzeko duen gaitasun murriztua aprobetxatuz. Erretrotranskripzioaren ondoren PCR kuantitatibo (qPCR) bat erabiltzen dugu kuantifikazio zehatz bat lortzeko (A. Castellanos-Rubio et al., 2019; Olazagoitia-Garmendia & Castellanos-Rubio, 2021).

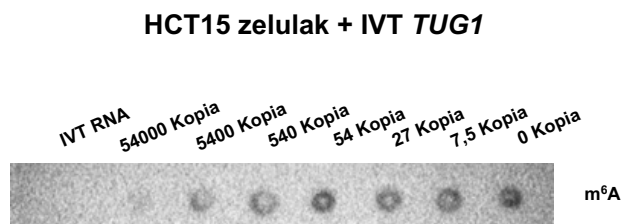
Metodo hau RNAn agertzen diren m<sup>6</sup>A metilazio-guneak kuantifikatzeko gai dela frogatu dugu zelula-lerroetan (16. irudia), baita giza laginetan ere (18.B irudia). Gure m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodoa erabiliz, *TUG1* balio positiboak (0,5 baino gehiago) zein *HPRT* balio negatiboak (0,5 azpitik) baieztatu ditugu hainbat zelula-lerrotan. Gainera, aurretik beste teknika batzuen bidez identifikatutako hainbat geneen metilazioa baieztatu ahal izan dugu (16.A-C irudia), gene batzuetan aldaketa honen zelula-mota espezifikotasuna erakutsiz. Gainera, HEK293FT zeluletako RNA erabiliz, immunoprezipitazio esperimentuetan erabilitako materiala zelako, gure emaitzak eskualde bereko Met-DB v2.0 datu-basean eskuragarri dauden aurrez argitaratutako m<sup>6</sup>A immunoprezipitazio datuekin alderatu ditugu (H. Liu et al., 2018). m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodo erlatiboarekin aztertutako hamar gene-eskualdeetatik zortzi, bat datoz metilazio-egoerari dagokionez (metilatua edo ez-metilatua) datu-basean daudenekin alderatuta (16.D irudia), metodo honen eraginkortasun handia baieztatuz.



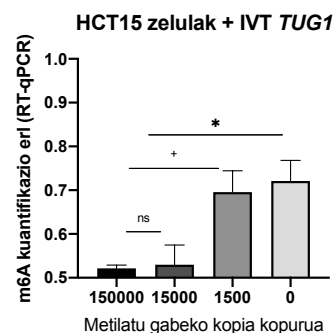
**16. Irudia.** **A)** HCT15, **B)** HCT116 eta **C)** HEK293FT zelula-lerroetan m<sup>6</sup>A-RT-qPCR erabiliz m<sup>6</sup>A RNA metilazio hondar-espezifikokoaren kuantifikazio erlatiboa. n=3-4, balioak batez bestekoak ± SEM dira (\*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 Student t-testaren arabera, HPRT kontrol negatiboarekiko). **D)** Met-DB v2.0 datu baseko m<sup>6</sup>A IP datuen eta m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodoaren arteko konparaketa gene desberdinetan HEK293FT zelula-lerroa erabiliz. Lodiz idatzitako geneetan emaitzak bat datoz bi metodoak erabiliz. Koadro grisek emaitza negatiboak (ez-metilatuak) adierazten dituzte eta koadro beltzek positiboak (metilatuak). n=4, balioak batez bestekoa ± SEM dira (\*p<0,05 Student t-testaren arabera, HPRT kontrol negatiboarekiko).

Izan ere, gure metodoa m<sup>6</sup>A metilazio maila kuantitatiboki neurtzeko erabilgarria dela ere baieztatu dugu. *In vitro* transkribatutako (IVT) TUG1 RNA HCT15 zelula lerroaren lisatuarekin nahastean, m<sup>6</sup>A dot blot bidez ikusi genuen laginean metilatu gabeko IVT TUG1 kopurua handitzeak m<sup>6</sup>A metilazioa orokorrean gutxitzea eragiten zuela (17.A). Baldintza horien arteko aldea kuantifikatu ahal izan genuen gure m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodoa erabiliz, eta m<sup>6</sup>A metilazio mailaren aldaketei buruzko informazio kuantitatibo zehatza emateko gai dela erakutsi genuen (17.B irudia).

A.



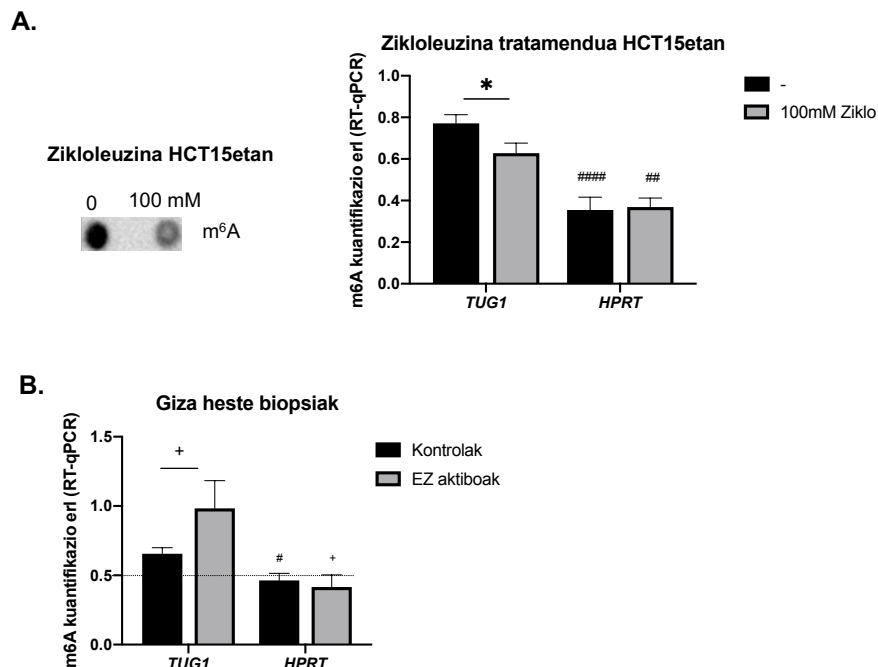
B.



**17. Irudia A)** m<sup>6</sup>A kuantifikazio orokorra m<sup>6</sup>A Dot blot bidez RNA basalean (0) eta *in vitro* transkribatutako RNA ez-metilatuaren kopia gero eta gehiagorekin nahastutako RNAn. **B)** *TUG1* en m<sup>6</sup>A motiboaren kuantifikazio erlatiboa RNA basalean (0) eta *in vitro* transkribatutako RNA ez-metilatuaren kopia gero eta handiagoarekin (1500, 15000 eta 150000) nahastutako RNAn. n=3, balioak batez bestekoa ± SEM dira (\*p<0,05 Student t-testaren arabera 150000 kopiadun baldintzarekiko).

Metodo hau estimuluen aurrean edo gaixotasunaren fase desberdinetan m<sup>6</sup>A aldaketak kuantifikatzeko ere erabilgarria dela frogatu dugu (18. A, B irudia). Zikloleuzinarekin (m<sup>6</sup>A metilazioa ezabatzen duen konposatu kimiko bat) tratatutako HCT15 zelulek m<sup>6</sup>A metilazio maila orokorra murriztua erakutsi zuten m<sup>6</sup>A dot blot bidez (18. irudia. Ezkerrean). Horrez gain, gure m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodoa erabiliz, *TUG1* en m<sup>6</sup>Aren murrizketa kuantitatiboa ere ebaluatu ahal izan genuen (18. Irudia. A eskuinean).

Nabarmentzekoa, m<sup>6</sup>A metilazio-aldaketak kontrol osasuntsuen eta eritasun zeliako aktibodun gaixoen (EZ) giza hesteetako biopsietan ere kuantifikatzeko gai garaela m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodoa erabiliz (18.B irudia). Horrela, EZ gaixoen eta zeliako ez diren kontrolen arteko RNA metilazio mailen desberdintasunak detektatu ahal izan genituen (18.B).



**18. Irudia A)** HCT15 zelulak 100 mM zikloleuzinarekin tratatu ziren RNA jaso baino 3 ordu lehenago eta m<sup>6</sup>A kuantifikazioa RNA totalean ebaluatu zen. m<sup>6</sup>A dot blot adierazgarria RNA basalean eta 100 mMko zikloleuzina tratamendurekin (ezkerrean). Tratatu gabeko (-) eta 100 mM zikloleuzina tratatutako zeluletatik erauzitako RNA n *TUG1* en aukeratutako motiboetan m<sup>6</sup>A mailen kuantifikazio erlatiboa. *HPRT* kontrol negatibo gisa erabili zen. n=4, balioak batez bestekoak ± SEM dira (\*p<0,05 Student t-testaren arabera) (eskuinean). **B)** *TUG1* kontrol positiboaren eta *HPRT* kontrol negatiboaren m<sup>6</sup>A kuantifikazio erlatiboa gaixo zeliakoen hesteetako biopsietan (n=8) eta kontroletan (n=6), balioak batez bestekoak ± SEM dira (\*p<0,05, \*\*p<0,01 Student t-testaren arabera).

Horrela, gure emaitzek frogatzen dute garatu berri den m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodoa metodo merke eta erraza dela m<sup>6</sup>A metilazio guneak, baita m<sup>6</sup>A mailen aldaketak ere, kuantifikatzeko giza ehunetako edo zelula-kulturretako RNA laginetan. Hori dela eta, teknika berri bat aurkeztu dugu RNA aldaketa honek hainbat gaixotasunetan duen eragina argitzen lagun dezakeena.

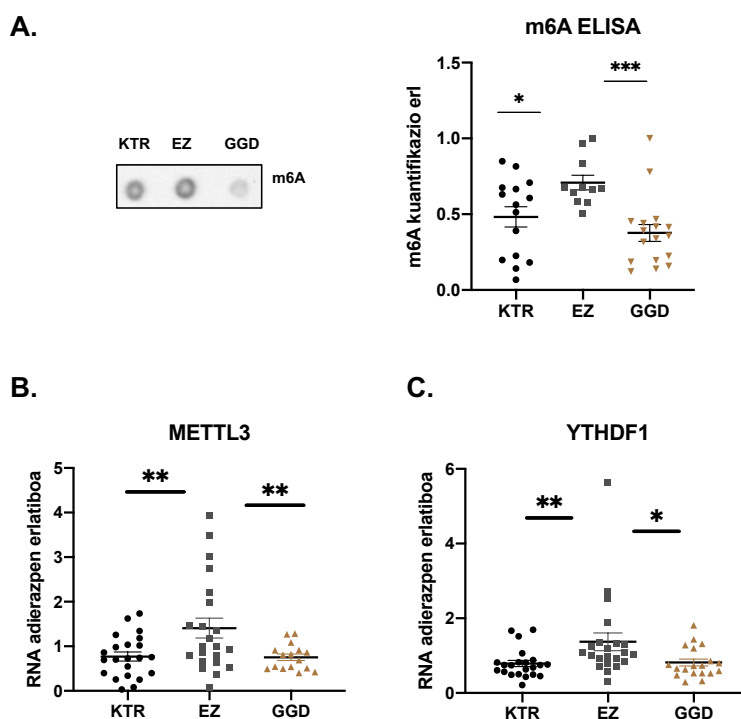


## 4.2. m<sup>6</sup>A RNA METILAZIOA EZ-N

m<sup>6</sup>A metilazioak hainbat gaixotasunen garapenean parte hartzen duela kontuan izanda, kontrol eta EZ indibiduen heste meharreko biopsietan m<sup>6</sup>A maila orokorrak kuantifikatzea izan dugu helburu.

Kontrolen (KTR), gaixo zeliako aktiboen (EZ) eta GGDn dauden gaixo zeliakoen (GGD) hesteetako biopsietatik RNA erauzi eta m<sup>6</sup>A RNA metilazio orokorra neurtu zen. EZ aktibo (diagnostikatu berri den) taldeko biopsiek metilazio maila handiagoa erakutsi zuten kontrolekin alderatuta (19. A. irudia).

*METTL3* m<sup>6</sup>A idazlearen eta *YTHDF1* m<sup>6</sup>A irakurlearen adierazpen altuagoa ere ikusi zen EZ aktiboko taldean kontrolekin alderatuta (19. B, C irudia). Interesgarriagoa dena, glutena EZ gaixoen dietatik kentzean (GGD), m<sup>6</sup>A maila orokorrak eta m<sup>6</sup>A makineria geneen adierazpena balio normaletara itzuli ziren (19. A-C).



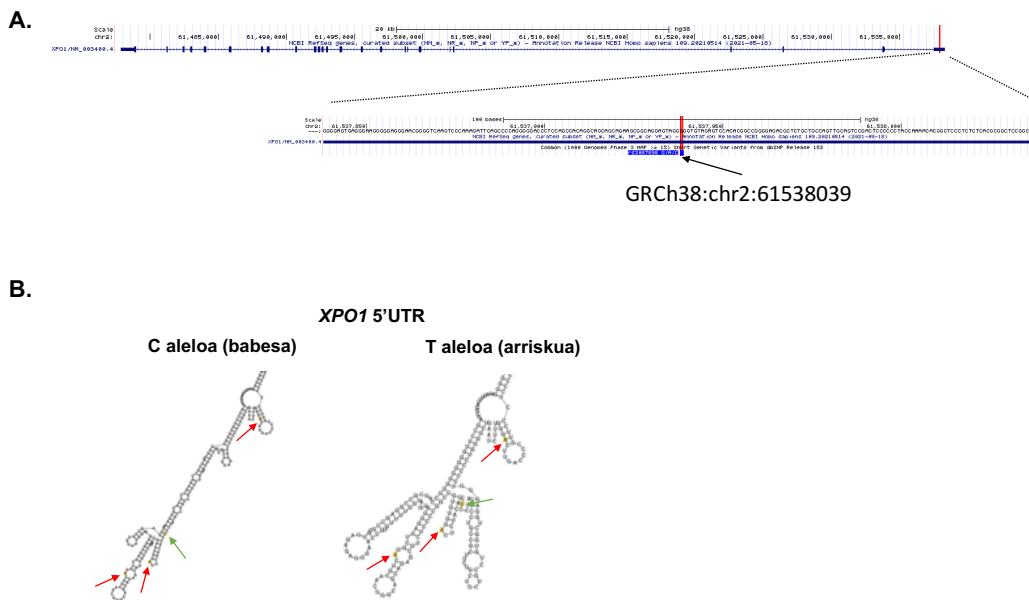
**19. Irudia A)** m<sup>6</sup>A kuantifikazioa orokorra m<sup>6</sup>A dot blot bidez (ezkerrean) eta m<sup>6</sup>A Elisa kit komertzial baten bidez (eskuinean), n=15-17. (\*p<0,05, \*\*\*p<0,001 ANOVA probaren arabera).

**B) *METTL3* eta C) *YTHDF1***en adierazpena RT-qPCR bidez neurtuta pertsona heldu eta haurren biopsietatik ateratako RNAn, n=6-16. (\*p<0,05, \*\*p<0,01, ANOVA probaren arabera).

Emaizta hauek baieztatzen dute m<sup>6</sup>A metilazioa EZ gaixoetan aldatua dagoela. Glutenaren esposizioak m<sup>6</sup>A makineriaren adierazpena areagotu dezakeela iradokitzen dute ere, EZ pazienteetan glutenaren irenstearen ikusitako erantzun akutuan bidezidor honek izan dezaken inplikazioa adieraziz. Horrela, EZren garapenean funtsezko eginkizuna izan dezakeen aurretik deskribatu gabeko bide bat aurkitu dugu.

### **4.3. XPO1 HAUTAGAIA: KARAKTERIZAZIO FUNTZIONALA EZ-KO HANTURA-INGURUNEAN**

EZ pazienteetan m<sup>6</sup>A metilazioa aldatzen dela kontuan hartuta, galdetu genuen EZrekin lotutako SNP ez kodetzaileek m<sup>6</sup>A aldaketan eragiten ote duten, eta ondorioz, EZ garatzeko joeran lagun dezaketen. Hemen EZri lotutako ImmunoChipeko rs3087898 SNParen azterketa funtzionala aurkezten dugu, *XPO1* proteina kodetzaile genearen 5'UTRn dagoena (20.A. Irudia). Vienna Package online tresnak (Hofacker, 2003) SNParen genotipoan oinarrituta 5'UTRren egitura sekundarioan aldaketa iragartzen du (20.B Irudia), 3 m<sup>6</sup>A motibo (GGACT) SNPetik gertu kokatuta egonik. Horrek adierazten du SNParen genotipoak eta m<sup>6</sup>A metilazioak *XPO1* genearen funtzionamenduan eragina izan dezaketela, eta beraz, EZ garatzeko arriskua eragin dezaketela.

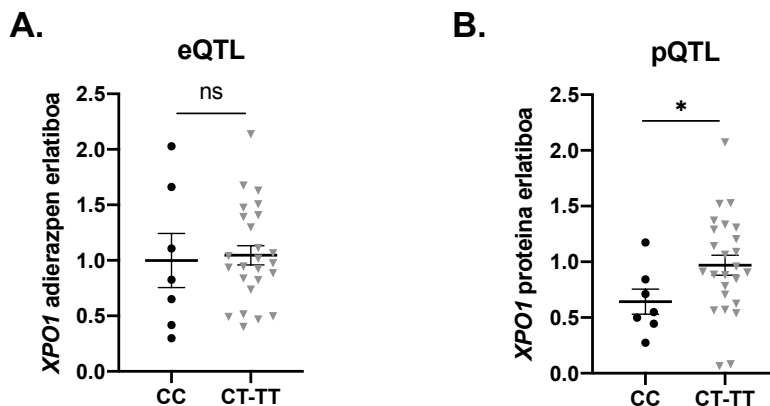


**20. Irudia A)** rs3087898 SNParen kokapen kromosomikoa *XPO1*en 5'UTRan GRCh38ren arabera. **B)** Giza *XPO1*en 5'UTR forma bakoitzaren bigarren mailako egitura Vienako paketeak aurreikusitakoaren arabera. rs307898 SNPa (gezi berdeak) eta m<sup>6</sup>A metilazio posibledun adeninak (gezi gorriak) nabarmentzen dira.

#### 4.3.1. rs3087898 genotipoaren eragina EZ pazienteetan

Gure kohortean rs3087898 SNParen inplikazioa balioztatzeko, gaixo zeliakoen eta zeliako ez diren kontrolen heste meharreko biopsiak erabili ziren.

Giza laginen genotipaketak erakutsi zuen *XPO1*en adierazpen mailak SNParen genotipoaren arabera nabarmen aldatzen ez badira ere (21.A irudia), arrisku aleloa duten pertsonen biopsiek (rs3087898 CT eta TT genotipoak) *XPO1* proteinaren kantitate handiagoak aurkezten dituztela (21. B irudia). Emaitza honek erakusten du EZrekin lotutako SNParen genotipoak *XPO1*en proteina mailan eragiten duela (protein Quantitative Trait Loci, pQTL), eta horrek gaixotasuna garatzeko joera areagotu dezakela (Alelo txikiaren maiztasuna<sub>kontrolak</sub>0.41/ Alelo txikiaren maiztasuna<sub>EZ</sub>0.44) (Dubois et al., 2010).



**21. Irudia A)** *XPO1* mailen lokusaren ezaugarri kuantitatiboa adierazpenean (ingelesez expression quantitative trait loci edo eQTL) babes-genotipoa (CC) eta arrisku aleloa (CT+TT) duten pertsonen artean alderatuta,  $n=7-25$ . Balioak bataz bestekoak  $\pm$  S.E.M. dira (ns: ez-esanguratsua, Mann Whitney probaren arabera). **B)** *XPO1* proteina-mailen lokusaren ezaugarri kuantitatiboa proteina adierazpenean (pQTL) babes-genotipoa (CC) eta arrisku aleloa (CT+TT) duten pertsonen artean alderatuta,  $n=7-25$ . Balioak batez bestekoa  $\pm$  SEM dira ( $*p<0,05$  Mann Whitney probaren arabera).

#### 4.3.2. RNA metilazioa eta *XPO1* mailak EZ pazienteetan

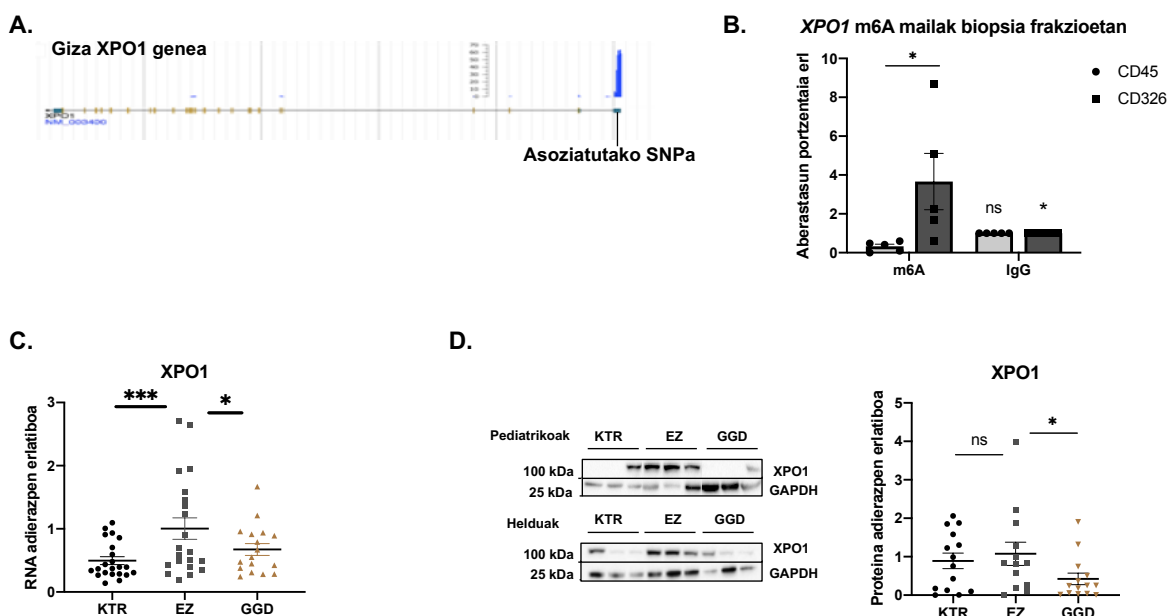
$m^6A$  maila orokorrak eta  $m^6A$  makineriaren adierazpena EZ gaixoetan aldatzen direla ikusita eta gaixotasunarekin lotutako SNPetik gertu 3  $m^6A$  motibo daudela ikusita, *XPO1*en RNA metilazio mailak aztertu nahi izan genituen.

MeT-DB V2.0  $m^6A$  datu-baseak (H. Liu et al., 2018)  $m^6A$  gailurrak agerian utzi zituen giza *XPO1*en 5'UTRan (22.A irudia), SNPetik gertu dauden motiboak metilatu daitezkeela iradokiz. *XPO1*en 5'UTRn dagoen  $m^6A$  metilazioa  $m^6A$  RNA immunoprezipitazioaren (meRIP) eta ondorengo RT-qPCRren bidez aztertu zen, giza hesteetako biopsien frakzio immuneetan (CD45+) eta epitelialetan (CD326+). Giza duodenoko biopsietan soilik zati epitelialetako RNA agertu zen metilatua, eta agerian utzi zuen  $m^6A$  metilazioak *XPO1*en funtzionamenduan bereziki epiteliozeluletan eragin zezakeela (22.B irudia).

Kontrolen (KTR), gaixotasun zeliako aktibodun pazienteen (EZ) eta glutenik gabeko dietan dauden pazienteen (GGD) biopsietan *XPO1* mRNA eta proteina kopuruak

kuantifikatu ziren ondoren (22. C, D irudia). EZ aktiboko taldean *XPO1*en adierazpen handiagoa ikusi zen kontrolekin alderatuta, eta maila horiek balio normaletara itzuli ziren pazienteak glutenik gabeko dieta jarraitzen zutenean.

Emaitzek adierazten dute, aurretik m<sup>6</sup>A, *METTL3* eta *YTHDF1*n ikusi bezala, *XPO1*en indukzioa, neurri batean behintzat, glutenaren menpekoea izan daitekeela. Gainera, *XPO1*en 5'UTRaren metilazioa zelula epitelialetan gertatzen da batez ere, eta horrek iradokitzen du mekanismo honek EZ gaixoen *XPO1* mailan duen eragina zelula-espezifikoa izan litekela.



**22. Irudia A)** Metdb v2 datu-basetik berreskuratutako giza *XPO1* genean agertzen diren m<sup>6</sup>A seinaleak. Gailur urdinak meRIP-seq irakurketei dagozkie, koadro horiak eta berdeak exoiak eta UTRak dira hurrenez hurren. EZrekin lotutako rs3087898 SNParen kokapena markatuta dago. **B)** m<sup>6</sup>A RNA immunoprezipitazioa (meRIP) eta ondorengo RT-qPCRa giza hesteetako biopsien frakzio immuneetan (CD45+) eta epitelialetan (CD326+). n=18 pertsonako multzoa. (\*\*p<0,01 ANOVA probaren arabera. IgG kontrolarekiko aberastea #p<0,05, ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera). **C)** RT-qPCR bidez neurtutako *XPO1*en adierazpena pertsona helduetatik eta haurrengandik erauzitako RNA, n=6-16. (\*p<0,05, \*\*\*p<0,001 ANOVA probaren arabera). **D)** Talde bakoitzeko 5-10 laginen *XPO1*en immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta immunoblotaren laburpen kuantitatiboa (eskuinean) KTR, EZ eta GGD biopsia pediatrikoetan zein helduetan, n=14-16. (\*p<0,05, ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera).

Gure emaitzek erakutsi dute SNParen genotipoak XPO1 proteina mailan eragiten duela eta *XPO1* areagotu egiten dela EZ gaixoetan. Giza hesteetako RNA laginetan *XPO1*en 5'UTRa metilatua dagoela egiaztatu dugu, zehatzago esanda, zelula epitelialen frakzioetan. Emaidza hauek kontuan hartuta, *in vitro* eta *in vivo* azterketa gehiago egin ziren rs3087898 SNPak eta m<sup>6</sup>A metilazioak *XPO1* mailan duten parte-hartzea funtzionalki aztertzeko eta ondorengo hanturan duten eragina deskribatzeko.

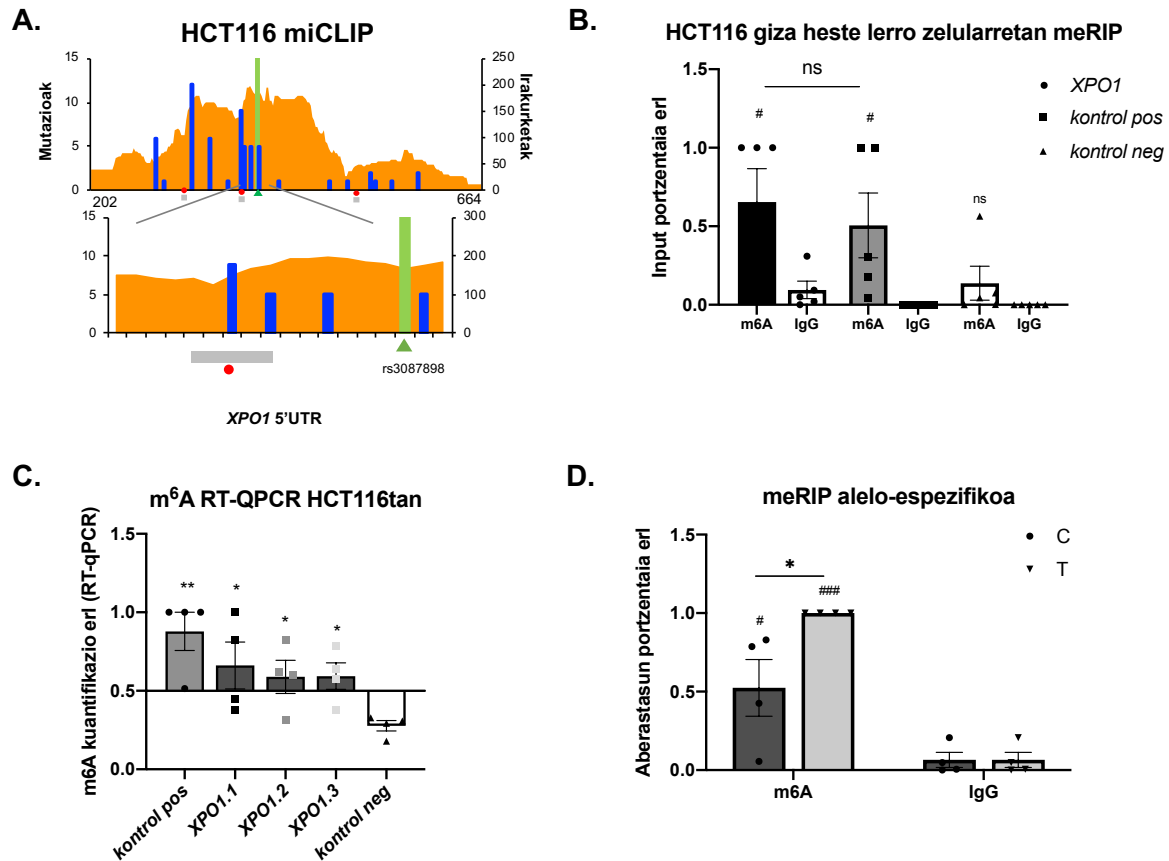
### **4.3.3. rs3087898 SNPa eta m<sup>6</sup>A RNA metilazioaren karakterizazio funtzionala *XPO1*en**

#### *4.3.3.1. rs3087898 SNPa eta m<sup>6</sup>A mailen eragina *XPO1*en in vitro*

##### 4.3.3.1.1. HCT116 heste zelula-lerroa

*XPO1*en 5'UTRa giza frakzio epitelialetan soilik metilatzen dela ikusi genuenez, ikerketa honetarako *in vitro* eredu egokiena HCT116 heste zelula-lerroa zela erabaki genuen, rs3087898 SNP-erako heterozigotoa dena.

Sarean eskuragarri dauden HCT116 zelulen m<sup>6</sup>A nukleotido bakarreko erresoluzioko gurutzatze eta immunoprezipitazio (ingelesez m<sup>6</sup>A individual-nucleotide-resolution crosslinking and immunoprecipitation edo miCLIP) datuak erabiliz (Van Tran et al., 2019), 5'UTRko hiru m<sup>6</sup>A kontsentsu-motiboak (20.B irudia) benetan metilatuta daudela baieztatu dugu (23.A. irudia). HCT116n *XPO1*en 5'UTRaren m<sup>6</sup>A metilazioa baieztatze m<sup>6</sup>A RNA immunoprezipitazioa (meRIP) eta ondorengo RT-qPCR teknika erabili zen hesteetako zelula-lerro honetan (23.B irudia). Gainera, aurretik deskribatutako m<sup>6</sup>A-RT-qPCR metodoa ere erabili zen hiru motiboak metilatuta daudela egiaztatze (23.C irudia). Horrez gain, HCT116 zelula-lerroaren EZrekin lotutako SNP-erako heterozigosia aprobetxatuz, EZ arrisku aleloa duen mRNA transkripto (*XPO1\**T**) bere forma babesgarri alternatiboa (*XPO1\**C**) baino metilatuagoa dagoela aurkitu dugu (23.D irudia).

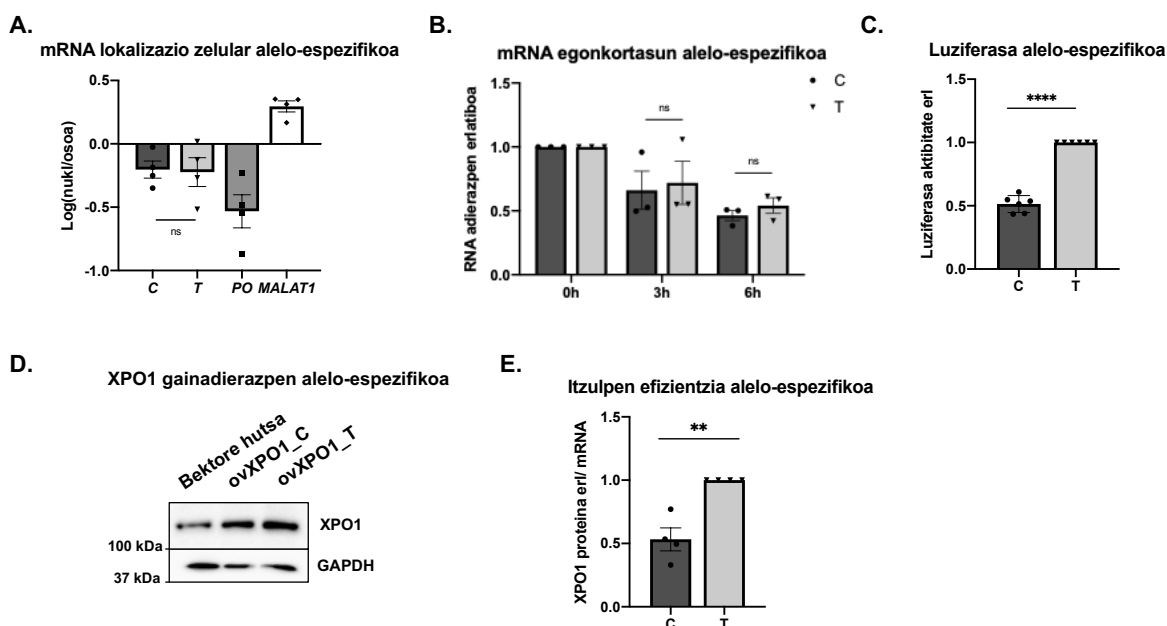


**23. Irudia A)** HCT116 zeluletako (rs3087898rako heterozigotoa) miCLIP irakurketen (laranja) eta mutazioen (urdina) irudikapen kuantitatiboa *XPO1*en 5'UTRan. Karratu grisek GGACT motiboak adierazten dituzte, puntu gorriak A metilatuak dira eta triangelu eta barra berdeak asoziatuiko SNPari dagozkie. **B)** HCT116 heste zelula-lerroan m<sup>6</sup>A RNA immunoprezipitazioa (meRIP) eta RT-qPCR bidez kuantifikazioa *XPO1*en 5'UTRan eta kontrol positibo eta negatiboetan, n=5. (\*\*\*\*p<0,0001; ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera. IgG kontrolarekiko aberastea #p<0,05, ###p<0,001, #####p<0,0001 ANOVA probaren arabera). **C)** *XPO1*en 5'UTRko 3 m<sup>6</sup>A motiboak eta kontrol positibo eta negatiboak m<sup>6</sup>A-RT-qPCR bidez heste-zeluletan kuantifikatuak, n=4. Esangarritasuna kontrol negatiboarekiko kalkulatu da. (\*p<0,05,\*\*p<0,01 ANOVA probaren arabera). **D)** HCT116 zeluletan *XPO1*en 5'UTRan m<sup>6</sup>A maila alelo-espezifikoak meRIP-qPCR bidez ebaluatutakoaren arabera, n=4. (\*\*p<0,01 ANOVA probaren arabera. IgG kontrolarekiko aberastea #p<0,05, #####p<0,0001 ANOVA probaren arabera).

## 4.3.3.1.2. XPO1en 5'UTRko metilazioa eta RNA metabolismoa

Jakina da m<sup>6</sup>A metilazioak RNAren prozesu metaboliko ezberdinetan parte hartzen duela, beraz, metilazio diferentzial honek *XPO1*en mRNAen dituen ondorioak argitu nahi izan ditugu.

Ez dugu desberdintasunik ikusi mRNA zelularen lokalizazioan (24.A) edo mRNA egonkortasunean (24.B) babes (*XPO1*\*C) eta arrisku (*XPO1*\*T) formak alderatzean. Hala ere, itzulpen-eraginkortasunaren analisiak, *XPO1*en 5'UTRa duen luziferasa plasmidoa erabiliz, luziferasa jarduera handiagoa erakutsi zuen T aleloaren presentzian (24.C irudia), SNP honek itzulpen-prozesuan duen inplikazioa iradokiz. 5'UTR forma bakoitza *XPO1* sekuentzia kodetzailearen aurretik klonatutako konstruktuekin emaitza hauek baieztatu ziren, non arrisku alelo formak XPO1 proteina-ekoizpen handiagoa erakutsi zuen (24.D, E).



**24. Irudia A)** *XPO1*en mRNA bien, *XPO1*\*C (C) eta *XPO1*\*T (T), eta *PO*ren (kontrol zitoplasmatikoa) eta *MALAT1*en (kontrol nuklearra) lokalizazio zelularra, n=4. (ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera). **B)** Bi *XPO1* mRNAen egonkortasuna, *XPO1*\*C (C) eta *XPO1*\*T (T), aktinomizina Drekin tratatutako zeluletan 3 ordu eta 6 orduz, n=3. (ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera). **C)** *XPO1*en 5'UTRaren alelo bakoitzaren itzulpen-eraginkortasuna luziferasa test bidez ebaluatua, n=6. (\*\*\*\*p<0,0001 Student t-testaren arabera). Itzulpen-eraginkortasuna *XPO1*en 5'UTRaren bi formak cDNAren aurretik klonatutako

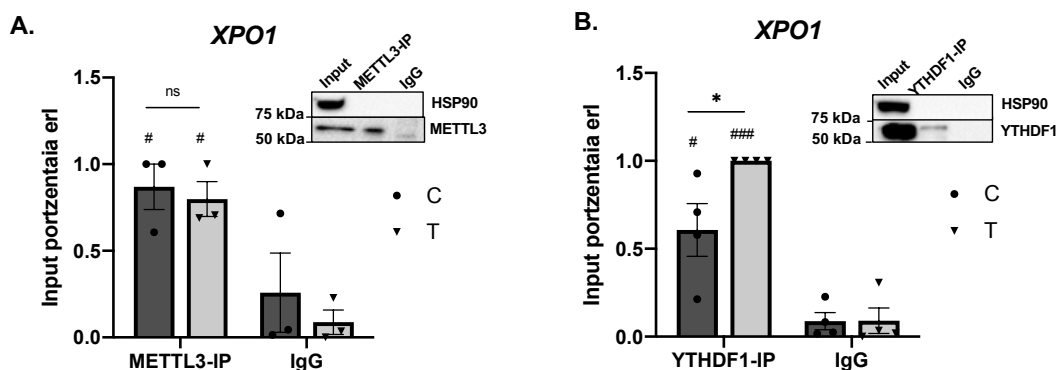


plasmidoen transfekzioaren bidez ebaluatua, **D**) immunoblot adierazgarria eta **E**) XPO1 mailen laburpen datu kuantitatiboak, n=4. (\*p<0,05 Student t-testaren arabera). Balio guztiak batez bestekoa ± SEM dira.

#### 4.3.3.1.3. METTL3 eta YTHDF1 bidezko XPO1en erregulazioa

Giza zeluletan YTHDF1ek eragindako itzulpenaren gainadierazpena baieztatzen duen m<sup>6</sup>A-QTL ikerketa bat kontuan hartuta (Zijie Zhang et al., 2020), XPO1en itzulpena alelo-espezifiko dela eta arrisku aleloak metilazio handiagoa erakusten duela ikusita, YTHDF1 m<sup>6</sup>A proteina irakurleak alelo bakoitzari modu ezberdinean lotu eta haien itzulpenean eragin dezakelaren hipotesia planteatu dugu (X. Wang et al., 2015).

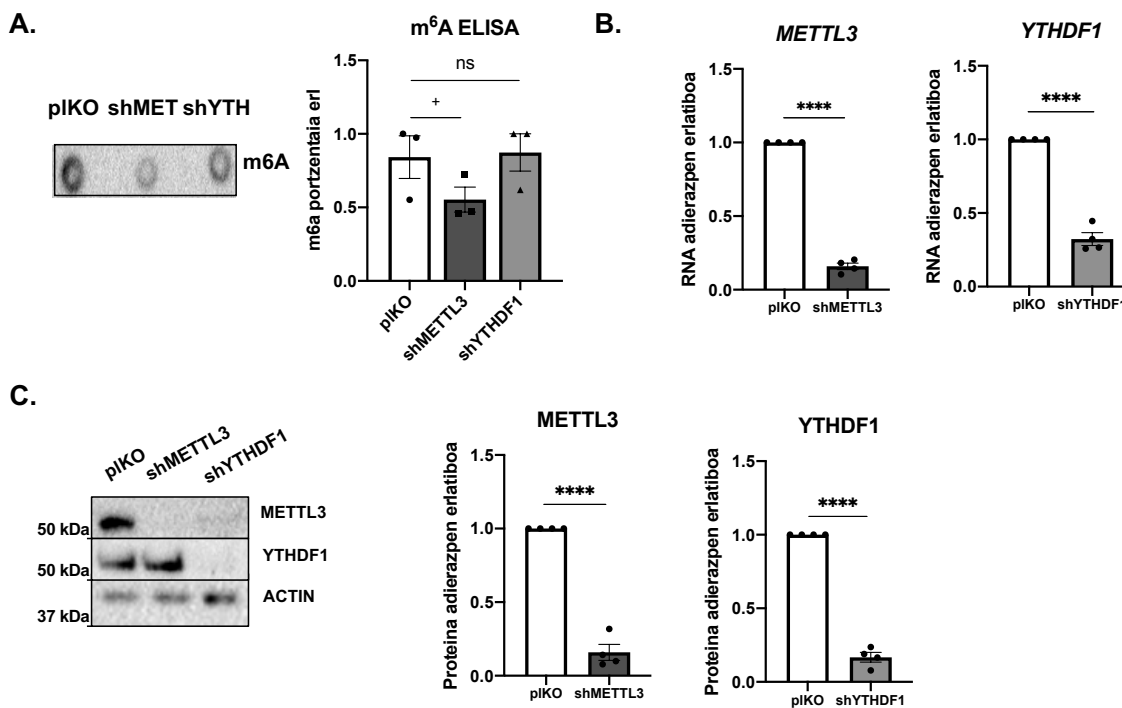
METTL3 eta YTHDF1 proteinek XPO1en 5'UTRarekin modu alelo-espezifiko batean elkarrengaitan duten ala ez argitzeko, RNA immunoprecipitazio (RIP) saiakuntzak egin ditugu eta immunoprecipitatutako XPO1 mRNA alelo-espezifiko kopurua kuantifikatu ditugu (25. irudia). METTL3k aleloekiko lehentasunezko loturarik erakutsi ez zuen arren (F25.A), YTHDF1 arrisku alelora (XPO1\*T) gehiago lotzen dela ikusi zen (F25.B), alelo honentzat ikusitako itzulpen-eraginkortasun handiagoarekin bat etorritz.



**25. Irudia A)** XPO1en METTL3 immunoprecipitazio (IP) alelo-espezifiko eta ondoren RT-qPCR bidez kuantifikatua, n=3. (ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera. IgG kontrolarekiko aberastea #p<0,05 ANOVA probaren arabera). IP esperimenduaren immunoblot adierazgarria HSP90 IParen kontrol negatibo gisa (eskuinean). **B)** XPO1en YTHDF1 immunoprecipitazio (IP) alelo-espezifiko eta ondoren RT-qPCR bidez kuantifikatua, n=4. (\*p<0,05 ANOVA probaren

arabera. IgG kontrolarekiko aberastea  $##p<0,01$ ,  $####p<0,0001$  ANOVA probaren arabera). IP esperimentuaren immunoblot adierazgarria HSP90 IParen kontrol negatibo gisa (eskuinean).

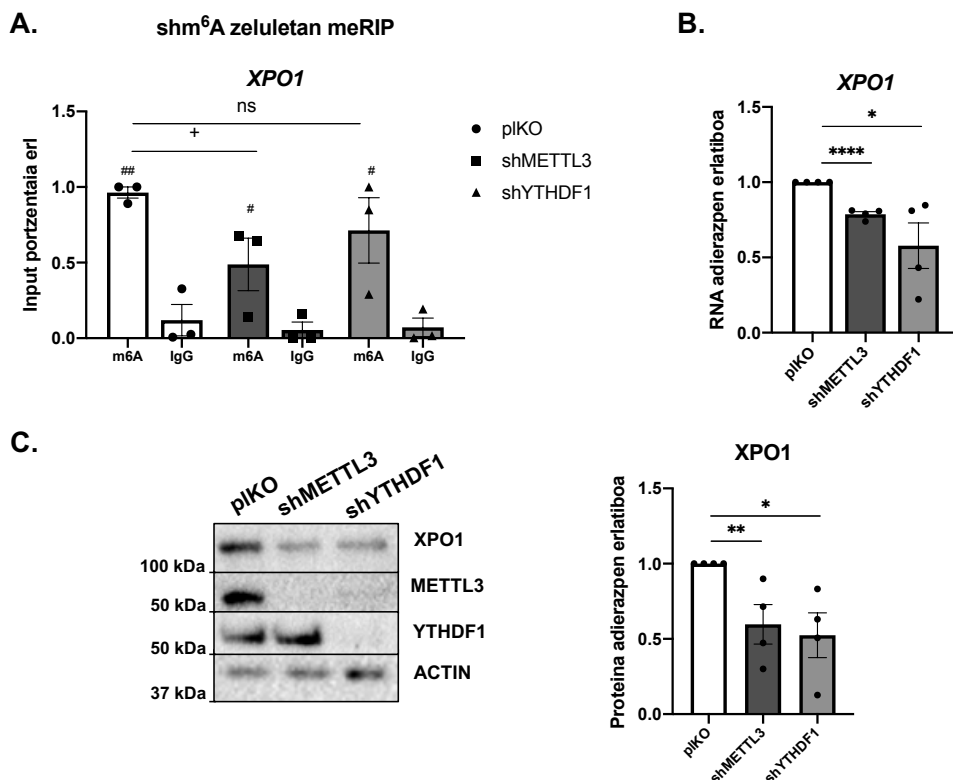
$m^6A$  makineriak XPO1 proteina mailetan duen inplikazioa sakonago aztertzeko, METTL3 eta YTHDF1 KD HCT116 zelula-lerro egonkorak sortu genituen (26. Irudia). METTL3 isilaraztean  $m^6A$  mailen jaitsiera orokorra (F26.A) eta METTL3 eta YTHDF1en mRNA (F26.B) eta proteina (F26.C) mailen % 70 baino gehiagoko murrizketa lortu genuen.



**26. Irudia A)** METTL3 eta YTHDF1 isilarazitako zeluletan RNAren metilazio orokorra  $m^6A$  dot blot bidez neurtua (ezkerrean) eta  $m^6A$  Elisa kit komertzial baten bidez kuantifikatuta (eskuinean),  $n=3$ . ( $+p<0,1$ ; ns: ez-esanguratsua Student t-testaren arabera). **B)** METTL3 eta YTHDF1 RNA adierazpen erlatiboa RT-qPCR bidez neurtutako zelula isilarazietan,  $n=4$ . ( $***p<0,001$ ,  $****p<0,0001$  Student t-testaren arabera). **C)** METTL3 eta YTHDF1 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen kuantitatiboa (eskuinean),  $n=4$ . ( $***p<0,001$  Student t-testaren arabera).

KD zelula hauek aprobetxatuz,  $m^6A$  deserregulazioaren ondoriozko XPO1en adierazpen aldaketak aztertu ditugu. METTL3 KD bidezko  $m^6A$  maila orokorraren murrizketak XPO1en 5'UTRaren metilazioa gutxiagotzea eragin zuen (27.A. irudia).

Ondorioz, baldintza honetan *XPO1* mRNA eta proteina kopuru txikiagoak ikusi ziren (27.B, C irudia). *XPO1* mRNA eta proteina mailak ere jaitsi ziren YTHDF1 isilaraztean (27.B, C irudiak), nahiz eta m<sup>6</sup>A maila orokorrak ez ziren aldatu zelula horietan (26.A eta 27.A irudiak).



**27. Irudia A)** *XPO1*en 5'UTRren m<sup>6</sup>A RNA immunoprezipitazioa (meRIP) eta ondorengo RT-qPCR (\* $p < 0,05$ ; ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera. IgG kontrolarekiko aberastea + $p < 0,1$ , #).  $p < 0,05$ , ## $p < 0,01$  ANOVA probaren arabera). **B)** *METTL3* eta *YTHDF1* isilarazitako zeluletan *XPO1*en RNA adierazpen erlatiboa RT-qPCR bidez neurtuta (\* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  Student t-testaren arabera). **C)** *XPO1* immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen kuantitatiboa (eskuinean),  $n = 4$ . (\* $p < 0,05$  Student t-testaren arabera).

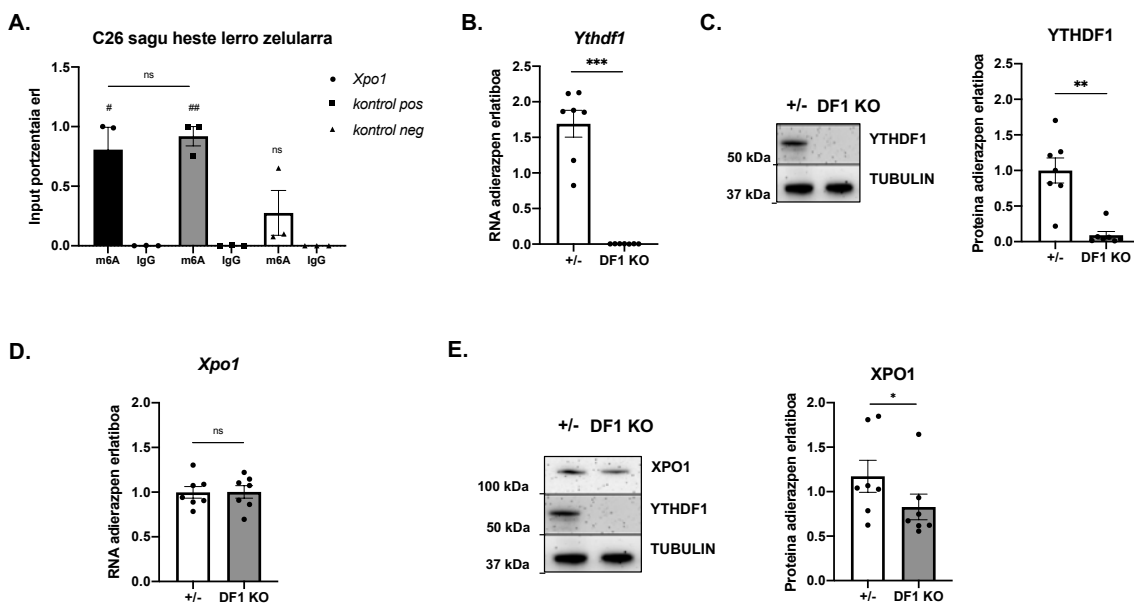
Emaitza hauek erakusten dute 5'UTRaren metilazioa beharrezkoa dela *XPO1*en transkripzio mailak eta itzulpen egokia mantentzeko, eta iradokitzen dute *XPO1*en itzulpena YTHDF1 proteina irakurleak 5'UTRa metilatuta duen mRNA ezagutzearen bitartez gertatzen dela.

### 4.3.3.2. *m*<sup>6</sup>A mailen eragina *XPO1*en *in vivo*

#### 4.3.3.2.1. *Ythdf1*en eragina *Xpo1*en *in vivo*

Lehenik eta behin C26 saguen hesteetako zelula-lerroa erabiliz, *Xpo1*en 5'UTRa saguetan ere metilatua dagoela baieztatu genuen (28.A. Irudia).

*XPO1*en itzulpenean *m*<sup>6</sup>A eta *YTHDF1*en parte-hartzea berresteko, *Ythdf1* knock out sagu eredua aztertu dugu. Sagu kontrolen (WT) eta *Ythdf1* KO saguen duodenotik isolatutako heste-zelulak gure aurreko emaitzak *in vivo* baieztatzen erabili ziren (28. B, C irudiak).



**28. Irudia A)** C26 saguaren heste-zeluletan *m*<sup>6</sup>A immunoprezipitazioa (meRIP) eta RT-qPCR bidez kuantifikatutako *XPO1* 5'UTRa eta *m*<sup>6</sup>A kontrol positibo eta negatiboak, n=3. (ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera. IgG kontrolarekiko aberastea ###*p*<0,001 ANOVA probaren arabera). **B)** RT-qPCR bidez neurtutako *Ythdf1*en adierazpen erlatiboa WT (+/-) eta *Ythdf1* KO saguetan (DF1 KO), n=7. (\*\**p*<0,001 Mann Whitney testaren arabera). **C)** YTHDF1 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboak (eskuinean), n=7. (\*\**p*<0,01, Mann Whitney testaren arabera). **D)** RT-qPCR bidez neurtutako *Xpo1*en adierazpen erlatiboa WT (+/-) eta *Ythdf1* KO saguetan (DF1 KO), n=7. (\*\**p*<0,01, \*\*\**p*<0,001, ns: ez-esanguratsua Mann Whitney testaren arabera). **E)** XPO1 immunoblot adierazgarria (ezkerrean)

eta laburpen datu kuantitatiboak (eskuinean),  $n=7$ . (\* $p<0,05$ , Mann Whitney testaren arabera). Balio guztiak batez bestekoa  $\pm$  SEM dira.

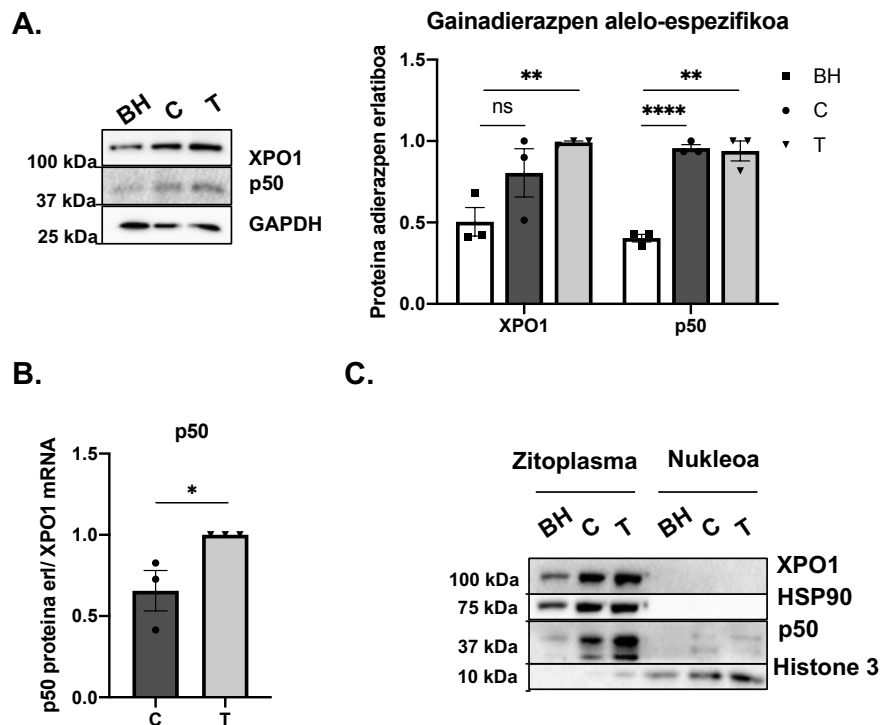
Hala, WT eta *Ythdf1* KO saguen duodenoko hesteetako epitelio-zeluletan egindako *Xpo1* mailen kuantifikazioak *in vivo* baieztatu zuen *YTHDF1*en inplikazioa XPO1 proteina kopuruaren erregulazioan. Izan ere, mRNA mailan desberdintasun esanguratsurik ikusi ez bazen ere (28.D irudia), *Ythdf1* KO saguen duodenotik isolatutako epitelio-zelulek XPO1 proteina kantitate nabarmen txikiagoak erakutsi zituzten WT kideek baino (28.E irudia).

Ondorioz, *in vivo* emaitzek baieztatu zuten YTHDF1 irakurlea XPO1en 5'UTR metilatuari lotzen zaiola bere itzulpena errazteko.

#### 4.3.3.3. XPO1en rola EZrekin lotutako hanturan

Orain arte frogatu dugu EZri lotutako SNPak XPO1 proteina mailan eragiten duela arrisku aleloaren metilazio maila desberdinaren bidez. Baina are gehiago aztertu nahi izan dugu asoziazio honek EZ garatzeko arriskuan duen eragina. XPO1 inhibitzaileekin saiakera asko egin dira minbiziaren aurkako sendagai gisa NF-kB-ren jarduera gutxitzeko duten gaitasunagatik (M, 2016) eta NF-kB EZ gaixoetan gainadierazita dagoela jakina da (Fernandez-jimenez et al., 2014; Maiuri et al., 2003). Horrela, giza heste-zeluletan XPO1\**T* forman m<sup>6</sup>A maila altuagoak eta XPO1 proteinaren ondorengo indukzioak NF-kB-ri eta ur-beherako hantura-bideari eragiten dioten ala ez aztertu nahi izan dugu.

Goian azaldu bezala, arrisku alelo forman (XPO1\**T*) dauden m<sup>6</sup>A maila altuek XPO1 proteina kopuru handiagoak eragiten dituzte (24.E. irudia). Gure hipotesiarekin bat etorritz, XPO1\**T* forma gainadierazitako zelulek NF-kB p50 azpiunitatearen indukzio eta aktibazio nabarmen handiagoak erakutsi zituzten (F29.A-C).

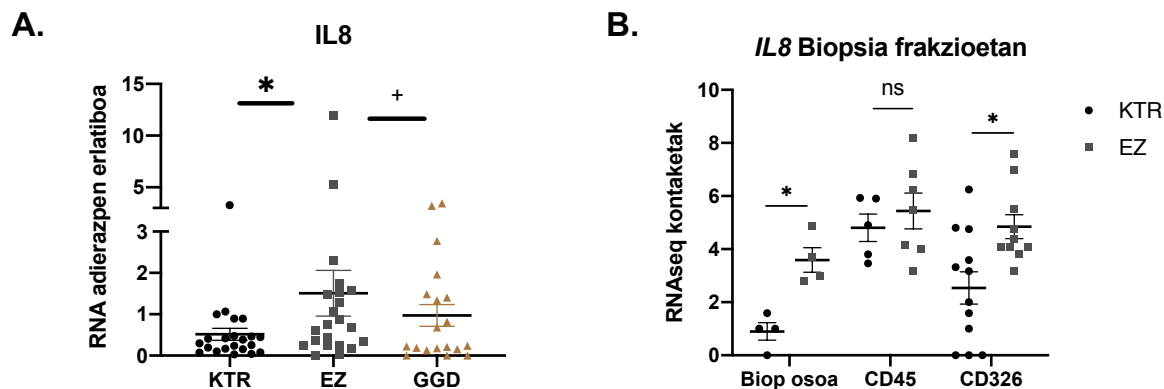


**29. Irudia A)** XPO1 eta p50 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen kuantitatiboa (eskuinean) XPO1 gainadierazitako zeluletan,  $n=3$ . (\* $p<0,05$ , \*\*\* $p<0,001$  ANOVA probaren arabera). **B)** XPO1ekiko p50 mailen laburpen datu kuantitatiboak. (\* $p<0,05$ . Student-en t-testaren arabera). **C)** Lokalizazio nuklearraren bidez ebaluatutako p50en aktibazioa XPO1 gainadierazitako zeluletan, HSP90 kontrol zitoplasmiko gisa erabili zen eta H3 kontrol nuklear gisa.

NF- $\kappa$ B aktibatzeak gene ituen promotoreekin lotura handiagotzea dakar haien transkripzioa eragiteko. IL8 kimiokina hautagai ona zen, lehenago glutenaren aurrean erantzuten duen zitokina gisa identifikatu baitzen (Tye-Din et al., 2017) eta XPO1ek arautzen duen NF- $\kappa$ B-ren gene itu bat delako (Roebuck, 1999).

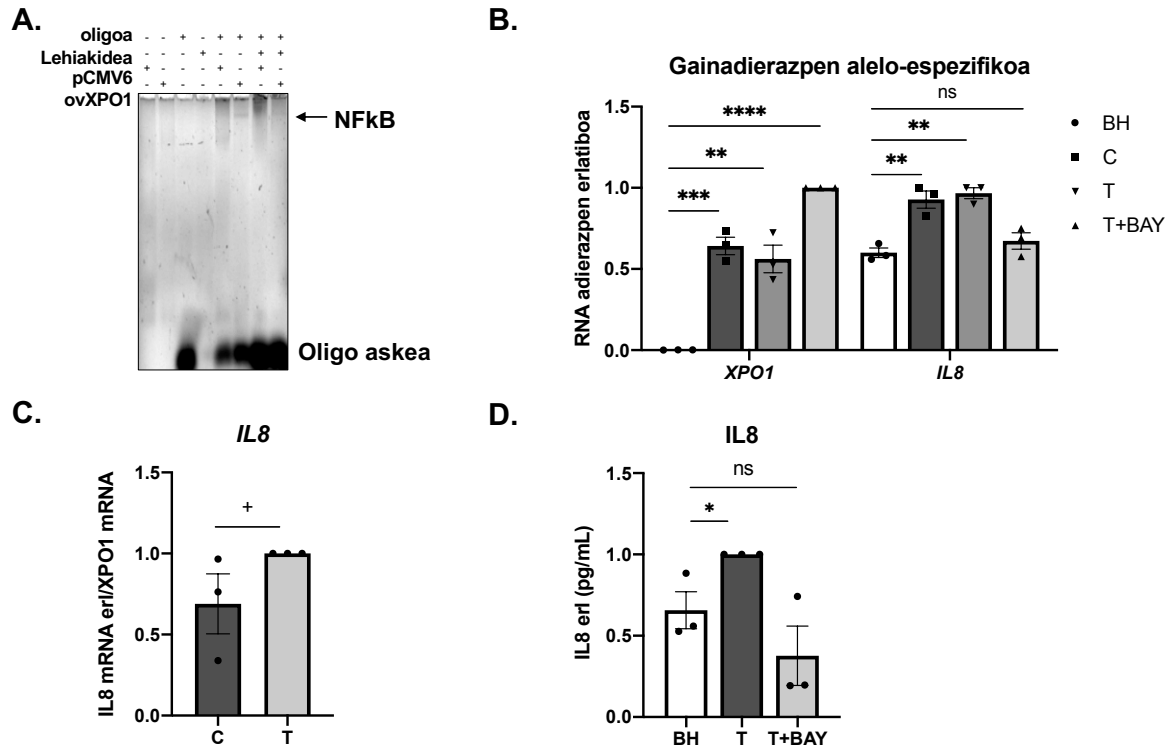
Lehenago analizatutako geneekin gertatu moduan, IL8ren adierazpena EZ aktiboko pazienteetan areagotua dagoela eta glutena dietatik kendu ondoren murriztu egiten dela ikusi genuen (30.A. irudia). Ondoren, IL8ren adierazpena kuantifikatu zen kontrolen eta gaixo zeliako aktiboen biopsia osoetan, baita frakzio immune (CD45+) eta epitelialetan (CD326+), epitelio-zelulek bidezidor honetan duten inplikazioa

baieztatzeko. Ikusi genuen zelula immuneak *IL8*ren ekoizle nagusiak direla dirudien arren, kontrolen eta EZ aktiboko gizabanakoen artean ikusitako aldeak frakzio epitelialetik datozela batez ere (30.B. irudia).



**30. Irudia A)** RT-qPCR bidez neurtutako *IL8*ren adierazpena pertsona heldu eta haurren biopsietatik ateratako RNA<sub>n</sub>, n=6-16. (+p<0,1; \*p<0,05 ANOVA probaren arabera). **B)** *IL8*ren adierazpena aurreko RNAseq ikerketa batetik aterata (Fernandez-Jimenez et al., 2019) biopsia osoetan, CD45<sup>+</sup> zelula immune-frakzioetan eta CD326<sup>+</sup> zelula epitelial-frakzioetan KTR eta EZ laginetan, n=4-12. (\*p<0,05, ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera).

*XPO1*ek *IL8*ren indukzioan duen inplikazioa gehiago aztertzeko, EMSA esperimentuak egin ziren HCT116 zeluletan. *XPO1* gainadierazita duten zelulen frakzio nuklearrek *IL8* promotoreko NF- $\kappa$ B kontsensu-sekuentziarekin proteina lotura handiagoa dutela erakutsi genuen (31.A. irudia). Gainera, p50 proteinaren aktibazioan gertatu zen bezala, *XPO1* gainadierazten duten zeluletan *IL8* adierazpena handiagoa dela ikusi dugu (31.B irudia), eta berriro ere, indukzio hori nabariagoa dela *XPO1*<sup>\*T</sup> formaren aurrean (31. C). *XPO1* bidezko *IL8* igoera hau NF- $\kappa$ B-ren menpekoa dela ere baieztatu dugu, BAY 11-7082 (NF- $\kappa$ B inhibitzaile bat) tratamenduak *XPO1* bidezko *IL8*ren indukzioari aurre egin baitio (31. B, D).



**31. Irudia A)** Bektore huts batekin (pCMV6) edo XPO1 gainadierazpen plasmidoarekin (ovXPO1) transfektatutako HCT116 zeluletatik ateratako frakzio nuklearrak aztertu ziren, 10X markarik gabeko proba lehiakide gisa erabiliz. 2 esperimentu independenteren gel adierazgarri bat erakusten da. **B)** XPO1 eta IL8ren RT-qPCR bidez neurtutako adierazpen erlatiboa bektore huts batekin (BH) transfektatutako zeluletan, XPO1 forma biak (C eta T) edo XPO1 gainadierazten duten zelulak NF-κB BAY 11-7082 inhibitzailearekin (T+BAY) baldintzetan, n=3. (\*\*p<0,001, \*\*\*\*p<0,0001, ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera). **C)** IL8ren adierazpena RT-qPCR bidez kuantifikatuta XPO1 forma biak gainadierazten dituzten zeluletan; n=3. (+p<0,1, Student-en t-testaren arabera). **D)** ELISA bidez neurtutako IL8 jariatua bektore huts batekin (BH) edo XPO1\*T gainadierazten duten zelulen medioan NF-κB BAY 11-7082 inhibitzailearen presentzian (T+BAY) edo gabe (T), n=3. (+p<0,1, ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera).

Emaitza hauek erakusten dute arrisku alelo forman (XPO1\*T) XPO1 maila handitzeak NF-κB bidezko hantura-erantzunaren indukzio handiagoa eragiten duela, eta horrela EZ garatzeko suszeptibilitatea areagotzen duela.



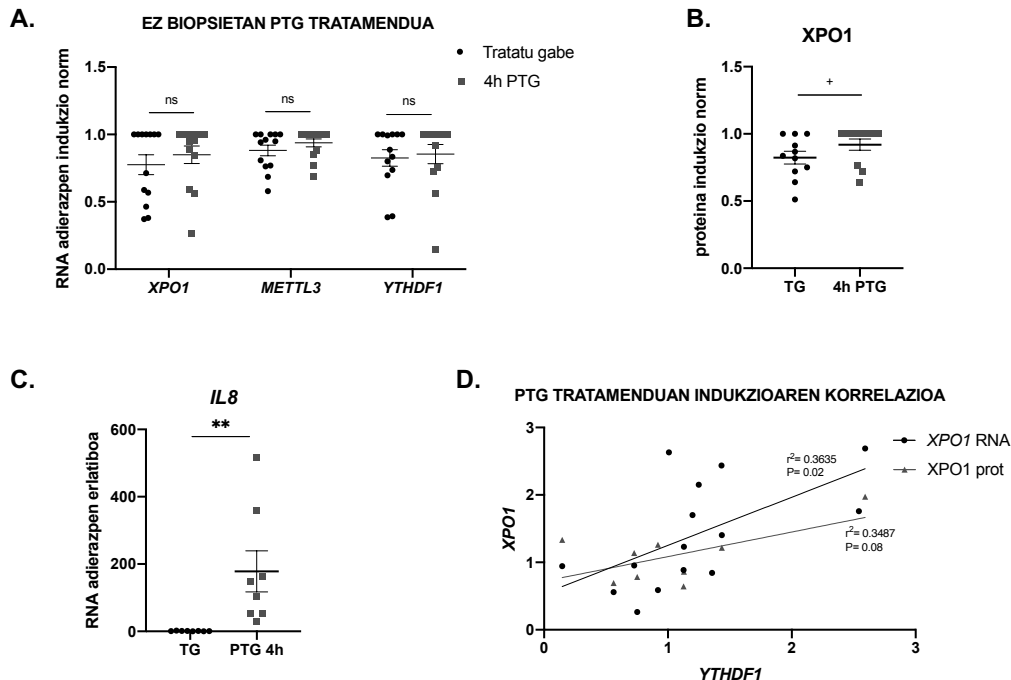
## 4.4. GLUTENAREN EKARPENA m<sup>6</sup>A METILAZIOARI ETA XPO1 BIDEZIDORRARI

### 4.4.1. Gluten estimulazioa: Giza biopsiak

EZ gaixoen dietatik glutena kentzeak m<sup>6</sup>A makineriari, *XPO1* eta ur-beherako *IL8* adierazpen mailari eragiten ziola zirudien, beraz, glutenak bide honetan duen eginkizuna baieztatu nahi izan genuen. Horretarako, EZ aktiboko pazienteen biopsiak bi zatitan moztu eta PTGrekin edo gabe inkubatu ziren 4 orduz (12. irudia).

*METTL3*, *YTHDF1* eta *XPO1* mRNA mailak areagotzen diren joera bat detektatu genuen (32.A), baita *XPO1* proteina maila igoera (32.B), PTGrekin tratatutako biopsietan. PTGrekin tratatutako biopsia zatietan *IL8*ren gainadierazpena ere baieztatu genuen (32.C irudia), prozesu honetan glutenak duen eginkizuna are gehiago azpimarratuz.

Interesgarria da, hesteetako biopsietan *YTHDF1*en PTGk eragindako hazkundea *XPO1*en igoerarekin nabarmen erlazionatua dagoela (32.D irudia), m<sup>6</sup>A irakurle honek gure ehun-estimulazio ereduan ikusitako glutenaren menpeko *XPO1* indukzioan duen garrantzia baieztatuz.



**32. Irudia A)** Tratatu gabeko eta PTGrekin inkubatutako biopsietan RT-qPCR bidez neurtutako *XPO1*, *METTL3* eta *YTHDF1*en RNA adierazpena,  $n=15$ . Balioak batz besteko indukzioak dira  $\pm$  S.E.M. ( $+p < 0,1$ , ns: ez-esanguratsua Mann Whitney testaren arabera). **B)** Tratatu gabeko (TG) eta gliadinarekin (PTG) 4 orduz inkubatutako biopsietan ELISA bidez neurtutako XPO1 proteina mailak,  $n=13$ . ( $+p < 0,1$  Mann Whitney probaren arabera). **C)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin inkubatutako biopsietan RT-qPCR bidez neurtutako *IL8* adierazpena. ( $**p < 0,01$  Mann Whitney testaren arabera). Balio guztiak batez bestekoa  $\pm$  SEM dira. **D)** *YTHDF1* eta *XPO1*en arteko indukzioaren korrelazioa PTGrekin tratatutako biopsietan. Triangeluak *XPO1* mRNAri dagozkio eta puntuak XPO1 proteinaren indukzioari.  $n=9-15$ , (R eta p Pearsonen korrelazioaren bidez kalkulatu ziren).

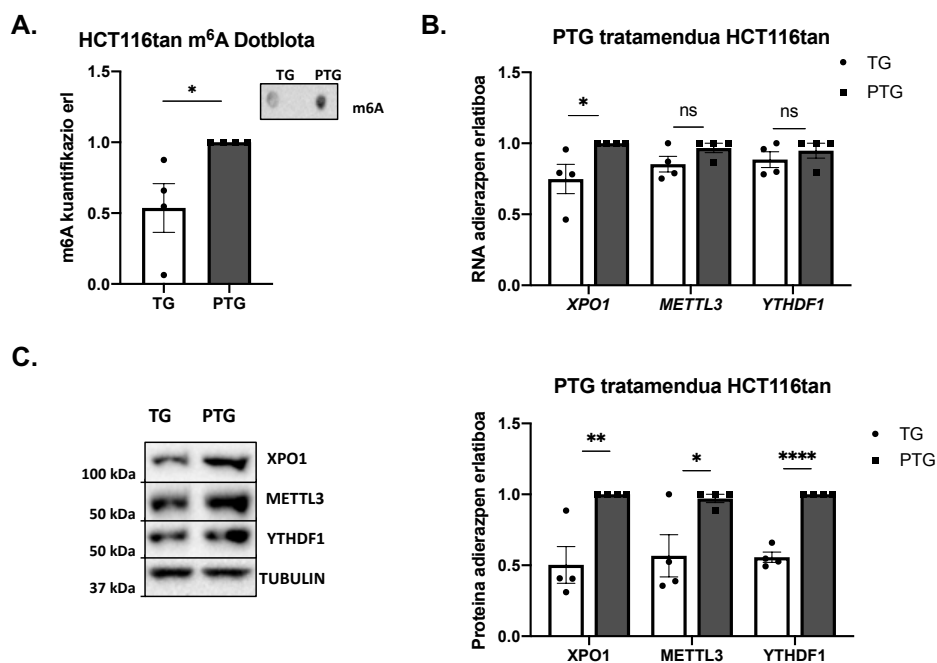
Glutenak  $m^6A$  makinarian eta *XPO1*en erregulazioan, baita ondoriozko hanturaren indukzioarekin batera, izan dezakeen inplikazioa ikusi genuenez, gure hurrengo helburua glutenak bide hori nola erregulatzen duen argitzea izan zen.

#### 4.4.2. Gluten estimulazioa: *in vitro* eredia

##### 4.4.2.1. Glutena eta m<sup>6</sup>A metilazioa

Glutenak *XPO1* mailan nola eragin zezakeen ulertu nahi genuen eta erregulazio hori m<sup>6</sup>A metilazioarekin nolabait araututa ote dagoen. mRNAen 5'UTRretako m<sup>6</sup>A markak estres-estimuluen gainean itzulpenaren aktibazioan funtsezko faktoreak direla deskribatu da (Coots et al., 2017). Gliadina estimulazioak (EZren ingurumen-abiarazlea) m<sup>6</sup>A markak areagotzen dituen eta *XPO1* mailaren igoeran ekarpenik duen zehazteko, HCT116 hesteetako lerro-zelularra PTGrekin estimulatu genuen (13. irudia).

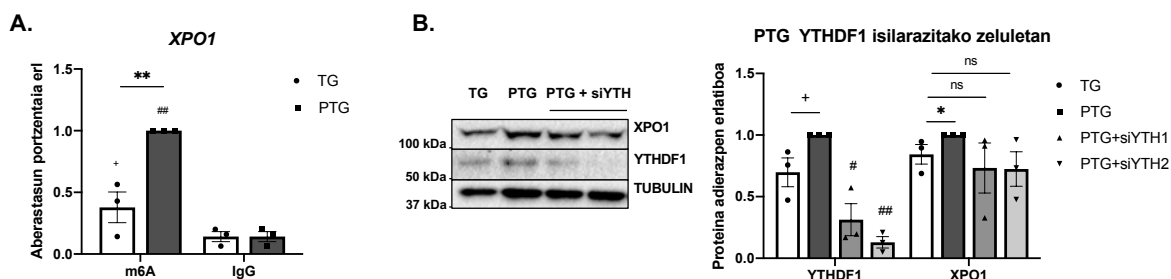
Giza laginekin lortutako emaitzekin bat etorritz, m<sup>6</sup>A maila orokorren igoera ikusi genuen (33. A irudia), *METTL3*, *YTHDF1* eta *XPO1* adierazpen handiagoarekin batera (33. B irudia), baita proteina maila altuagoa ere (F33.C) HCT116 zelulak PTGrekin estimulatu zirenean.



**33. Irudia A)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako zeluletan RNAREN metilazio kuantifikazio orokorra m<sup>6</sup>A dot blot adierazgarri baten bidez azalduta (goian eskuinaldean), n=4. (\*p<0,05 Student t-testaren arabera). **B)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako zeluletan *XPO1*, *YTHDF1* eta *METTL3*ren RT-qPCR bidez neurtutako adierazpen erlatiboa, n=4.

(\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , ns: ez-esanguratsua Student t-testaren arabera). **C)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako zeluletan XPO1, METTL3 eta YTHDF1 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboak (eskuinean).  $n=4$ . (+ $p < 0,1$ , \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , Student t-testaren arabera).

Espero zen bezala, PTG estimulazioaren ondoren XPO1en 5'UTRko m<sup>6</sup>A mailak handiagoak zirela ere ikusi genuen (34. A. Irudia), honek gliadinak eragindako XPO1 proteina mailen igoera 5'UTRko m<sup>6</sup>Aren igoeraren bidez gertatzen dela iradokitzen du. Ideia hau gehiago babestuz, YTHDF1 isilarazitako zeluletan PTG estimulazioak egin zirenean XPO1 mailak ez ziren aldatu (34.B irudia).



**34. Irudia A)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako zeluletan meRIP-qPCR bidez ebaluatutako XPO1en 5'UTRko m<sup>6</sup>A mailak,  $n=3$ . (\*\*\* $p < 0,001$  ANOVA probaren arabera. IgG kontrolarekiko aberastea + $p < 0,1$ ; ##### $p < 0,0001$  ANOVA probaren arabera). **B)** Tratatu gabeko (TG), PTGrekin tratatu (PTG) eta PTGrekin tratatu eta YTHDF1 isilarazitako (PTG+siYTH) zelulen XPO1 eta YTHDF1 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboa (eskuinean),  $n=3$ . (+ $p < 0,1$ , ns:ez-esanguratsua, Student t-testaren arabera). Isilarazpenaren eraginkortasuna TG zelulekin alderatuta (# $p < 0,05$ , Student t-testaren arabera).

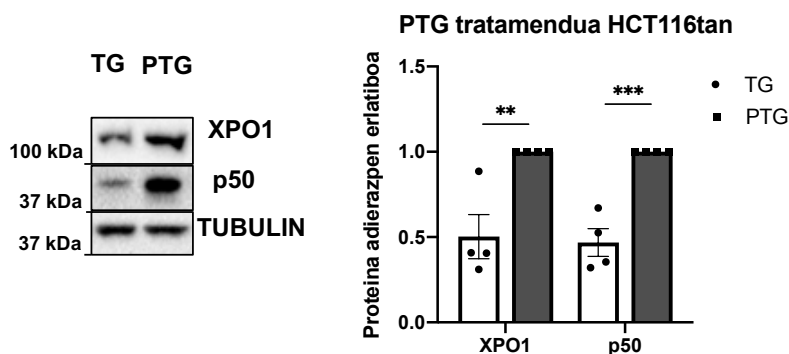
Batera hartuta, gure emaitzek erakusten dute gliadinak m<sup>6</sup>A makineria aktibatzen duela, XPO1en 5'UTRan metilazio-mailak handituz eta YTHDF1en menpeko XPO1 proteina kopuruaren igoera eragiten duelarik.

#### 4.4.2.2. Glutena eta m<sup>6</sup>A bidezko hantura

Jakina da gliadinak NF- $\kappa$ B aktibazioa eta zitokinen askapen handiagoa eragiten duela giza zelula immuneetan (Jelínková et al., 2004) eta hesteetako epitelio-

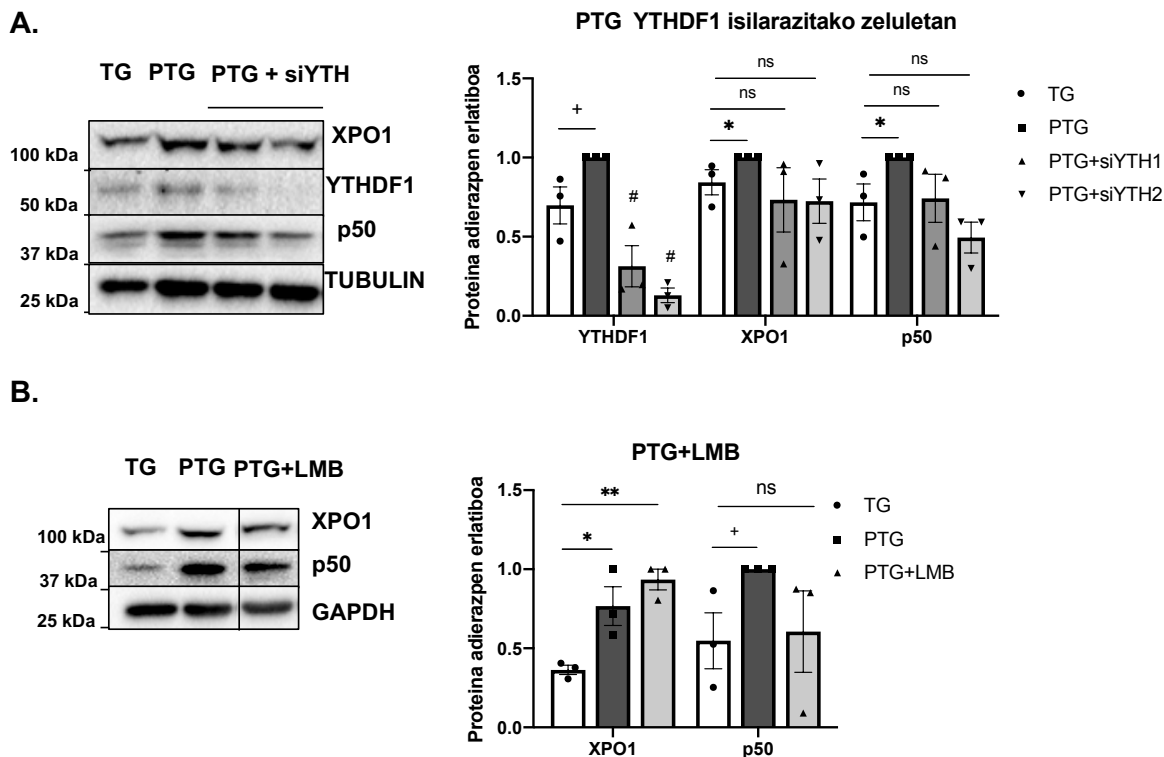
zeluletan (Capozzi et al., 2013). Hala ere, zelula mota espezifikotasuna eta gliadinak eragindako hanturaren azpian dauden mekanismoak ez dira guztiz ulertzen. *XPO1\*<sup>T</sup>* formak m<sup>6</sup>A maila handiagoak izateak NF-κB aktibatzen duela eta *IL8*ren adierazpena handitzen duela frogatu dugu. Ondorioz, PTGren aurrean gertatzen den m<sup>6</sup>A makineriaren aktibazioak eta ondorengo *XPO1*en hazkuntzak NF-κB eta ur-beherako hantura-bideak aktibatzeke gai diren ala ez zehaztu nahi izan dugu giza hesteetako zeluletan.

Hain zuzen ere, PTGrekin tratatutako zelulek, m<sup>6</sup>A makineria aktibatua eta *XPO1* maila areagotuak aurkezten zituztenek (33. irudia), p50 kantitate handiagoak ere erakutsi zituzten (35. irudia).



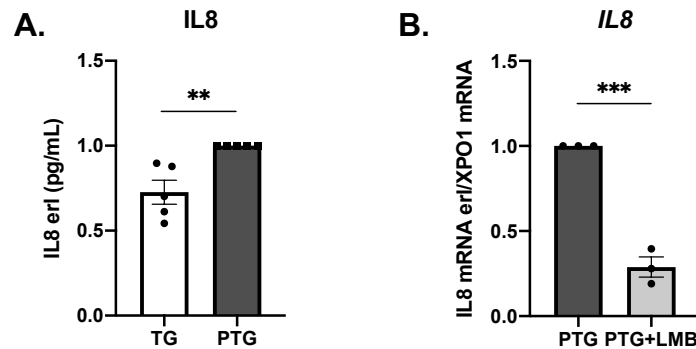
**35. Irudia.** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako zeluletan XPO1 eta p50 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboa (eskuinean), n=4. (\*p<0,05, \*\*p<0,01 Student t-testaren arabera).

p50ren PTG bidezko indukzioa m<sup>6</sup>Aren menpekoea dela baieztatu genuen, PTG-estimulazioak ez baitzuen NF-κB areagotu *YTHDF1* isilarazitako zeluletan (F36.A). Gainera, PTGrekin estimulatutako zelulak leptomizina B (LMB) *XPO1* inhibitzailearekin tratatu zirenean, p50en indukzioaren beherakada ikusi genuen, PTGk eragindako hantura-ingurunea, neurri batean behintzat, *XPO1*en menpe dagoela baieztatuz (F36. B).



**36. Irudia A)** Tratatu gabeko (TG), PTGrekin tratatu (PTG) eta PTGrekin tratatu eta *YTHDF1* isilarazitako (PTG+siYTH) zeluletan YTHDF1, XPO1 eta p50 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboa (eskuinean),  $n=3$ . (+ $p<0,1$ , ns: ez-esanguratsua Student t-testaren arabera). Isilarazpenaren eraginkortasuna TG zelulekin alderatuta (# $p<0,05$ , Student t-testaren arabera). **B)** Tratatu gabeko (TG), PTGrekin tratatu (PTG) eta PTGrekin eta leptomizina B XPO1 inhibitzailearekin (PTG+LMB) tratatutako zeluletan XPO1 eta p50 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboa (eskuinean),  $n=3$ . (+ $p<0,1$ , \* $p<0,05$ , ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera).

Gainera, berretsi dugu PTGk eragindako *IL8*ren gainadierazpena (37. A) *XPO1*en menpekoa dela (37. B irudia), *XPO1*en inhibizioak *IL8* mailak nabarmen murriztu baitzituen.



**37. Irudia A)** Jariatutako IL8 mailak eta **B)** *IL8* adierazpena ELISA eta RT-qPCR bidez kuantifikatuta tratatu gabeko (TG), PTGrekin eta PTG+LMB-rekin tratatutako zeluletan, n=3-5 (\* $p < 0,01$ ; \*\*  $p < 0,01$  Student t-testaren arabera).

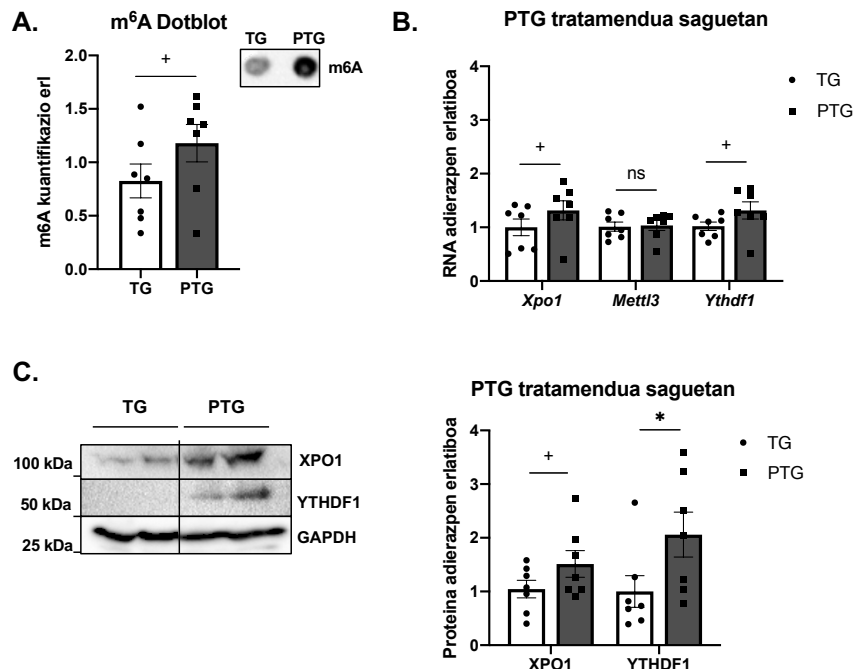
Guztira, emaitza hauek iradokitzen dute gliadinak eragindako  $m^6A$  eta *XPO1*en igoerak NF- $\kappa$ B bidezidorra aktibatzen duela eta hesteetako epitelio-zeluletan hantura eragiten duela *in vitro*.

#### 4.4.3. Gluten estimulazioa: *in vivo* eredia

##### 4.4.3.1. *Glutena eta $m^6A$ metilazioa*

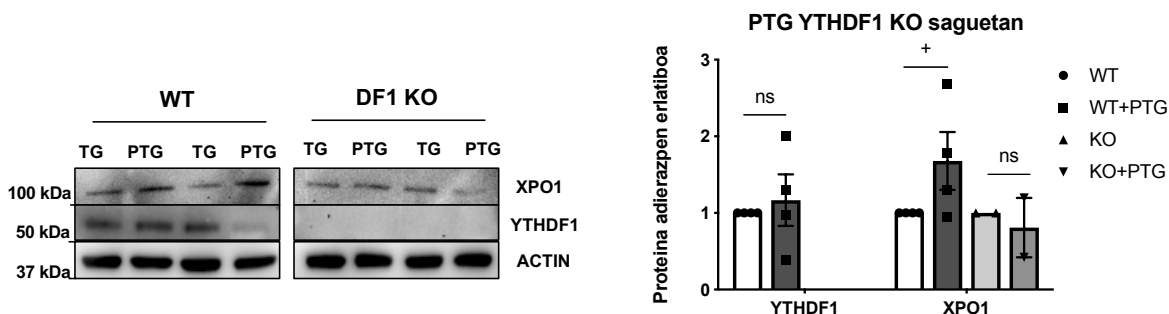
Gliadina  $m^6A$  makineria aktibatzeke eta *XPO1*en itzulpena *in vivo* areagotzeko gai den aztertzeko, C57BL/6 saguak, glutenik gabe mantendu zirenak, PTG eta kolera toxinarekin (CT), adubante gisa, tratatu ditugu (14. irudia).

*In vitro* eredian bezala, PTGrekin tratatutako saguen ehunek  $m^6A$  metilazioa areagotua zutela ikusi genuen (38. A. irudia), *Ythdf1* eta *Xpo1* mRNA eta proteina mailen indukzioarekin batera (38. B, C irudia) CTrekin soilik tratatutakoekin alderatzean; *in vivo* baieztatuz aurretik ikusitako  $m^6A$  eta *XPO1*en gliadina bidezko indukzioa.



**38. Irudia A)** Dot blot bidez neurtutako m<sup>6</sup>A RNA maila orokorrak eta irudi adierazgarri bat (goian eskuinaldean) WT kontroletan (TG) edo PTGrekin tratatutako saguetan (PTG), n=7. (+p<0,1 Mann Whitney testaren arabera). **B)** *Xpo1*, *Ythdf1* eta *Mettl3*ren RT-qPCR bidez neurtutako adierazpen erlatiboa, n=7. (\*p<0,05, ns: ez-esanguratsua Mann Whitney testaren arabera). **C)** Tratu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako saguetan (PTG) XPO1 eta YTHDF1 immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboa (eskuinean). n=7 (+p<0,1, \*p<0,05, ns: ez-esanguratsua Mann Whitney testaren arabera).

Horrez gain, gliadinaren bidezko *XPO1*en indukzioan *YTHDF1*en parte hartzea gehiago baieztatu zen, *Ythdf1* KO saguen epitelio-zelulek ia ez zutelako PTG bidezko *XPO1* handitzea erakutsi WT saguekin alderatuta (39. irudia).

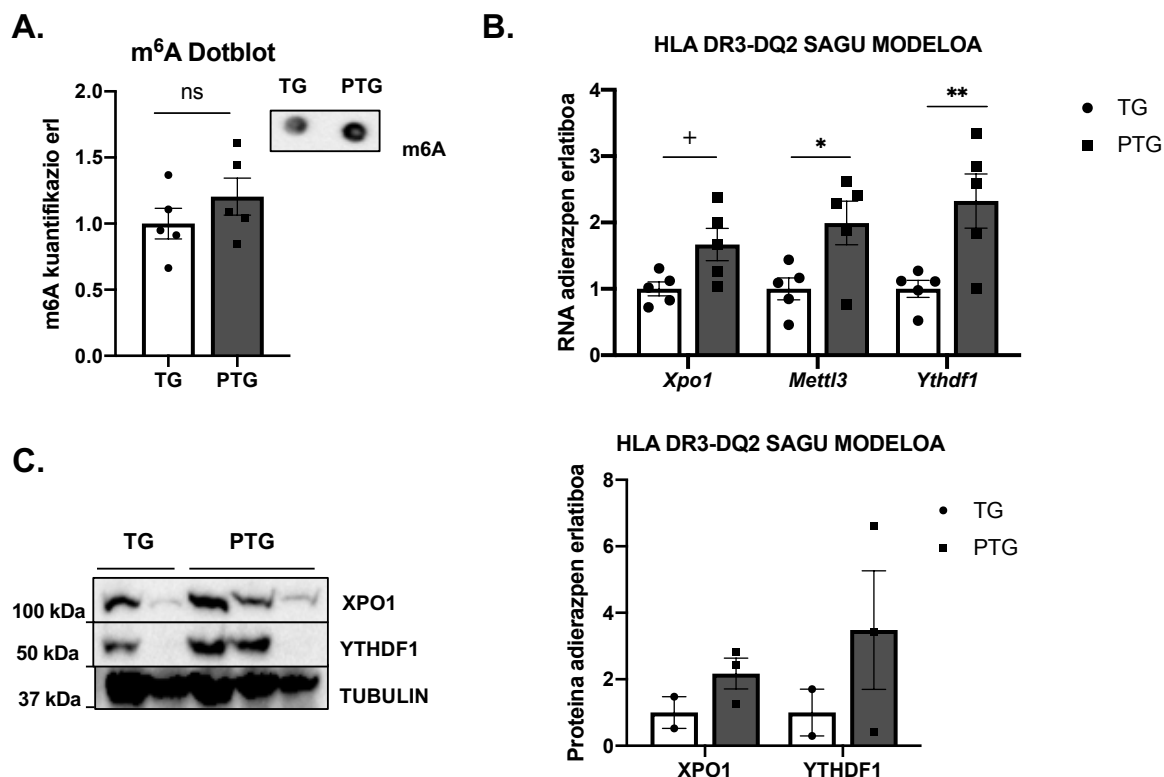


**39. Irudia.** Sagu kontrol (WT) edo *Ythdf1* KO (KO) saguetatik eratorritako tratatu gabeko (-) eta PTGrekin tratatutako (+PTG) zeluletan YTHDF1 eta XPO1 immunoblot adierazgarria



(ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboa (eskuinean),  $n = 2-4$  ( $+p < 0,1$ , ns: ez-esanguratsua ANOVA probaren arabera). Balio guztiak batez bestekoak dira  $\pm$  S.E.M.

Giza biopsia laginek eta *in vitro* emaitzek erakutsi zuten EZri lotutako genotipoak  $m^6A$  makineria eta *XPO1* mailatan eragiten duela. Hori dela eta, ikusi nahi genuen nola erantzuten dioten EZrako arrisku-faktore nagusia (HLA aleloak) duten saguek PTG estimulazio-ereduari. Interesgarria da, HLA-DQ2 saguen heste meharreko laginak ikertu zirenean, gliadinarekiko erantzun indartsuagoa ikusi ahal izan zela RNA mailan PTGrekin tratatutako saguak kontrolekin alderatzean (40.A-C).

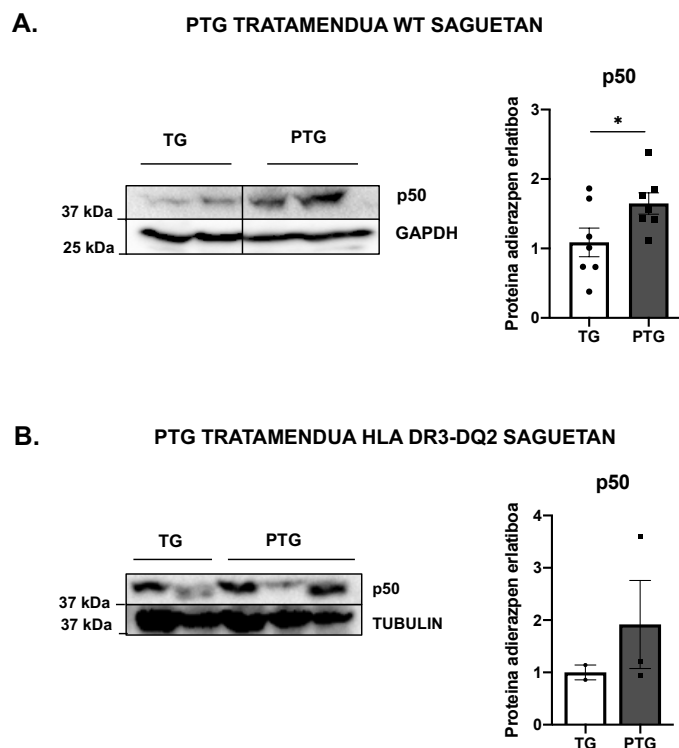


**40. Irudia A)** Dot blot bidez neurtutako  $m^6A$  RNA maila orokorren irudi adierazgarri bat (goian eskuinaldean) WT kontrolekin (TG) edo PTGrekin tratatutako saguetan (PTG),  $n=7$ . (ns: ez-esanguratsua Mann Whitney testaren arabera). **B)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako saguetan (PTG) *Xpo1*, *Ythdf1* eta *Mettl3*ren RT-qPCR bidez neurtutako adierazpen erlatiboa,  $n=5$ . ( $*p < 0,05$  Mann Whitney testaren arabera). **C)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako saguetan (PTG) XPO1 eta YTHDF1 proteina-mailen immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen datu kuantitatiboa (eskuinean),  $n = 2-5$  ( $+ p < 0,1$ , ns: ez-esanguratsua Mann Whitney probaren arabera).

Emaitza hauek baieztatzen dute glutenak m<sup>6</sup>A makineria aktibatzen duela eta *in vivo* XPO1 proteina kopuru handiagoak eragiten dituela. Horrez gain, HLA genotipoa duten saguek bide horretan erantzun handiagoa erakusten dutela ikusi dugu, EZrako predisposizio genotipo gehigarriek erantzun larriagoa eragin dezaketela adieraziz.

#### 4.4.3.2. Glutena eta m<sup>6</sup>A bidezko hantura

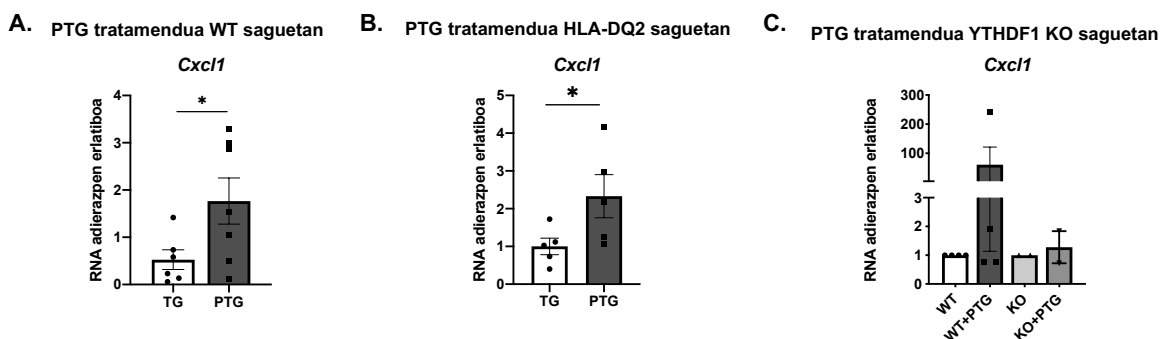
m<sup>6</sup>A bidezko XPO1 igoerak hesteetako hanturaren indukzioa dakarrela berresteko, p50 NF-kB azpiunitatea PTGrekin tratatutako saguetan kuantifikatu zen. Sagu eredu biek, WT (C57BL/6) eta HLA-DQ2 saguek, NF-kB-ren indukzioa erakutsi zuten gliadina estimulazioan (41. A, B irudia).



**41. Irudia A)** Tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako WT saguetan p50 proteinaren immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen kuantitatiboa (eskuinean). n=7 (\*p<0,05 Mann Whitney testaren arabera). **B)** HLA-DR3-DQ2 kontrol-sagu humanizatueta (TG) edo PTGrekin tratatutako saguetan (PTG) p50 proteinaren immunoblot adierazgarria (ezkerrean) eta laburpen kuantitatiboa (eskuinean). n=2-3 (\*p<0,05 Mann Whitney testaren arabera).

*In vitro* eredu bezala, hanturazko zitokinen hazkundera espero genuen NF-kB aktibazioan. *Cxcl1* *IL8*ren sagu-homologo funtzionala da (Hol et al., 2010) eta PTGrekin tratatutako saguetan adierazpen-maila handiagoak erakutsi zituen (42. A, B irudia), gliadina estimulazioaren efektu fisiologikoa *in vivo* baieztatuz. Gainera, HLA-DQ2 saguek, gliadinarekiko erantzun nabarmenagoa erakutsi zutenak, *Cxcl1* maila altuagoak ere aurkeztu zituzten.

Azkenik, *Ythdf1* KO saguetatik eratorritako zelula epitelialetan PTG tratamenduak ez zuen *Cxcl1* igoserarik erakutsi *ex vivo* (42. C irudia), gliadinak eragindako hantura m<sup>6</sup>A eta *YTHDF1*en menpekoea dela frogatuz.



**42. Irudia.** *Cxcl1* kimiokinaren, *IL8*ren sagu-homologo funtzionalaren, adierazpena RT-qPCR bidez kuantifikatuta **A)** tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako (PTG) WT saguetan, n=7. (\*p<0,05, Mann Whitney testaren arabera); **B)** tratatu gabeko (TG) eta PTGrekin tratatutako HLA-DQ2 sagu humanizatueta, n=5. (\*p<0,05 Mann Whitney testaren arabera) eta **C)** sagu kontrolatik (WT) edo *Ythdf1* KO (KO) saguetatik eratorritako tratatu gabeko (-) eta PTGrekin tratatutako heste-zeluletan (+PTG), n=2-4. Balio guztiak batez bestekoak dira  $\pm$  S.E.M.

Giza laginetatik baita *in vitro* eta *in vivo* ereduetatik ateratako emaitza guzti hauek m<sup>6</sup>Aren bidez glutenari erantzuten dion bide berri bat aurkezten digute, EZrekin lotutako SNPen inplikazio funtzional berriak eskaini eta gaixotasunaren terapia-helburu posible berriak irekiaz.

## **5.EZTABAIDA**



Azken bi hamarkadetan, GWAS edo ImmunoChip moduko eskala handiko genotipatze-azterketek gaixotasun autoimmuneen suszeptibilitatearekin zerikusia duten eskualde genomiko berriak identifikatzen eta asaldura horietan eragin dezaketen bidezidorrak zehazten lagundu dute. Hala ere, planteamendu horiek ez dira nahikoak izan eta EZren Genetika guztiz ulertzetik urrun gaude oraindik. Hain zuzen ere, EZren heredagarritasunaren erdia dago oraindik deskubritzeko, “heredagarritasun galdua” delakoa. Ikuspegi berriagoek, Epigenetikaren edota epitranskriptomikaren azterketak kasu, heredagarritasun galdu hori deszifratzen lagun dezakete. EZn, DNAREN metilazioa EZren patogeniarekin erlazionatzen duten (Fernandez-jimenez et al., 2014; Fernandez-Jimenez et al., 2019) edo lncRNA ezberdinek EZn duten inplikazioa deskribatzen zenbait lan (Ainara Castellanos-Rubio et al., 2016; Olazagoitia-Garmendia et al., 2021) argitaratu dira.

Ilido horretan, RNAREN aldaketek gene-erregulazio geruza berria osatzen dutela argi geratzen ari da eta RNA aldaketen inplikazioa gaixotasun ezberdinetan deskribatzen duten geroz eta ikerketa gehiago daude (Jonkhout et al., 2017). Hala ere, RNA aldaketei eta haien funtzio biologikoari buruzko ezaugarri ezezagun asko daude oraindik. RNAREN aldaketak identifikatzeko, detektatzeko edota kuantifikatzeko hainbat metodo berri argitaratu diren arren (X. Li et al., 2016), teknika horietako asko ez dira guztiz fidagarriak eta hainbat eragozpen dituzte (nukleotido eraldatuak, zelulak erretikulatzeko metodoak, errendimendu handiko teknikak garatzeko mugak, etab.). Gainera, metodo horietako batzuk ez dira nahiko sendoak eta sarritan desadostasunak egon ohi dira ikerketen artean aldaketa bera neurtzean, teknika desberdinak edo berberak erabilia (Y. S. Chen et al., 2021; X. Li et al., 2016; McIntyre et al., 2020). Beraz, RNA aldaketen ikerketen helburu nagusietako bat teknika zehatzagoak eta fidagarriagoak garatzea da, horrela RNA aldaketen mapa erreala marraztu eta marka hauek gaixotasunean duten inplikazioa aztertu ahal izateko.

N<sup>6</sup>-Methyladenosina (m<sup>6</sup>A) ugaztunen RNAREN barne aldaketarik ugariena da, prozesu biologiko ezberdinetan parte hartzen duen gene-erregulazio geruza berria

osatzen duena adibidez, T zelulen erantzunean edo tumorigenesian (Cui et al., 2017; H. B. Li et al., 2017). Gainera, frogatu da aldaketa horrek funtzio garrantzitsua betetzen duela hainbat asalduren garapenean, besteak beste, nahasmen neuronalak, gaixotasun immunitarioak, obesitatea eta minbizia (Maity & Das, 2016). Hala ere, orain arte ez dago RNAREN m<sup>6</sup>A aldaketa EZrekin erlazionatzen duen ikerketarik.

Hainbat teknika garatu dira m<sup>6</sup>A hondarrak mapatzeko eta kuantifikatzeko (K. Chen et al., 2015; Dominissini et al., 2012; Ke et al., 2015; Linder et al., 2015; N. Liu et al., 2013; Meyer et al., 2012; Molinie et al., 2016), baina orokorrean Epitranskriptomikaren kasuan bezala, gaur egun dauden metodoak neketsuak dira eta belaunaldi berriko sekuentziak beharrezkoa da. Horrez gain, goian esan bezala, talde ezberdinen ikerketen artean desadostasunak daude m<sup>6</sup>A guneen kuantifikazio espezifikoan (X. Li et al., 2016; McIntyre et al., 2020). Beraz, planteamendu berriak behar dira gaixotasunen garapenean parte hartu dezaketen transkripto hautagaietan m<sup>6</sup>A mailak neurtzeko.

Helburu horrekin, gure taldeak lehendik deskribatutako BstI entzimaren eraginkortasun murriztua aprobetxatzen duen teknika berria garatu du, oligonukleotido haslearen ondoan dauden m<sup>6</sup>A nukleotidoak eretrotranskribatzeko (Harcourt et al., 2013; Shaoru Wang et al., 2016). Metodo hau beste teknika batzuek deskribatutako metilazio-motiboak, *TUG1* lncRNAn kasu, era merke eta eraginkorrean baieztatzeke gai dela frogatu da. Gainera, gure metodoak lortutako hondar espezifikoak emaitzak eskualde osoa ebaluatzen duten m<sup>6</sup>A immunoprezipitazio esperimenduekin lortutakoekin alderatutakoan, metilazio-egoera bat datorrela ikusi dugu ebaluatutako hamar RNAetatik zortzitan, eta horrek metodoaren baliozkotasuna azpimarratzen du.

Metodoa transkriptoaren hondar zehatz batean metilatuta dauden molekulen proportzio aldaketak modu erlatiboan azkar kuantifikatzeko ere erabilgarria da. Izan ere, m<sup>6</sup>A-RT-qPCR teknikaren arabeko metilazio-mailak beheratu ziren RNA

laginari *in vitro* transkribatutako RNA ez-metilatua gehituta ( $m^6A$ ren kantitate erlatiboa gutxituz) edo zelula osoaren RNAREN metilazioa modu orokortuan murrizten duen zikloleuzina erabilia. Emaitza horiek teknikaren baliozkotasuna berresten dute, estimulu desberdinei erantzunez edo gaixotasun-egoerak eraginda hondar jakin batek bere metilazio-mailaren alterazioak aurkezten dituen ala ez ebaluatzeko.

Izan ere, frogatu dugu teknika hau giza-ehunetatik erauzitako RNA kantitate mugatuarekin ere erabil daitekeela, normalean RNA immunoprezipitazio esperimentuak egiteko nahikoak ez direnak, eta gainera, eskualde hautagaietan  $m^6A$  marken kantitate erlatiboa erraz kuantifikatu daitekeela. Dena den, teknikaren mugetako bat errendimendu handiko ikerketetan ezin erabiltzea da, gune interesgarri bakar baten informazioa besterik ez baita lortuko. Hala ere, teknika hau erabiliz hautagai interesgarrietan  $m^6A$  metilazioaren aldakortasuna identifikatzeak gaixotasunen patogenian duten ekarpena ulertzen lagun dezake.

Duela gutxi argitaratu den  $m^6A$ -QTL (*quantitative trait loci*) ikerketa batek (Zijie Zhang et al., 2020) gaixotasunei asoziatutako SNPek eragiten dituzten RNA aldaketak aztertzeke beharra erakutsi du. SNPek  $m^6A$  metilazio-aldaketetan duten inplikazioa aztertzeak EZren gisako nahaste autoimmunetako heredagarritasun galdua argitzen lagun baitezake. Ildo horretan, lehenik eta behin  $m^6A$  EZn duen inplikazio orokorra ebaluatu nahi izan dugu. Zeliako ez diren pertsonekin alderatuta, haur zein heldu zeliako aktiboen (dietan glutena hartzen dutenak) hesteko biopsietan  $m^6A$  metilazio-maila altua ikusi genuen, bai eta *METTL3*  $m^6A$  idazlearen eta *YTHDF1* irakurlearen gainadierazpenarekin batera. Horrek  $m^6A$  metilazioa EZn ere aldatua dagoela erakutsi zuen eta beraz, EZrekin asoziatutako SNPek  $m^6A$  metilazioan duten inplikazioa aztertzeak EZren patogenia hobeto ulertzen lagun lezake.

Bereziki  $m^6A$  metilazioak eta rs3087898 SNP ez-kodetzailleak *XPO1* transkriptoan duten inplikazioa aztertu dugu eta genotipoaren arabera RNAREN metilazio-maila



desberdinak NF- $\kappa$ B hantura-bidea aktibatzen duela frogatu dugu. Hala ere, EZren  $m^6$ Aren alterazioek kaltetutako bide gehiago egon litezkeela uste dugu, eta beraz, ikerketa gehiago behar dira RNAREN aldaketek EZren patogenian, eta beste nahaste autoimmuneetan ere, duten papera argitzeko.

Bereziki, ikerketa honek agerian utzi du EZri lotutako rs3087898 SNPak, *XPO1* proteina kodetzaileraren 5'UTRan kokatua dagoena, mRNA metilazioan eta horren osteko itzulpenean eragiteko modua. Gainera, SNParen genotipoak YTHDF1 RBParen RNARI lotzeko afinitateari ere eragiten diola aurkitu dugu, eta EZrekiko arrisku aleloarekin lehentasunez lotuta, *XPO1\**T** arrisku aleloa daramaten mRNAren itzulpen-jarduera areagotzen duela. Interesgarria da aipatzea *XPO1*en 5'UTRaren bigarren egitura ere badela genotipoaren menpekoa. Hori horrela, baliteke rs308789k proteinekiko lotura ez ezik, RNAREN egitura ere aldatzea eta  $m^6$ A mailetan eta YTHDF1en menpeko itzulpen-ezaugarrietan aldaketak eragitea,  $m^6$ A-QTL ikerketa berri baten emaitzak berretsita (Zijie Zhang et al., 2020). Ikerketa gehiago beharko lirateke genotipo espezifikoaren egitura horietan  $m^6$ A mailak nola aldatzen diren argitzeko.

Bai *in vitro* bai *in vivo* frogatu dugu hesteetako epitelio-zeluletako metilazio-maila altuagoak *XPO1\**T** arrisku-aleloa daramaten mRNA molekulen itzulpenaren eraginkortasuna eragiten duela, eta YTHDF1  $m^6$ A irakurleak bideratzen duela. Garrantzitsua da azpimarratzea enterozitoetan ikusten denaren aldean, metilazio-marka gutxiago daudela zelula immuneetako *XPO1*en 5'UTRan (edo bat ere ez) eta iradokitzen du  $m^6$ A bidezko mekanismoa hesteetako epitelio-zelulen espezifikoa dela. Gure lanak erakusten du gaixotasun immuneekiko zein hanturazkoekiko suszeptibilitatearekin lotutako SNP ez-kodetzailerak  $m^6$ A mailak alda ditzaketela eta gaixotasunaren patogenian lagundu dezaketela, hanturazko erantzunaren zelula-mota espezifikoaren aktibazioaren bidez, transkriptoma osoko  $m^6$ A-QTL arestiko azterketan erakutsitakoa baieztatuz (Zijie Zhang et al., 2020). Emaitza horiek eredu biologiko egokietan azterketa funtzionalak egitearen garrantzia ere azpimarratzen

dute, kodetzaile ez diren SNPen ondorio gehienak zelula-moten espezifikoak direla frogatu baita (Roadmap Epigenomics Consortium et al., 2015).

Arrisku-aleloa duten pertsonen XPO1 proteina kantitate handiagoak ekoizten dituztela ere ikusi dugu, eta horrek SNPak gaixotasunaren suszeptibilitatearekin duen lotura azalduko luke; izan ere, arrisku-aleloa homozigosian (TT) dutenek oinarritzko hantura-maila altuagoa dutela aurreikus baitaiteke XPO1 proteina kantitatearen emendioaren ondorioz. Gure emaitzek gaixotasunekin lotutako SNPen azterketa funtzionalak egitearen garrantzia azpimarratzen dute, kasu horretan bezala, SNPek gene hautagaia erregulatzen duten mekanismoak gene hautagaiaren transkripzioan besterik ez eragitea baino konplexuagoak izan daitezkeelako.

EZn m<sup>6</sup>A-menpekoa den XPO1en igoseraren eragin biologikoa ere deskribatu dugu. XPO1 seinaleztapen-bide kritikoetan eta funtzio zelularretan parte hartzen duen esportazio-hartzaile nuklearra da, hainbat gaixotasunekin lotu dena. XPO1 bidezko IκBα-ren esportazio nuklear egokia NF-κB bidearen aktibazioarekin eta ur-beherako zitokinen jariapenarekin erlazionatuta dago. Gainera, frogatu da XPO1en inhibitzaileekin tratatutako zelulek NF-κB aktibitate txikiagoa erakusten dutela, ondoriozko zitokinen jariapenaren murrizketarekin batera (Sendino et al., 2018). Erakutsi dugu XPO1 proteina-maila handitzeak, XPO1\**T* mRNAan dagoen m<sup>6</sup>A marka ugariagoren ondorioa denak, EZren ezaugarritzat har daitekeen NF-κB-ren indukzioa sustatzen duela, eta SNParen EZrekiko asoziazioaren azalpen funtzionala ematen du.

EZn hanturazko erantzuna areagotua dagoela ezaguna izan arren, NF-κB aktiboak erakusten duen moduan, EZren patogenia guztiz ulertzeko hutsune asko dago oraindik. Jakina da EZko heste meharreko epitelio-hesiaren suntsipena linfozito intraepitelialen (IEL) infiltrazioak eta makrofago eta beste zelula immuneen aktibazioak eragiten dutela. Sagu transgenikoak erabiliz egindako ikerketan EZren patogeniaren konplexutasuna agerian geratu da; sagu-eredu horretan EZ gaixoetan

ohikoak diren erantzun immunea eta hesteetako biloen atrofia garatzeko bai epiteli-zelulen (IEC) zein zelula immuneen aktibazioa eta erregulazioa beharrezkoak dira (Abadie et al., 2020). Zitokinen jariatzean hainbat zelula immunek duen eginkizuna sakon aztertu bada ere, gutxiago dakigu IECen ekarpenari buruz. Deskribatu da IECek jariatzen dituzten zitokina ezberdinek funtsezko eginkizunak betetzen dituztela EZren erantzun immunearen aktibazioan eta gaixotasunaren lehen urratsetan (Abadie et al., 2020). Ildo horretan, IL8k, neutrofiloak erakartzen dituen kimiokinak, bertan deskribatutako bidezidorrean duen eginkizuna aztertu dugu. IL8k ehunen kaltean eta berezko erantzun immunearen aktibazioan funtsezko eginkizuna duela jakina da, eta proposatu da EZ gaixoetan IL8 berariaz jariatzen dela glutena irentsi ondoren (Diosdado et al., 2007; Tye-Din et al., 2020). Orain arte, ikerketa gehienak EZdun pertsonetatik eratorritako zelula immunologikoetan eta odol periferikoko zelula mononuklearretan (PBMC) egin ohi dira (Goel et al., 2019; Lammers et al., 2011; Manavalan et al., 2010), eta hau da EZko hesteetako epiteli-zelulek ere IL8 jariatzen dutela frogatzen duen lehen ikerlana.

NF- $\kappa$ B-ren aktibazio alelo-espezifikoarekin batera, *IL8*ren transkripzio eta jariatzearen areagotzea ikusi genuen *XPO1*en arrisku aleloaren presentzian. Era berean, erakutsi dugu ekoizle nagusiak ez badira ere, EZ aktibodun pazienteek kontrolek baino *IL8*ren adierazpen altuagoa dutela zelula epitelialetan, eta berretsi dugu EZ gaixoen  $m^6A$ -*XPO1*-NF- $\kappa$ B aktibazioa hesteetako epiteli-zelulen deserregulaziotik datorrela batez ere.

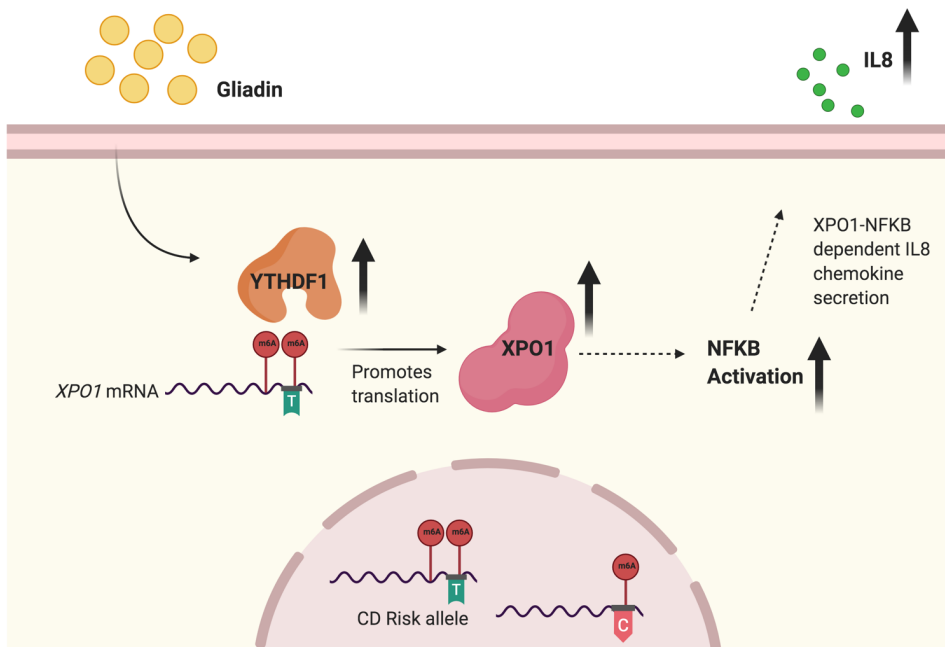
$m^6A$  EZren patogenian nola eragin dezakeen aztertuta, jakina da  $m^6A$  metilazioaren zinetika azkarrak zelulei kanpoko estimuluei bizkor erantzuteko gaitasuna ematen diela, zelula-mota desberdinetan bide desberdinak aktibatzen dituelarik (Engel et al., 2018; Winkler et al., 2019). Infekzio birikoak edo mikrobiomaren osaerak EZren garapenean laguntzen dutela uste da, eta mikrobioma hesteetan dagoen  $m^6A$  metilazio-mailekin erlazionatu da duela gutxi (Jabs et al., 2020). Hala ere, EZ abiarazten duten antigeno nagusiak glutenetik eratorritako gliadina peptidoak dira (Abadie et al., 2020; Capozzi et al., 2013; Garrote

et al., 2008). Nahiz eta gliadina berezko erantzun immunearen aktibatzaile gisa proposatu izan, glutenarekiko intolerantzia eragiten duten lehen urratsei buruz ezer gutxi ezagutzen da. Horregatik, glutenaren estimuluak m<sup>6</sup>A mekanismoan duen eragina aztertu nahi izan dugu.

Interesgarria da EZ pazienteetan GGD tratamenduak m<sup>6</sup>A, *METTL3*, *YTHDF1*, *XPO1* eta *IL8* adierazpen-mailak normaltasunera itzularazten dituela ikusi genuela, bidezidor horretan glutenarekiko esposizioak eragin zezakeela adierazten baitu. Gure *in vitro* eta *in vivo* esperimentuek, giza biopsiekin lortutako emaitzekin batera, gliadinarekiko estimulazioa m<sup>6</sup>A eta YTHDF1en igoera orokorrarekin lotzen dute lehen aldiz, eta horrek XPO1 proteina-maila areagotu egiten du. Era berean, frogatu dugu glutenak eragindako m<sup>6</sup>A bidezko XPO1en igoerak EZren ezaugarria den NF-kB bidea aktibatzen duela. Gainera, NF-kB-ren XPO1en bidezko indukzioa YTHDF1en menpekota dela ere erakutsi dugu, eta horrela, EZn ikus daitekeen hesteetako epitelio-zeluletan glutenak eragindako hantura-erantzunean m<sup>6</sup>A metilazioak duen eragina baieztatzen dugu. Horrez gain, *Cxcl1*, saguetan *IL8*ren homologo funtzionaltzat hartzen dena (Hol et al., 2010), gliadinarekin estimulatutako saguen hesteetan ere gainadierazita dagoela ikusi zen, eta horrek estres-estimulari erantzunez hesteetako hanturaren XPO1 bidezko aktibazioa *in vivo* baieztatzen du. Hori dela eta, *IL15*entzat deskribatzen den moduan (Abadie et al., 2020), baliteke guk deskribatutako mekanismoak glutenaren aurkako erantzuna abiaraztean parte hartzea eta ondorioz zelula immuneen aktibazioa bultzatzea.

Deskribatu dugun m<sup>6</sup>A aldaketen eta gliadinarekiko esposizioaren arteko lotura horrek geruza guztiz berria eta esploratu gabekoa gehitzen dio EZko patogeniaren agertoki konplexuari, eta EZ duten pertsonentzat ikuspegi terapeutiko berriei ateari ireki. Horrez gain, infekzio birikoak eta mikrobioma EZrekin eta m<sup>6</sup>A metilazioan izandako aldaketekin lotu direla kontuan hartuta, EZ abiarazteko agente desberdinekin egindako ikerketa gehiago lagungarri izan litezke EZren berezko immunitatearen garapenean parte hartzen duten faktoreak ulertzeko.

Laburbilduz, gure emaitzek azpimarratzen dute m<sup>6</sup>A makineriaren garrantzia glutenaren bidezko *XPO1*en igoeran, NF-κB adierazpena areagotzen duena eta, ondorioz, *IL8*ren indukzioa dakarrena EZ gaixoen enterozitoetan (44. irudia). Orain arte EZren tratamendu eraginkor bakarra glutena dietatik betiko kentzea izan da, gaixotasunaren sintoma gehienak ezabatzen baititu, baina gaixoen bizi-kalitatean eta ongizate psikologikoan modu negatiboan eragiten du. Horrek GGDren epe luzerako atxikimenduari eragiten dio eta konplikazioak izateko arriskua areagotzen du, minbizi gastrointestinalak barne (Y. Han et al., 2015). Izan ere, *XPO1* eta *IL8* mailak areagotu egiten dira koloneko minbizi eta adenokartzinometan (TGCA datuetan ikusi moduan), eta *YTHDF1* giza kolon-ondesteko adenokartzinometan tumorigenesia erregulatzen duela deskribatu da (Bai et al., 2019). Ikerketek erakutsi dutenez, EZ gaixoen artean, koloneko minbizia garatzeko arriskua txikiagoa da GGD jarraitzen duten pazienteetan (Holmes et al., 1989).



**44. Irudia.** Glutenari erantzuten dion m<sup>6</sup>A-XPO1-NF-κB bidezidorra epitelio-zeluletan. Glutenak m<sup>6</sup>A makineria aktibatzen du eta m<sup>6</sup>A metilazio-mailak handitzen ditu XPO1 mRNAren. YTHDF1 irakurlearen eta metilatutako XPO1 mRNAren arteko elkarrekintzak itzulpena sustatzen du. XPO1 maila altuagoek NF-κB hantura-bidea aktibatzen dute, *IL8* kimiokina proinflamatorioa jariatzeraino.

m<sup>6</sup>A irakurleei eta ezabatzaileei zuzendutako molekula txikiak dagoeneko proposatu dira minbizi mota ezberdinetarako terapia potentzial gisa (Huang et al., 2020) eta EZ gaixoen hanturaren aurka babesteko aukera gisa azaltzen zaizkigu. Gainera, *XPO1*en inhibitzaileak dagoeneko erabiltzen ari dira edo entsegu kliniko aurreratuetan daude minbiziaren aurkako agente terapeutiko gisa, eta NF-κB jarduera murrizteko gaitasuna dutela frogatu da, IkBaren atxikipen nuklearraren bidez (Sendino et al., 2018; Syed, 2019).

Horrela, ikerketa honek glutenari erantzuten dion m<sup>6</sup>A-*XPO1*-NF-κB bidezidorrak EZren patogenian duen inplikazioaren lehen froga esperimentalak eskaintzen du, eta gaixotasunaren iturri terapeutiko potentzial berriak aurkeztu. m<sup>6</sup>A, *XPO1* eta NF-κB-k hesteetako hainbat gaixotasunetan parte hartzeak adierazten du m<sup>6</sup>A-*XPO1*-NF-κB ardatzak beste agente batzuen heste meharreko epitelio-lesioei erantzunez ere funtziona dezakeela, eta horrek eragin zuzena izan dezake beste hainbat gaixotasun gastrointestinalen tratamenduan.

## **6.ONDORIOAK**





1. m<sup>6</sup>A-RT-qPCR teknika garatu dugu, m<sup>6</sup>A metilazioa kuantifikatzeko erabilgarria dena. BstI entzimaren erretrotranskriptasa gaitasun murriztuaz baliatzen da eta PCR kuantitatibo bat erabiltzen du.
  - a. Teknika hau m<sup>6</sup>A metilazio-gune zehatzak identifikatzeko gai da zelula-lerro ezberdinetan zein giza laginetan.
  - b. Zelulen estimulazio aurrean edo gaixotasunaren fase desberdinetan m<sup>6</sup>A metilazio-aldaketak kuantifikatu daitezke gure metodoaren bidez.
  
2. Erakutsi dugu m<sup>6</sup>A metilazio-maila orokorrak eta *METTL3* m<sup>6</sup>A idazlea eta *YTHDF1* irakurlea EZ gaixoetan gainadierazita daudela. Horrela, lehen aldiz deskribatu dugu m<sup>6</sup>A aldaketa EZn asaldatua dagoela.
  - a. EZ pazienteek m<sup>6</sup>A mailak, *METTL3* eta *YTHDF1* m<sup>6</sup>A makineria-geneak areagotuak dituzte.
  - b. EZ gaixoen dietatik glutena kentzeak m<sup>6</sup>A, *METTL3* eta *YTHDF1* mailak murrizten ditu.
  
3. *XPO1* genearen 5'UTRko rs3087898 SNP ez-kodetzailearen arrisku aleloak m<sup>6</sup>A metilazio mailetan eragiten du, *XPO1* proteina kopuru handiagoa eraginez.
  - a. Arrisku aleloa (*XPO1*\*T) metilatuagoa dago eta *XPO1*en itzulpen handiagoa eragiten du *YTHDF1* irakurlea arrisku aleloari lehentasunez lotuz.
  - b. Arrisku alelo forman m<sup>6</sup>Aren menpeko *XPO1* maila areagotuak NF-κB eta ur-beherako *IL8* kimokinaren jariatzea aktibatzen du, hanturazko

erantzun larriagoa eraginez, eta beraz, EZ garatzeko predisposizioa areagotuz.

4. Glutenak, EZren eragile nagusiak, m<sup>6</sup>A makineria aktibatzen du *XPO1*en 5'UTRko metilazio-mailak areagotuz eta NF-kB bidezko hantura induzituz.
  - a. Gure gliadina estimulazioek m<sup>6</sup>A makinariaren indukzioa erakusten dute, eta horrek, *XPO1*en 5'UTRan m<sup>6</sup>A metilazioa areagotzea dakar, baita *XPO1* maila handiagoak ere.
  - b. EZn NF-kB eta ur-beherako *IL8* mailak handitzea, neurri batean behintzat, m<sup>6</sup>A eta *XPO1*en menpekoak direla erakutsi dugu.
5. m<sup>6</sup>A-*XPO1*-NF-kB bidezidor berri bat aurkezten dugu, glutena irenstean hanturazko erantzun goiztiarrean gakoa dirudiena, EZrentzat itu terapeutiko berriak eskainiz.

## **7.BIBLIOGRAFIA**



- Abadie, V., Kim, S. M., Lejeune, T., Palanski, B. A., Ernest, J. D., Tastet, O., Voisine, J., Discepolo, V., Marietta, E. V., Hawash, M. B. F., Ciszewski, C., Bouziat, R., Panigrahi, K., Horwath, I., Zurenski, M. A., Lawrence, I., Dumaine, A., Yotova, V., Grenier, J. C., ... Jabri, B. (2020). IL-15, gluten and HLA-DQ8 drive tissue destruction in coeliac disease. *Nature*, 578(7796), 600–604. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2003-8>
- Abadie, V., Sollid, L. M., Barreiro, L. B., & Jabri, B. (2011). Integration of Genetic and Immunological Insights into a Model of Celiac Disease Pathogenesis. *Annual Review of Immunology*, 29(1), 493–525. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-040210-092915>
- Akichika, S., Hirano, S., Shichino, Y., Suzuki, T., Nishimasu, H., Ishitani, R., Sugita, A., Hirose, Y., Iwasaki, S., Nureki, O., & Suzuki, T. (2019). Cap-specific terminal N6-methylation of RNA by an RNA polymerase II-associated methyltransferase. *Science*, 363(6423). <https://doi.org/10.1126/science.aav0080>
- Alarcón, C. R., Goodarzi, H., Lee, H., Liu, X., Tavazoie, S., & Tavazoie, S. F. (2015). HNRNPA2B1 Is a Mediator of m6A-Dependent Nuclear RNA Processing Events. *Cell*, 162(6). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.08.011>
- Arguello, A. E., Deliberto, A. N., & Kleiner, R. E. (2017). RNA Chemical Proteomics Reveals the N6-Methyladenosine (m6A)-Regulated Protein-RNA Interactome. *Journal of the American Chemical Society*, 139(48). <https://doi.org/10.1021/jacs.7b09213>
- Bai, Y., Yang, C., Wu, R., Huang, L., Song, S., Li, W., Yan, P., Lin, C., Li, D., & Zhang, Y. (2019). YTHDF1 regulates tumorigenicity and cancer stem cell-like activity in human colorectal carcinoma. *Frontiers in Oncology*, 9(MAY), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fonc.2019.00332>
- Bailey, A. S., Batista, P. J., Gold, R. S., Grace Chen, Y., de Rooij, D. G., Chang, H. Y., & Fuller, M. T. (2017). The conserved RNA helicase YTHDC2 regulates the transition from proliferation to differentiation in the germline. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.26116>
- Baldwin, A. S. (1996). The NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: New discoveries and insights.

- Annual Review of Immunology*, 14.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.14.1.649>
- Barone, M. V., Troncone, R., & Auricchio, S. (2014). Gliadin peptides as triggers of the proliferative and stress/innate immune response of the celiac small intestinal mucosa. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 15, Issue 11). <https://doi.org/10.3390/ijms151120518>
- Bokar, J. A., Shambaugh, M. E., Polayes, D., Matera, A. G., & Rottman, F. M. (1997). Purification and cDNA cloning of the AdoMet-binding subunit of the human mRNA (N6-adenosine)-methyltransferase. *RNA*, 3(11).
- Boulias, K., Toczyłowska-Socha, D., Hawley, B. R., Liberman, N., Takashima, K., Zaccara, S., Guez, T., Vasseur, J. J., Debart, F., Aravind, L., Jaffrey, S. R., & Greer, E. L. (2019). Identification of the m6Am Methyltransferase PCIF1 Reveals the Location and Functions of m6Am in the Transcriptome. *Molecular Cell*, 75(3). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.06.006>
- Caio, G., Volta, U., Sapone, A., Leffler, D. A., De Giorgio, R., Catassi, C., & Fasano, A. (2019). Celiac disease: A comprehensive current review. *BMC Medicine*, 17(1), 1–20. <https://doi.org/10.1186/s12916-019-1380-z>
- Capozzi, A., Vincentini, O., Gizzi, P., Porzia, A., Longo, A., Felli, C., Mattei, V., Mainiero, F., Silano, M., Sorice, M., & Misasi, R. (2013). Modulatory Effect of Gliadin Peptide 10-mer on Epithelial Intestinal CACO-2 Cell Inflammatory Response. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066561>
- Carlile, T. M., Rojas-Duran, M. F., Zinshteyn, B., Shin, H., Bartoli, K. M., & Gilbert, W. V. (2014). Pseudouridine profiling reveals regulated mRNA pseudouridylation in yeast and human cells. *Nature*, 515(7525). <https://doi.org/10.1038/nature13802>
- Castellanos-Rubio, A., Santin, I., Olazagoitia-Garmendia, A., Romero-Garmendia, I., Jauregi-Miguel, A., Legarda, M., & Bilbao, J. R. (2019). A novel RT-QPCR-based assay for the relative quantification of residue specific m6A RNA methylation. *Scientific Reports*, 9(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40018-6>
- Castellanos-Rubio, Ainara, & Bilbao, J. R. (2018). Profiling Celiac Disease-Related

- Transcriptional Changes. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 336, pp. 149–174). Elsevier Inc.  
<https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2017.07.003>
- Castellanos-Rubio, Ainara, Fernandez-Jimenez, N., Kratchmarov, R., Luo, X., Bhagat, G., Green, P. H. R., Schneider, R., Kiledjian, M., Bilbao, J. R., & Ghosh, S. (2016). A long noncoding RNA associated with susceptibility to celiac disease. *Science*, 352(6281), 91–95.  
<https://doi.org/10.1126/science.aad0467>
- Castellanos-Rubio, Ainara, Santin, I., Irastorza, I., Castaño, L., Carlos Vitoria, J., & Bilbao, J. R. (2009). TH17 (and TH1) signatures of intestinal biopsies of CD patients in response to gliadin. *Autoimmunity*, 42(1).  
<https://doi.org/10.1080/08916930802350789>
- Chander, A. M., Yadav, H., Jain, S., Bhadada, S. K., & Dhawan, D. K. (2018). Cross-talk between gluten, intestinal microbiota and intestinal mucosa in celiac disease: Recent advances and basis of autoimmunity. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 9, Issue NOV). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.02597>
- Chen, K., Lu, Z., Wang, X., Fu, Y., Luo, G. Z., Liu, N., Han, D., Dominissini, D., Dai, Q., Pan, T., & He, C. (2015). High-resolution N6-methyladenosine (m6A) map using photo-crosslinking-assisted m6A sequencing. *Angewandte Chemie - International Edition*, 54(5). <https://doi.org/10.1002/anie.201410647>
- Chen, Y. S., Yang, W. L., Zhao, Y. L., & Yang, Y. G. (2021). Dynamic transcriptomic m5C and its regulatory role in RNA processing. In *Wiley Interdisciplinary Reviews: RNA* (Vol. 12, Issue 4).  
<https://doi.org/10.1002/wrna.1639>
- Coots, R. A., Liu, X. M., Mao, Y., Dong, L., Zhou, J., Wan, J., Zhang, X., & Qian, S. B. (2017). m6A Facilitates eIF4F-Independent mRNA Translation. *Molecular Cell*, 68(3), 504-514.e7. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.10.002>
- Cotsapas, C., Voight, B. F., Rossin, E., Lage, K., Neale, B. M., Wallace, C., AbecasisGonç, G. R., Barrett, J. C., Behrens, T., Cho, J., De Jager, P. L., Elder, J. T., Graham, R. R., Gregersen, P., Klareskog, L., Siminovitch, K. A., van Heel, D. A., Wijmenga, C., Worthington, J., ... Daly, M. J. (2011).

- Pervasive sharing of genetic effects in autoimmune disease. *PLoS Genetics*, 7(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002254>
- Cui, Q., Shi, H., Ye, P., Li, L., Qu, Q., Sun, G., Sun, G., Lu, Z., Huang, Y., Yang, C. G., Riggs, A. D., He, C., & Shi, Y. (2017). m6A RNA Methylation Regulates the Self-Renewal and Tumorigenesis of Glioblastoma Stem Cells. *Cell Reports*, 18(11). <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.02.059>
- de Haas, E. C., Kumar, V., & Wijmenga, C. (2014). *Immunogenetics of Celiac Disease* (pp. 53–66). [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8560-5\\_5](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8560-5_5)
- de Kauwe, A. L., Chen, Z., Anderson, R. P., Keech, C. L., Price, J. D., Wijburg, O., Jackson, D. C., Ladhams, J., Allison, J., & McCluskey, J. (2009). Resistance to Celiac Disease in Humanized HLA-DR3-DQ2-Transgenic Mice Expressing Specific Anti-Gliadin CD4 + T Cells. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7440–7450. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900233>
- Desrosiers, R., Friderici, K., & Rottman, F. (1974). Identification of methylated nucleosides in messenger RNA from Novikoff hepatoma cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 71(10). <https://doi.org/10.1073/pnas.71.10.3971>
- Dieli-Crimi, R., Cénit, M. C., & Núñez, C. (2015). The genetics of celiac disease: A comprehensive review of clinical implications. *Journal of Autoimmunity*, 64, 26–41. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2015.07.003>
- Diosdado, B., van Bakel, H., Strengman, E., Franke, L., van Oort, E., Mulder, C. J., Wijmenga, C., & Wapenaar, M. C. (2007). Neutrophil Recruitment and Barrier Impairment in Celiac Disease: A Genomic Study. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 5(5), 574–581. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2006.11.014>
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Schwartz, S., Salmon-Divon, M., Ungar, L., Osenberg, S., Cesarkas, K., Jacob-Hirsch, J., Amariglio, N., Kupiec, M., Sorek, R., & Rechavi, G. (2012). Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. *Nature*, 485(7397). <https://doi.org/10.1038/nature11112>
- Dominissini, D., Nachtergaele, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Peer, E., Kol, N., Ben-Haim, M. S., Dai, Q., Di Segni, A., Salmon-Divon, M., Clark, W. C., Zheng, G.,



- Pan, T., Solomon, O., Eyal, E., Hershkovitz, V., Han, D., Doré, L. C., Amariglio, N., Rechavi, G., & He, C. (2016). The dynamic N1 - methyladenosine methylome in eukaryotic messenger RNA. *Nature*, *530*(7591). <https://doi.org/10.1038/nature16998>
- Dubois, P. C. A., Trynka, G., Franke, L., Hunt, K. A., Romanos, J., Curtotti, A., Zhernakova, A., Heap, G. A. R., Ádány, R., Aromaa, A., Bardella, M. T., Van Den Berg, L. H., Bockett, N. A., De La Concha, E. G., Dema, B., Fehrmann, R. S. N., Fernández-Arquero, M., Fialta, S., Grandone, E., ... Van Heel, D. A. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature Genetics*, *42*(4), 295–302. <https://doi.org/10.1038/ng.543>
- Durbin, A. F., Wang, C., Marcotrigiano, J., & Gehrke, L. (2016). RNAs containing modified nucleotides fail to trigger RIG-I conformational changes for innate immune signaling. *MBio*, *7*(5). <https://doi.org/10.1128/mBio.00833-16>
- Edupuganti, R. R., Geiger, S., Lindeboom, R. G. H., Shi, H., Hsu, P. J., Lu, Z., Wang, S. Y., Baltissen, M. P. A., Jansen, P. W. T. C., Rossa, M., Müller, M., Stunnenberg, H. G., He, C., Carell, T., & Vermeulen, M. (2017). N6-methyladenosine (m6A) recruits and repels proteins to regulate mRNA homeostasis. *Nature Structural and Molecular Biology*, *24*(10). <https://doi.org/10.1038/nsmb.3462>
- Engel, M., Eggert, C., Kaplick, P. M., Eder, M., Röh, S., Tietze, L., Namendorf, C., Arloth, J., Weber, P., Rex-Haffner, M., Geula, S., Jakovcevski, M., Hanna, J. H., Leshkowitz, D., Uhr, M., Wotjak, C. T., Schmidt, M. V., Deussing, J. M., Binder, E. B., & Chen, A. (2018). The Role of m6A/m-RNA Methylation in Stress Response Regulation. *Neuron*, *99*(2), 389-403.e9. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.07.009>
- Farh, K. K. H., Marson, A., Zhu, J., Kleinewietfeld, M., Housley, W. J., Beik, S., Shores, N., Whitton, H., Ryan, R. J. H., Shishkin, A. A., Hatan, M., Carrasco-Alfonso, M. J., Mayer, D., Luckey, C. J., Patsopoulos, N. A., De Jager, P. L., Kuchroo, V. K., Epstein, C. B., Daly, M. J., ... Bernstein, B. E. (2015). Genetic and epigenetic fine mapping of causal autoimmune disease variants. *Nature*, *518*(7539). <https://doi.org/10.1038/nature13835>

- Feighery, C. (1999). Fortnightly review: Coeliac disease. *BMJ*, 319(7204).  
<https://doi.org/10.1136/bmj.319.7204.236>
- Feng, Z., Li, Q., Meng, R., Yi, B., & Xu, Q. (2018). METTL3 regulates alternative splicing of MyD88 upon the lipopolysaccharide-induced inflammatory response in human dental pulp cells. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(5).  
<https://doi.org/10.1111/jcmm.13491>
- Fernandez-jimenez, N., Castellanos-rubio, A., Plaza-izurieta, L., Irastorza, I., Elcoroaristizabal, X., Jauregi-miguel, A., Lopez-euba, T., Tutau, C., De pancorbo, M. M., Vitoria, J. C., & Bilbao, J. R. (2014). Coregulation and modulation of NFκB-related genes in celiac disease: Uncovered aspects of gut mucosal inflammation. *Human Molecular Genetics*.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddt520>
- Fernandez-Jimenez, N., Garcia-Etxebarria, K., Plaza-Izurieta, L., Romero-Garmendia, I., Jauregi-Miguel, A., Legarda, M., Ecsedi, S., Castellanos-Rubio, A., Cahais, V., Cuenin, C., Degli Esposti, D., Irastorza, I., Hernandez-Vargas, H., Herceg, Z., & Bilbao, J. R. (2019). The methylome of the celiac intestinal epithelium harbours genotype-independent alterations in the HLA region. *Scientific Reports*, 9(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37746-6>
- Festen, E. A. M., Goyette, P., Green, T., Boucher, G., Beauchamp, C., Trynka, G., Dubois, P. C., Lagacé, C., Stokkers, P. C. F., Hommes, D. W., Barisani, D., Palmieri, O., Annese, V., van Heel, D. A., Weersma, R. K., Daly, M. J., Wijmenga, C., & Rioux, J. D. (2011). A meta-analysis of genome-wide association scans identifies IL18RAP, PTPN2, TAGAP, and PUS10 as shared risk loci for crohn's disease and celiac disease. *PLoS Genetics*, 7(1).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001283>
- Fusunyan, R. D., Quinn, J. J., Ohno, Y., MacDermott, R. P., & Sanderson, I. R. (1998). Butyrate enhances interleukin (IL)-8 secretion by intestinal epithelial cells in response to IL-1β and lipopolysaccharide. *Pediatric Research*, 43(1).  
<https://doi.org/10.1203/00006450-199801000-00013>
- Garcia-Campos, M. A., Edelheit, S., Toth, U., Safra, M., Shachar, R., Viukov, S., Winkler, R., Nir, R., Lasman, L., Brandis, A., Hanna, J. H., Rossmanith, W., &

- Schwartz, S. (2019). Deciphering the “m6A Code” via Antibody-Independent Quantitative Profiling. *Cell*, 178(3). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.06.013>
- Garcia-Etxebarria, K., Jauregi-Miguel, A., Romero-Garmendia, I., Plaza-Izurieteta, L., Legarda, M., Irastorza, I., & Bilbao, J. R. (2016). Ancestry-based stratified analysis of ImmunoChip data identifies novel associations with celiac disease. *European Journal of Human Genetics*, 24(12). <https://doi.org/10.1038/ejhg.2016.120>
- Garrote, J. A., Gómez-González, E., Bernardo, D., Arranz, E., & Chirido, F. (2008). Celiac Disease Pathogenesis: The Proinflammatory Cytokine Network. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, 47(Suppl 1), S27–S32. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e3181818fb9>
- Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A. F., Kol, N., Salmon-Divon, M., Hershkovitz, V., Peer, E., Mor, N., Manor, Y. S., Ben-Haim, M. S., Eyal, E., Yunger, S., Pinto, Y., Jaitin, D. A., Viukov, S., Rais, Y., Krupalnik, V., Chomsky, E., ... Hanna, J. H. (2015). m6A mRNA methylation facilitates resolution of naïve pluripotency toward differentiation. *Science*, 347(6225), 1002–1006. <https://doi.org/10.1126/science.1261417>
- Goel, G., Tye-Din, J. A., Qiao, S. W., Russell, A. K., Mayassi, T., Ciszewski, C., Sarna, V. K., Wang, S., Goldstein, K. E., Dzuris, J. L., Williams, L. J., Xavier, R. J., Lundin, K. E. A., Jabri, B., Sollid, L. M., & Anderson, R. P. (2019). Cytokine release and gastrointestinal symptoms after gluten challenge in celiac disease. *Science Advances*, 5(8), eaaw7756. <https://doi.org/10.1126/sciadv.aaw7756>
- Gonzalez-Moro, I., Olazagoitia-Garmendia, A., Colli, M. L., Cobo-Vuilleumier, N., Postler, T. S., Marselli, L., Marchetti, P., Ghosh, S., Gauthier, B. R., Eizirik, D. L., Castellanos-Rubio, A., & Santin, I. (2020). The T1D-associated lncRNA Lnc13 modulates human pancreatic  $\beta$  cell inflammation by allele-specific stabilization of STAT1 mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(16), 9022–9031. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914353117>
- Gravina, G. L., Senapedis, W., McCauley, D., Baloglu, E., Shacham, S., &

- Festuccia, C. (2014). Nucleo-cytoplasmic transport as a therapeutic target of cancer. In *Journal of Hematology and Oncology* (Vol. 7, Issue 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13045-014-0085-1>
- Greco, L., Romino, R., Coto, I., Di Cosmo, N., Percopo, S., Maglio, M., Paparo, F., Gasperi, V., Limongelli, M. G., Cotichini, R., D'Agate, C., Tinto, N., Sacchetti, L., Tosi, R., & Stazi, M. A. (2002). The first large population based twin study of coeliac disease. *Gut*, *50*(5). <https://doi.org/10.1136/gut.50.5.624>
- Grilli, M., Chiu, J. J. S., & Lenardo, M. J. (1993). IMF-κB and Rel: Participants in a Multiform Transcriptional Regulatory System. *International Review of Cytology*, *143*(C). [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61873-2](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61873-2)
- Gujral, N., Freeman, H. J., & Thomson, A. B. R. (2012). Celiac disease: Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment. In *World Journal of Gastroenterology* (Vol. 18, Issue 42). <https://doi.org/10.3748/wjg.v18.i42.6036>
- Gutierrez-Achury, J., Zhernakova, A., Pulit, S. L., Trynka, G., Hunt, K. A., Romanos, J., Raychaudhuri, S., Van Heel, D. A., Wijmenga, C., & De Bakker, P. I. W. (2015). Fine mapping in the MHC region accounts for 18% additional genetic risk for celiac disease. *Nature Genetics*, *47*(6), 577–578. <https://doi.org/10.1038/ng.3268>
- Han, D., Liu, J., Chen, C., Dong, L., Liu, Y., Chang, R., Huang, X., Liu, Y., Wang, J., Dougherty, U., Bissonnette, M. B., Shen, B., Weichselbaum, R. R., Xu, M. M., & He, C. (2019). Anti-tumour immunity controlled through mRNA m6A methylation and YTHDF1 in dendritic cells. *Nature*, *566*(7743), 270–274. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-0916-x>
- Han, Y., Chen, W., Li, P., & Ye, J. (2015). Association between coeliac disease and risk of any malignancy and gastrointestinal malignancy: A meta-analysis. *Medicine (United States)*, *94*(38), 1–7. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000001612>
- Harcourt, E. M., Ehrenschwender, T., Batista, P. J., Chang, H. Y., & Kool, E. T. (2013). Identification of a selective polymerase enables detection of N 6-methyladenosine in RNA. *Journal of the American Chemical Society*, *135*(51). <https://doi.org/10.1021/ja4105792>

- Hofacker, I. L. (2003). Vienna RNA secondary structure server. *Nucleic Acids Research*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkg599>
- Hol, J., Wilhelmsen, L., & Haraldsen, G. (2010). The murine IL-8 homologues KC, MIP-2, and LIX are found in endothelial cytoplasmic granules but not in Weibel-Palade bodies. *Journal of Leukocyte Biology*, *87*(3), 501–508. <https://doi.org/10.1189/jlb.0809532>
- Holmes, G. K. T., Prior, P., Lane, M. R., Pope, D., & Allan, R. N. (1989). Malignancy in coeliac disease - Effect of a gluten free diet. *Gut*, *30*(3), 333–338. <https://doi.org/10.1136/gut.30.3.333>
- Hsu, P. J., Zhu, Y., Ma, H., Guo, Y., Shi, X., Liu, Y., Qi, M., Lu, Z., Shi, H., Wang, J., Cheng, Y., Luo, G., Dai, Q., Liu, M., Guo, X., Sha, J., Shen, B., & He, C. (2017). Ythdc2 is an N6 -methyladenosine binding protein that regulates mammalian spermatogenesis. *Cell Research*, *27*(9). <https://doi.org/10.1038/cr.2017.99>
- Huang, H., Weng, H., & Chen, J. (2020). m6A Modification in Coding and Non-coding RNAs: Roles and Therapeutic Implications in Cancer. *Cancer Cell*, *37*(3), 270–288. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2020.02.004>
- Huang, H., Weng, H., Sun, W., Qin, X., Shi, H., Wu, H., Zhao, B. S., Mesquita, A., Liu, C., Yuan, C. L., Hu, Y. C., Hüttelmaier, S., Skibbe, J. R., Su, R., Deng, X., Dong, L., Sun, M., Li, C., Nachtergaele, S., ... Chen, J. (2018). Recognition of RNA N6 -methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature Cell Biology*, *20*(3). <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0045-z>
- Imaeda, A., Tomoike, F., Hayakawa, M., Nakamoto, K., Kimura, Y., Abe, N., & Abe, H. (2019). N6-methyl adenosine in siRNA evades immune response without reducing RNAi activity. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids*, *38*(12). <https://doi.org/10.1080/15257770.2019.1641205>
- Jabri, B., & Sollid, L. M. (2006). Mechanisms of disease: Immunopathogenesis of celiac disease. In *Nature Clinical Practice Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 3, Issue 9, pp. 516–525). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/ncpgasthep0582>

- Jabri, B., & Sollid, L. M. (2009). Tissue-mediated control of immunopathology in coeliac disease. In *Nature Reviews Immunology* (Vol. 9, Issue 12).  
<https://doi.org/10.1038/nri2670>
- Jabs, S., Biton, A., Bécavin, C., Nahori, M. A., Ghozlane, A., Pagliuso, A., Spanò, G., Guérineau, V., Touboul, D., Gai Gianetto, Q., Chaze, T., Matondo, M., Dillies, M. A., & Cossart, P. (2020). Impact of the gut microbiota on the m6A epitranscriptome of mouse cecum and liver. *Nature Communications*, *11*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15126-x>
- Jain, D., Puno, M. R., Meydan, C., Lailier, N., Mason, C. E., Lima, C. D., Anderson, K. V., & Keeney, S. (2018). Ketu mutant mice uncover an essential meiotic function for the ancient RNA helicase YTHDC2. *ELife*, *7*.  
<https://doi.org/10.7554/eLife.30919>
- Jauregi-Miguel, A., Santin, I., Garcia-Etxebarria, K., Olazagoitia-Garmendia, A., Romero-Garmendia, I., Sebastian-delaCruz, M., Irastorza, I., Castellanos-Rubio, A., & Bilbao, J. R. (2019). MAGI2 Gene Region and Celiac Disease. *Frontiers in Nutrition*, *6*. <https://doi.org/10.3389/fnut.2019.00187>
- Jelínková, L., Tučková, L., Cinová, J., Flegelová, Z., & Tlaskalová-Hogenová, H. (2004). Gliadin stimulates human monocytes to production of IL-8 and TNF- $\alpha$  through a mechanism involving NF- $\kappa$ B. *FEBS Letters*, *571*(1–3), 81–85.  
<https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.06.057>
- Jia, G., Fu, Y., Zhao, X., Dai, Q., Zheng, G., Yang, Y., Yi, C., Lindahl, T., Pan, T., Yang, Y. G., & He, C. (2011). N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. *Nature Chemical Biology*, *7*(12), 885–887. <https://doi.org/10.1038/nchembio.687>
- Jiang, X., Liu, B., Nie, Z., Duan, L., Xiong, Q., Jin, Z., Yang, C., & Chen, Y. (2021). The role of m6A modification in the biological functions and diseases. In *Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Issue 1).  
<https://doi.org/10.1038/s41392-020-00450-x>
- Johnson, C. (1999). An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of I $\kappa$ B. *The EMBO Journal*, *18*(23).  
<https://doi.org/10.1093/emboj/18.23.6682>

- Jonkhout, N., Tran, J., Smith, M. A., Schonrock, N., Mattick, J. S., & Novoa, E. M. (2017). The RNA modification landscape in human disease. In *RNA* (Vol. 23, Issue 12). <https://doi.org/10.1261/rna.063503.117>
- Karikó, K., Buckstein, M., Ni, H., & Weissman, D. (2005). Suppression of RNA recognition by Toll-like receptors: The impact of nucleoside modification and the evolutionary origin of RNA. *Immunity*, 23(2). <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Kashyap, T., Argueta, C., Aboukameel, A., Unger, T. J., Klebanov, B., Mohammad, R. M., Muqbil, I., Azmi, A. S., Drolen, C., Senapedis, W., Lee, M., Kauffman, M., Shacham, S., & Landesman, Y. (2016). Selinexor, a Selective Inhibitor of Nuclear Export (SINE) compound, acts through NF- $\kappa$ B deactivation and combines with proteasome inhibitors to synergistically induce tumor cell death. *Oncotarget*, 7(48). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.12428>
- Kasowitz, S. D., Ma, J., Anderson, S. J., Leu, N. A., Xu, Y., Gregory, B. D., Schultz, R. M., & Wang, P. J. (2018). Nuclear m6A reader YTHDC1 regulates alternative polyadenylation and splicing during mouse oocyte development. *PLoS Genetics*, 14(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007412>
- Ke, S., Alemu, E. A., Mertens, C., Gantman, E. C., Fak, J. J., Mele, A., Haripal, B., Zucker-Scharff, I., Moore, M. J., Park, C. Y., Vågbø, C. B., Kuśnierczyk, A., Klungland, A., Darnell, J. E., & Darnell, R. B. (2015). A majority of m6A residues are in the last exons, allowing the potential for 3' UTR regulation. *Genes and Development*, 29(19). <https://doi.org/10.1101/gad.269415.115>
- Kim, H., Lim, J. W., & Kim, K. H. (2001). Helicobacter pylori-induced expression of interleukin-8 and cyclooxygenase-2 in AGS gastric epithelial cells: Mediation by nuclear factor- $\kappa$ B. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 36(7). <https://doi.org/10.1080/003655201300191969>
- Kim, S. M., Mayassi, T., & Jabri, B. (2015). Innate immunity: Actuating the gears of celiac disease pathogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, 29(3), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.05.001>
- König, J., Zarnack, K., Rot, G., Curk, T., Kayikci, M., Zupan, B., Turner, D. J., Luscombe, N. M., & Ule, J. (2010). ICLIP reveals the function of hnRNP

- particles in splicing at individual nucleotide resolution. *Nature Structural and Molecular Biology*, 17(7). <https://doi.org/10.1038/nsmb.1838>
- Koranda, J. L., Dore, L., Shi, H., Patel, M. J., Vaasjo, L. O., Rao, M. N., Chen, K., Lu, Z., Yi, Y., Chi, W., He, C., & Zhuang, X. (2018). Mettl14 Is Essential for Epitranscriptomic Regulation of Striatal Function and Learning. *Neuron*, 99(2), 283-292.e5. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2018.06.007>
- Krappmann, D., & Scheidereit, C. (1997). Regulation of NF- $\kappa$ B activity by I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  stability. *Immunobiology*, 198(1–3). [https://doi.org/10.1016/S0171-2985\(97\)80022-8](https://doi.org/10.1016/S0171-2985(97)80022-8)
- Kumar, V., Wijmenga, C., & Xavier, R. J. (2014). Genetics of immune-mediated disorders: From genome-wide association to molecular mechanism. In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 31). <https://doi.org/10.1016/j.coi.2014.09.007>
- Lammers, K. M., Khandelwal, S., Chaudhry, F., Kryszak, D., Puppa, E. L., Casolaro, V., & Fasano, A. (2011). Identification of a novel immunomodulatory gliadin peptide that causes interleukin-8 release in a chemokine receptor CXCR3-dependent manner only in patients with coeliac disease. *Immunology*, 132(3), 432–440. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2567.2010.03378.x>
- Lee, C., & Huang, C. H. (2013). LASAGNA-search: An integrated web tool for transcription factor binding site search and visualization. *BioTechniques*. <https://doi.org/10.2144/000113999>
- Lerner, A. (2010). New therapeutic strategies for celiac disease. In *Autoimmunity Reviews* (Vol. 9, Issue 3). <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2009.05.002>
- Li, F., Zhao, D., Wu, J., & Shi, Y. (2014). Structure of the YTH domain of human YTHDF2 in complex with an m6A mononucleotide reveals an aromatic cage for m6A recognition. In *Cell Research* (Vol. 24, Issue 12, pp. 1490–1492). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.153>
- Li, H. B., Tong, J., Zhu, S., Batista, P. J., Duffy, E. E., Zhao, J., Bailis, W., Cao, G., Kroehling, L., Chen, Y., Wang, G., Broughton, J. P., Chen, Y. G., Kluger, Y., Simon, M. D., Chang, H. Y., Yin, Z., & Flavell, R. A. (2017). M 6 A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature*, 548(7667). <https://doi.org/10.1038/nature23450>



- Li, X., Xiong, X., & Yi, C. (2016). Epitranscriptome sequencing technologies: Decoding RNA modifications. In *Nature Methods* (Vol. 14, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/nmeth.4110>
- Lichinchi, G., Gao, S., Saletore, Y., Gonzalez, G. M., Bansal, V., Wang, Y., Mason, C. E., & Rana, T. M. (2016). Dynamics of the human and viral m(6)A RNA methylomes during HIV-1 infection of T cells. *Nature Microbiology*, 1. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.11>
- Linder, B., Grozhik, A. V., Olarerin-George, A. O., Meydan, C., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2015). Single-nucleotide-resolution mapping of m6A and m6Am throughout the transcriptome. *Nature Methods*, 12(8). <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>
- Lionetti, E., Castellaneta, S., Francavilla, R., Pulvirenti, A., Tonutti, E., Amarri, S., Barbato, M., Barbera, C., Barera, G., Bellantoni, A., Castellano, E., Guariso, G., Limongelli, M. G., Pellegrino, S., Polloni, C., Ughi, C., Zuin, G., Fasano, A., & Catassi, C. (2014). Introduction of Gluten, HLA Status, and the Risk of Celiac Disease in Children. *New England Journal of Medicine*, 371(14). <https://doi.org/10.1056/nejmoa1400697>
- Liu, H., Wang, H., Wei, Z., Zhang, S., Hua, G., Zhang, S. W., Zhang, L., Gao, S. J., Meng, J., Chen, X., & Huang, Y. (2018). MeT-DB V2.0: Elucidating context-specific functions of N6-methyl-adenosine methyltranscriptome. *Nucleic Acids Research*, 46(D1), D281–D287. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx1080>
- Liu, J., Yue, Y., Han, D., Wang, X., Fu, Y., Zhang, L., Jia, G., Yu, M., Lu, Z., Deng, X., Dai, Q., Chen, W., & He, C. (2014). A METTL3-METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. *Nature Chemical Biology*, 10(2), 93–95. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1432>
- Liu, N., Dai, Q., Zheng, G., He, C., Parisien, M., & Pan, T. (2015). N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA-protein interactions. *Nature*, 518(7540). <https://doi.org/10.1038/nature14234>
- Liu, N., Parisien, M., Dai, Q., Zheng, G., He, C., & Pan, T. (2013). Probing N6-methyladenosine RNA modification status at single nucleotide resolution in mRNA and long noncoding RNA. *RNA*, 19(12), 1848–1856.

- <https://doi.org/10.1261/rna.041178.113>
- Liu, N., Zhou, K. I., Parisien, M., Dai, Q., Diatchenko, L., & Pan, T. (2017). N6-methyladenosine alters RNA structure to regulate binding of a low-complexity protein. *Nucleic Acids Research*, 45(10). <https://doi.org/10.1093/nar/gkx141>
- Louka, A. S., & Sollid, L. M. (2003). HLA in coeliac disease: Unravelling the complex genetics of a complex disorder. In *Tissue Antigens* (Vol. 61, Issue 2). <https://doi.org/10.1034/j.1399-0039.2003.00017.x>
- Lu, T. X., Zheng, Z., Zhang, L., Sun, H.-L., Bissonnette, M., Huang, H., & He, C. (2020). A new model of spontaneous colitis in mice induced by deletion of an RNA m6A methyltransferase component METTL14 in T cells. *Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/J.JCMGH.2020.07.001>
- M, C. (2016). The Selective Inhibitor of Nuclear Export Compound, Selinexor, Inhibits NF- $\kappa$ B and Induces Anti-Non-Small Cell Lung Cancer Activity Regardless of p53 Status. *International Journal of Cancer Research and Molecular Mechanisms*, 2(2), 1–11. <https://doi.org/10.16966/2381-3318.126>
- Ma, H., Wang, X., Cai, J., Dai, Q., Natchiar, S. K., Lv, R., Chen, K., Lu, Z., Chen, H., Shi, Y. G., Lan, F., Fan, J., Klaholz, B. P., Pan, T., Shi, Y., & He, C. (2019). Publisher Correction: N 6-Methyladenosine methyltransferase ZCCHC4 mediates ribosomal RNA methylation (Nature Chemical Biology, (2019), 15, 1, (88-94), 10.1038/s41589-018-0184-3). In *Nature Chemical Biology* (Vol. 15, Issue 5). <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0233-6>
- Machnicka, M. A., Milanowska, K., Oglou, O. O., Purta, E., Kurkowska, M., Olchowik, A., Januszewski, W., Kalinowski, S., Dunin-Horkawicz, S., Rother, K. M., Helm, M., Bujnicki, J. M., & Grosjean, H. (2013). MODOMICS: A database of RNA modification pathways - 2013 update. *Nucleic Acids Research*, 41(D1). <https://doi.org/10.1093/nar/gks1007>
- Maity, A., & Das, B. (2016). N6-methyladenosine modification in mRNA: Machinery, function and implications for health and diseases. In *FEBS Journal* (Vol. 283, Issue 9). <https://doi.org/10.1111/febs.13614>
- Maiuri, M. C., De Stefano, D., Mele, G., Fecarotta, S., Greco, L., Troncone, R., &

- Carnuccio, R. (2003). Nuclear factor  $\kappa$ B is activated in small intestinal mucosa of celiac patients. *Journal of Molecular Medicine*, 81(6), 373–379.  
<https://doi.org/10.1007/s00109-003-0440-0>
- Mäki, M., & Collin, P. (1997). Coeliac disease. In *Lancet* (Vol. 349, Issue 9067, pp. 1755–1759). Elsevier B.V. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(96\)70237-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(96)70237-4)
- Manavalan, J. S., Hernandez, L., Shah, J. G., Konikkara, J., Naiyer, A. J., Lee, A. R., Ciaccio, E., Minaya, M. T., Green, P. H. R., & Bhagat, G. (2010). Serum cytokine elevations in celiac disease: Association with disease presentation. *Human Immunology*, 71(1), 50–57.  
<https://doi.org/10.1016/j.humimm.2009.09.351>
- Mauer, J., Luo, X., Blanjoie, A., Jiao, X., Grozhik, A. V., Patil, D. P., Linder, B., Pickering, B. F., Vasseur, J. J., Chen, Q., Gross, S. S., Elemento, O., Debart, F., Kiledjian, M., & Jaffrey, S. R. (2017). Reversible methylation of m6A in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 541(7637).  
<https://doi.org/10.1038/nature21022>
- Maynard, C. L., Elson, C. O., Hatton, R. D., & Weaver, C. T. (2012). Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. In *Nature* (Vol. 489, Issue 7415). <https://doi.org/10.1038/nature11551>
- McIntyre, A. B. R., Gokhale, N. S., Cerchietti, L., Jaffrey, S. R., Horner, S. M., & Mason, C. E. (2020). Limits in the detection of m6A changes using MeRIP/m6A-seq. *Scientific Reports*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63355-3>
- Meresse, B., Curran, S. A., Ciszewski, C., Orbelyan, G., Setty, M., Bhagat, G., Lee, L., Tretiakova, M., Semrad, C., Kistner, E., Winchester, R. J., Braud, V., Lanier, L. L., Geraghty, D. E., Green, P. H., Guandalini, S., & Jabri, B. (2006). Reprogramming of CTLs into natural killer-like cells in celiac disease. *Journal of Experimental Medicine*, 203(5). <https://doi.org/10.1084/jem.20060028>
- Meyer, K. D., Patil, D. P., Zhou, J., Zinoviev, A., Skabkin, M. A., Elemento, O., Pestova, T. V., Qian, S. B., & Jaffrey, S. R. (2015). 5' UTR m6A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell*, 163(4), 999–1010.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.012>

- Meyer, K. D., Saletore, Y., Zumbo, P., Elemento, O., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2012). Comprehensive analysis of mRNA methylation reveals enrichment in 3' UTRs and near stop codons. *Cell*, *149*(7).  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>
- Molinie, B., Wang, J., Lim, K. S., Hillebrand, R., Lu, Z. X., Van Wittenberghe, N., Howard, B. D., Daneshvar, K., Mullen, A. C., Dedon, P., Xing, Y., & Giallourakis, C. C. (2016). M6 A-LAIC-seq reveals the census and complexity of the m6 A epitranscriptome. *Nature Methods*, *13*(8).  
<https://doi.org/10.1038/nmeth.3898>
- Mowel, W. K., Kotzin, J. J., McCright, S. J., Neal, V. D., & Henao-Mejia, J. (2018). Control of Immune Cell Homeostasis and Function by lncRNAs. In *Trends in Immunology* (Vol. 39, Issue 1, pp. 55–69). Elsevier Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.it.2017.08.009>
- Murray, J. A., Watson, T., Clearman, B., & Mitros, F. (2004). Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease. *American Journal of Clinical Nutrition*, *79*(4). <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.669>
- Nayler, O., Hartmann, A. M., & Stamm, S. (2000). The ER repeat protein YT521-B localizes to a novel subnuclear compartment. *Journal of Cell Biology*, *150*(5).  
<https://doi.org/10.1083/jcb.150.5.949>
- Nisticò, L., Fagnani, C., Coto, I., Percopo, S., Cotichini, R., Limongelli, M. G., Paparo, F., D'Alfonso, S., Giordano, M., Sferlazzas, C., Magazzù, G., Momigliano-Richiardi, P., Greco, L., & Stazi, M. A. (2006). Concordance, disease progression, and heritability of coeliac disease in Italian twins. *Gut*, *55*(6). <https://doi.org/10.1136/gut.2005.083964>
- Olazagoitia-Garmendia, A., & Castellanos-Rubio, A. (2021). Relative Quantification of Residue-Specific m6A RNA Methylation Using m6A-RT-QPCR. In *Methods in Molecular Biology* (Vol. 2298). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1374-0\\_12](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1374-0_12)
- Olazagoitia-Garmendia, A., Sebastian-delaCruz, M., & Castellanos-Rubio, A. (2021). Involvement of lncRNAs in celiac disease pathogenesis. In *International Review of Cell and Molecular Biology* (Vol. 358).

- <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2020.10.004>
- Olivares, M., Benítez-Páez, A., de Palma, G., Capilla, A., Nova, E., Castillejo, G., Varea, V., Marcos, A., Garrote, J. A., Polanco, I., Donat, E., Ribes-Koninckx, C., Calvo, C., Ortigosa, L., Palau, F., & Sanz, Y. (2018). Increased prevalence of pathogenic bacteria in the gut microbiota of infants at risk of developing celiac disease: The PROFICEL study. *Gut Microbes*, 9(6).  
<https://doi.org/10.1080/19490976.2018.1451276>
- Palmer, D. C., & Restifo, N. P. (2009). Suppressors of cytokine signaling (SOCS) in T cell differentiation, maturation, and function. In *Trends in Immunology* (Vol. 30, Issue 12). <https://doi.org/10.1016/j.it.2009.09.009>
- Parkes, M., Cortes, A., Van Heel, D. A., & Brown, M. A. (2013). Genetic insights into common pathways and complex relationships among immune-mediated diseases. In *Nature Reviews Genetics* (Vol. 14, Issue 9).  
<https://doi.org/10.1038/nrg3502>
- Parmar, A., Greco, D., Venäläinen, J., Gentile, M., Dukes, E., & Saavalainen, P. (2013). Gene Expression Profiling of Gliadin Effects on Intestinal Epithelial Cells Suggests Novel Non-Enzymatic Functions of Pepsin and Trypsin. *PLoS ONE*, 8(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066307>
- Patil, D. P., Chen, C. K., Pickering, B. F., Chow, A., Jackson, C., Guttman, M., & Jaffrey, S. R. (2016). m6A RNA methylation promotes XIST-mediated transcriptional repression. *Nature*, 537(7620).  
<https://doi.org/10.1038/nature19342>
- Patil, D. P., Pickering, B. F., & Jaffrey, S. R. (2018). Reading m6A in the Transcriptome: m6A-Binding Proteins. In *Trends in Cell Biology* (Vol. 28, Issue 2, pp. 113–127). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.10.001>
- Pendleton, K. E., Chen, B., Liu, K., Hunter, O. V., Xie, Y., Tu, B. P., & Conrad, N. K. (2017). The U6 snRNA m6A Methyltransferase METTL16 Regulates SAM Synthetase Intron Retention. *Cell*, 169(5).  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.003>
- Picarelli, A., Di Tola, M., Sabbatella, L., Anania, M. C., Di Cello, T., Greco, R., Silano, M., & De Vincenzi, M. (1999). 31-43 Amino acid sequence of the  $\alpha$ -

- gliadin induces anti-endomysial antibody production during in vitro challenge. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 34(11).  
<https://doi.org/10.1080/003655299750024896>
- Ping, X. L., Sun, B. F., Wang, L., Xiao, W., Yang, X., Wang, W. J., Adhikari, S., Shi, Y., Lv, Y., Chen, Y. S., Zhao, X., Li, A., Yang, Y., Dahal, U., Lou, X. M., Liu, X., Huang, J., Yuan, W. P., Zhu, X. F., ... Yang, Y. G. (2014). Mammalian WTAP is a regulatory subunit of the RNA N6-methyladenosine methyltransferase. *Cell Research*, 24(2). <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>
- Plaza-Izurrieta, L., Fernandez-Jimenez, N., Irastorza, I., Jauregi-Miguel, A., Romero-Garmendia, I., Vitoria, J. C., & Bilbao, J. R. (2015). Expression analysis in intestinal mucosa reveals complex relations among genes under the association peaks in celiac disease. *European Journal of Human Genetics*, 23(8), 1100–1105. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2014.244>
- Ricaño-Ponce, I., Zhernakova, D. V., Deelen, P., Luo, O., Li, X., Isaacs, A., Karjalainen, J., Di Tommaso, J., Borek, Z. A., Zorro, M. M., Gutierrez-Achury, J., Uitterlinden, A. G., Hofman, A., van Meurs, J., Netea, M. G., Jonkers, I. H., Withoff, S., van Duijn, C. M., Li, Y., ... BIOS consortium. (2016). Refined mapping of autoimmune disease associated genetic variants with gene expression suggests an important role for non-coding RNAs. *Journal of Autoimmunity*, 68, 62–74. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2016.01.002>
- Roadmap Epigenomics Consortium, Kundaje, A., Meuleman, W., Ernst, J., Bilenky, M., Yen, A., Heravi-Moussavi, A., Kheradpour, P., Zhang, Z., Wang, J., Ziller, M. J., Amin, V., Whitaker, J. W., Schultz, M. D., Ward, L. D., Sarkar, A., Quon, G., Sandstrom, R. S., Eaton, M. L., ... Kellis, M. (2015). Integrative analysis of 111 reference human epigenomes. *Nature*, 518(7539).  
<https://doi.org/10.1038/nature14248>
- Robinson, E. K., Covarrubias, S., & Carpenter, S. (2020). The how and why of lncRNA function: An innate immune perspective. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1863, Issue 4, p. 194419). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2019.194419>
- Rodríguez, J. A., & Henderson, B. R. (2000). Identification of a functional nuclear

- export sequence in BRCA1. *Journal of Biological Chemistry*, 275(49), 38589–38596. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003851200>
- Roebuck, K. A. (1999). Regulation of interleukin-8 gene expression. In *Journal of Interferon and Cytokine Research* (Vol. 19, Issue 5). <https://doi.org/10.1089/107999099313866>
- Roignant, J. Y., & Soller, M. (2017). m6A in mRNA: An Ancient Mechanism for Fine-Tuning Gene Expression. In *Trends in Genetics* (Vol. 33, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.04.003>
- Romero-Garmendia, I., Jauregi-Miguel, A., Santin, I., Bilbao, J. R., & Castellanos-Rubio, A. (2018). Subcellular Fractionation from Fresh and Frozen Gastrointestinal Specimens. *J. Vis. Exp*, 137, 57740. <https://doi.org/10.3791/57740>
- Roundtree, I. A., Luo, G. Z., Zhang, Z., Wang, X., Zhou, T., Cui, Y., Sha, J., Huang, X., Guerrero, L., Xie, P., He, E., Shen, B., & He, C. (2017). YTHDC1 mediates nuclear export of N6-methyladenosine methylated mRNAs. *ELife*, 6. <https://doi.org/10.7554/eLife.31311>
- Rubio-Tapia, A., & Murray, J. A. (2010). Classification and management of refractory coeliac disease. In *Gut* (Vol. 59, Issue 4). <https://doi.org/10.1136/gut.2009.195131>
- Samasca, G., Sur, G., Lupan, I., & Deleanu, D. (2014). Gluten-free diet and quality of life in celiac disease. In *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench* (Vol. 7, Issue 3). <https://doi.org/10.22037/ghfbb.v7i3.617>
- Schuppan, D., Junker, Y., & Barisani, D. (2009). Celiac Disease: From Pathogenesis to Novel Therapies. In *Gastroenterology* (Vol. 137, Issue 6). <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2009.09.008>
- Schwartz, S., Bernstein, D. A., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Herbst, R. H., León-Ricardo, B. X., Engreitz, J. M., Guttman, M., Satija, R., Lander, E. S., Fink, G., & Regev, A. (2014). Transcriptome-wide mapping reveals widespread dynamic-regulated pseudouridylation of ncRNA and mRNA. *Cell*, 159(1). <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.08.028>
- Scott, M. L., Fujita, T., Liou, H. C., Nolan, C. P., & Baltimore, D. (1993). The p65

- subunit of NF- $\kappa$ B regulates I $\kappa$ B by two distinct mechanisms. *Genes and Development*, 7(7). <https://doi.org/10.1101/gad.7.7a.1266>
- Sendino, M., Omaetxebarria, M. J., & Rodríguez, J. A. (2018). Hitting a moving target: inhibition of the nuclear export receptor XPO1/CRM1 as a therapeutic approach in cancer. *Cancer Drug Resistance*, 1(3), 139–163. <https://doi.org/10.20517/cdr.2018.09>
- Shafik, A., Schumann, U., Evers, M., Sibbritt, T., & Preiss, T. (2016). The emerging epitranscriptomics of long noncoding RNAs. In *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* (Vol. 1859, Issue 1). <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2015.10.019>
- Shan, L., Molberg, Ø., Parrot, I., Hausch, F., Filiz, F., Gray, G. M., Sollid, L. M., & Khosla, C. (2002). Structural basis for gluten intolerance in Celiac Sprue. *Science*, 297(5590), 2275–2279. <https://doi.org/10.1126/science.1074129>
- Shi, H., Wang, X., Lu, Z., Zhao, B. S., Ma, H., Hsu, P. J., Liu, C., & He, C. (2017). YTHDF3 facilitates translation and decay of N 6-methyladenosine-modified RNA. *Cell Research*, 27(3). <https://doi.org/10.1038/cr.2017.15>
- Shulman, Z., & Stern-Ginossar, N. (2020). The RNA modification N 6-methyladenosine as a novel regulator of the immune system. *Nature Immunology*, 21(5), 501–512. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0650-4>
- Silano, M., Vincentini, O., & De Vincenzi, M. (2009). Toxic, Immunostimulatory and Antagonist Gluten Peptides in Celiac Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 16(12). <https://doi.org/10.2174/092986709787909613>
- Silvester, J. A., & Leffler, D. A. (2017). Is Autoimmunity Infectious? The Effect of Gastrointestinal Viral Infections and Vaccination on Risk of Celiac Disease Autoimmunity. In *Clinical Gastroenterology and Hepatology* (Vol. 15, Issue 5). <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.12.014>
- Slotkin, W., & Nishikura, K. (2013). Adenosine-to-inosine RNA editing and human disease. In *Genome Medicine* (Vol. 5, Issue 11). <https://doi.org/10.1186/gm508>
- Smyth, D. J., Plagnol, V., Walker, N. M., Cooper, J. D., Downes, K., Yang, J. H. M., Howson, J. M. M., Stevens, H., McManus, R., Wijmenga, C., Heap, G. A.,



- Dubois, P. C., Clayton, D. G., Hunt, K. A., van Heel, D. A., & Todd, J. A. (2008). Shared and Distinct Genetic Variants in Type 1 Diabetes and Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*, 359(26).  
<https://doi.org/10.1056/nejmoa0807917>
- Spitale, R. C., Flynn, R. A., Zhang, Q. C., Crisalli, P., Lee, B., Jung, J. W., Kuchelmeister, H. Y., Batista, P. J., Torre, E. A., Kool, E. T., & Chang, H. Y. (2015). Structural imprints in vivo decode RNA regulatory mechanisms. *Nature*, 519(7544). <https://doi.org/10.1038/nature14263>
- Squires, J. E., Patel, H. R., Nousch, M., Sibbritt, T., Humphreys, D. T., Parker, B. J., Suter, C. M., & Preiss, T. (2012). Widespread occurrence of 5-methylcytosine in human coding and non-coding RNA. *Nucleic Acids Research*, 40(11). <https://doi.org/10.1093/nar/gks144>
- Stene, L. C., Honeyman, M. C., Hoffenberg, E. J., Haas, J. E., Sokol, R. J., Emery, L., Taki, I., Norris, J. M., Erlich, H. A., Eisenbarth, G. S., & Rewers, M. (2006). Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: A longitudinal study. *American Journal of Gastroenterology*, 101(10). <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00741.x>
- Struyf, S., Gouwy, M., Dillen, C., Proost, P., Opdenakker, G., & Van Damme, J. (2005). Chemokines synergize in the recruitment of circulating neutrophils into inflamed tissue. *European Journal of Immunology*, 35(5).  
<https://doi.org/10.1002/eji.200425753>
- Sun, H., Zhang, M., Li, K., Bai, D., & Yi, C. (2019). Cap-specific, terminal N 6-methylation by a mammalian m6Am methyltransferase. In *Cell Research* (Vol. 29, Issue 1). <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0117-4>
- Sun, S. C., Chang, J. H., & Jin, J. (2013). Regulation of nuclear factor- $\kappa$ B in autoimmunity. In *Trends in Immunology* (Vol. 34, Issue 6, pp. 282–289). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.it.2013.01.004>
- Sunil, Y., Ramadori, G., & Raddatz, D. (2010). Influence of NF $\kappa$ B inhibitors on IL-1 $\beta$ -induced chemokine CXCL8 and -10 expression levels in intestinal epithelial cell lines: Glucocorticoid ineffectiveness and paradoxical effect of PDTC. *International Journal of Colorectal Disease*, 25(3).

<https://doi.org/10.1007/s00384-009-0847-3>

Syed, Y. Y. (2019). Selinexor: First Global Approval. In *Drugs* (Vol. 79, Issue 13, pp. 1485–1494). Springer International Publishing.

<https://doi.org/10.1007/s40265-019-01188-9>

Tan, D. S. P., Bedard, P. L., Kuruvilla, J., Siu, L. L., & Razak, A. R. A. (2014). Promising SINEs for embargoing nuclear-cytoplasmic export as an anticancer strategy. In *Cancer Discovery* (Vol. 4, Issue 5, pp. 527–537). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-13-1005>

Trynka, G., Zhernakova, A., Romanos, J., Franke, L., Hunt, K. A., Turner, G., Bruinenberg, M., Heap, G. A., Platteel, M., Ryan, A. W., De Kovel, C., Holmes, G. K. T., Howdle, P. D., Walters, J. R. F., Sanders, D. S., Mulder, C. J. J., Mearin, M. L., Verbeek, W. H. M., Trimble, V., ... Wijmenga, C. (2009). Coeliac disease-associated risk variants in TNFAIP3 and REL implicate altered NF- $\kappa$ B signalling. *Gut*, 58(8). <https://doi.org/10.1136/gut.2008.169052>

Trynka, Gosia, Hunt, K. A., Bockett, N. A., Romanos, J., Mistry, V., Szperl, A., Bakker, S. F., Bardella, M. T., Bhaw-Rosun, L., Castillejo, G., De La Concha, E. G., De Almeida, R. C., Dias, K. R. M., Van Diemen, C. C., Dubois, P. C. A., Duerr, R. H., Edkins, S., Franke, L., Fransen, K., ... Van Heel, D. A. (2011). Dense genotyping identifies and localizes multiple common and rare variant association signals in celiac disease. *Nature Genetics*, 43(12), 1193–1201. <https://doi.org/10.1038/ng.998>

Tye-Din, J. A., Dzuris, J. L., Russell, A. K., Wang, S., Goldstein, K., Williams, L. J., & Anderson, R. P. (2017). Serum IL-2 and IL-8 are Elevated within 4 h after Gluten Ingestion in Celiac Disease (CED) Patients on Gluten-Free Diet (GFD) and Potential to Resolve Indeterminate Diagnoses for Patients on GFD. *Gastroenterology*, 152(5), S114. [https://doi.org/10.1016/s0016-5085\(17\)30720-5](https://doi.org/10.1016/s0016-5085(17)30720-5)

Tye-Din, J. A., Skodje, G. I., Sarna, V. K., Dzuris, J. L., Russell, A. K., Goel, G., Wang, S., Goldstein, K. E., Williams, L. J., Sollid, L. M., Lundin, K. E. A., & Anderson, R. P. (2020). Cytokine release after gluten ingestion differentiates

- coeliac disease from self-reported gluten sensitivity. *United European Gastroenterology Journal*, 8(1), 108–118.  
<https://doi.org/10.1177/2050640619874173>
- Vader, W., Stepniak, D., Kooy, Y., Mearin, L., Thompson, A., Van Rood, J. J., Spaenij, L., & Koning, F. (2003). The HLA-DQ2 gene dose effect in celiac disease is directly related to the magnitude and breadth of gluten-specific T cell responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(21). <https://doi.org/10.1073/pnas.2135229100>
- Van Heel, D. A., Franke, L., Hunt, K. A., Gwilliam, R., Zernakova, A., Inouye, M., Wapenaar, M. C., Barnardo, M. C. N. M., Bethel, G., Holmes, G. K. T., Feighery, C., Jewell, D., Kelleher, D., Kumar, P., Travis, S., Walters, J. R. F., Sanders, D. S., Howdle, P., Swift, J., ... Wijmenga, C. (2007). A genome-wide association study for celiac disease identifies risk variants in the region harboring IL2 and IL21. *Nature Genetics*, 39(7), 827–829.  
<https://doi.org/10.1038/ng2058>
- van Heel, D. A., Hunt, K., Greco, L., & Wijmenga, C. (2005). Genetics in coeliac disease. In *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology* (Vol. 19, Issue 3 SPEC. ISS., pp. 323–339). Bailliere Tindall Ltd.  
<https://doi.org/10.1016/j.bpg.2005.01.001>
- Van Tran, N., Ernst, F. G. M., Hawley, B. R., Zorbas, C., Ulryck, N., Hackert, P., Bohnsack, K. E., Bohnsack, M. T., Jaffrey, S. R., Graille, M., & Lafontaine, D. L. J. (2019). The human 18S rRNA m6A methyltransferase METTL5 is stabilized by TRMT112. *Nucleic Acids Research*, 47(15).  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz619>
- Viatour, P., Merville, M. P., Bours, V., & Chariot, A. (2005). Phosphorylation of NF- $\kappa$ B and I $\kappa$ B proteins: Implications in cancer and inflammation. In *Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 30, Issue 1).  
<https://doi.org/10.1016/j.tibs.2004.11.009>
- Vriezinga, S. L., Auricchio, R., Bravi, E., Castillejo, G., Chmielewska, A., Crespo Escobar, P., Kolaček, S., Koletzko, S., Korponay-Szabo, I. R., Mummert, E., Polanco, I., Putter, H., Ribes-Koninckx, C., Shamir, R., Szajewska, H.,

- Werkstetter, K., Greco, L., Gyimesi, J., Hartman, C., ... Mearin, M. L. (2014). Randomized Feeding Intervention in Infants at High Risk for Celiac Disease. *New England Journal of Medicine*, 371(14).  
<https://doi.org/10.1056/nejmoa1404172>
- Wang, H., Hu, X., Huang, M., Liu, J., Gu, Y., Ma, L., Zhou, Q., & Cao, X. (2019). Mettl3-mediated mRNA m6A methylation promotes dendritic cell activation. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09903-6>
- Wang, P., Doxtader, K. A., & Nam, Y. (2016). Structural Basis for Cooperative Function of Mettl3 and Mettl14 Methyltransferases. *Molecular Cell*, 63(2), 306–317. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.041>
- Wang, Shaoru, Wang, J., Zhang, X., Fu, B., Song, Y., Ma, P., Gu, K., Zhou, X., Zhang, X., Tian, T., & Zhou, X. (2016). N6-Methyladenine hinders RNA- and DNA-directed DNA synthesis: Application in human rRNA methylation analysis of clinical specimens. *Chemical Science*, 7(2).  
<https://doi.org/10.1039/c5sc02902c>
- Wang, Siwei, Sun, C., Li, J., Zhang, E., Ma, Z., Xu, W., Li, H., Qiu, M., Xu, Y., Xia, W., Xu, L., & Yin, R. (2017). Roles of RNA methylation by means of N6-methyladenosine (m6A) in human cancers. In *Cancer Letters* (Vol. 408).  
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2017.08.030>
- Wang, X., Lu, Z., Gomez, A., Hon, G. C., Yue, Y., Han, D., Fu, Y., Parisien, M., Dai, Q., Jia, G., Ren, B., Pan, T., & He, C. (2014). N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. *Nature*, 505(7481), 117–120. <https://doi.org/10.1038/nature12730>
- Wang, X., Zhao, B. S., Roundtree, I. A., Lu, Z., Han, D., Ma, H., Weng, X., Chen, K., Shi, H., & He, C. (2015). N6-methyladenosine modulates messenger RNA translation efficiency. *Cell*, 161(6), 1388–1399.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.014>
- Wei, C. M., Gershowitz, A., & Moss, B. (1975). Methylated nucleotides block 5' terminus of HeLa cell messenger RNA. *Cell*, 4(4).  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(75\)90158-0](https://doi.org/10.1016/0092-8674(75)90158-0)
- Wei, C. M., Gershowitz, A., & Moss, B. (1976). 5'-Terminal and Internal Methylated

- Nucleotide Sequences in HeLa Cell mRNA. *Biochemistry*, 15(2).  
<https://doi.org/10.1021/bi00647a024>
- Wei, C. M., & Moss, B. (1977). Nucleotide Sequences at the N6-Methyladenosine Sites of HeLa Cell Messenger Ribonucleic Acid. *Biochemistry*, 16(8).  
<https://doi.org/10.1021/bi00627a023>
- Wei, J., Liu, F., Lu, Z., Fei, Q., Ai, Y., He, P. C., Shi, H., Cui, X., Su, R., Klungland, A., Jia, G., Chen, J., & He, C. (2018). Differential m<sup>6</sup>A, m<sup>6</sup>A m<sup>1</sup>, and m<sup>1</sup>A Demethylation Mediated by FTO in the Cell Nucleus and Cytoplasm. *Molecular Cell*, 71(6), 973-985.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.08.011>
- Wei, W., Ji, X., Guo, X., & Ji, S. (2017). Regulatory Role of N6-methyladenosine (m<sup>6</sup>A) Methylation in RNA Processing and Human Diseases. *Journal of Cellular Biochemistry*, 118(9). <https://doi.org/10.1002/jcb.25967>
- Wen, J., Lv, R., Ma, H., Shen, H., He, C., Wang, J., Jiao, F., Liu, H., Yang, P., Tan, L., Lan, F., Shi, Y. G., He, C., Shi, Y., & Diao, J. (2018). Zc3h13 Regulates Nuclear RNA m<sup>6</sup>A Methylation and Mouse Embryonic Stem Cell Self-Renewal. *Molecular Cell*, 69(6). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.02.015>
- Winkler, R., Gillis, E., Lasman, L., Safra, M., Geula, S., Soyris, C., Nachshon, A., Tai-Schmiedel, J., Friedman, N., Le-Trilling, V. T. K., Trilling, M., Mandelboim, M., Hanna, J. H., Schwartz, S., & Stern-Ginossar, N. (2019). m<sup>6</sup>A modification controls the innate immune response to infection by targeting type I interferons. *Nature Immunology*, 20(2), 173–182.  
<https://doi.org/10.1038/s41590-018-0275-z>
- Wojtas, M. N., Pandey, R. R., Mendel, M., Homolka, D., Sachidanandam, R., & Pillai, R. S. (2017). Regulation of m<sup>6</sup>A Transcripts by the 3'→5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline. *Molecular Cell*, 68(2). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.021>
- Xiao, W., Adhikari, S., Dahal, U., Chen, Y. S., Hao, Y. J., Sun, B. F., Sun, H. Y., Li, A., Ping, X. L., Lai, W. Y., Wang, X., Ma, H. L., Huang, C. M., Yang, Y., Huang, N., Jiang, G. Bin, Wang, H. L., Zhou, Q., Wang, X. J., ... Yang, Y. G. (2016). Nuclear m<sup>6</sup>A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular*

- Cell*, 61(4). <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>
- Xu, C., Liu, K., Ahmed, H., Loppnau, P., Schapira, M., & Min, J. (2015). Structural basis for the discriminative recognition of N6-Methyladenosine RNA by the human YT521-B homology domain family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 290(41). <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.680389>
- Xu, C., Wang, X., Liu, K., Roundtree, I. A., Tempel, W., Li, Y., Lu, Z., He, C., & Min, J. (2014). Structural basis for selective binding of m6A RNA by the YTHDC1 YTH domain. *Nature Chemical Biology*, 10(11), 927–929. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1654>
- Yang, C., Hu, Y., Zhou, B., Bao, Y., Li, Z., Gong, C., Yang, H., Wang, S., & Xiao, Y. (2020). The role of m6A modification in physiology and disease. In *Cell Death and Disease* (Vol. 11, Issue 11). <https://doi.org/10.1038/s41419-020-03143-z>
- Yang, Y., Fan, X., Mao, M., Song, X., Wu, P., Zhang, Y., Jin, Y., Yang, Y., Chen, L. L., Wang, Y., Wong, C. C. L., Xiao, X., & Wang, Z. (2017). Extensive translation of circular RNAs driven by N 6 -methyladenosine. *Cell Research*, 27(5). <https://doi.org/10.1038/cr.2017.31>
- Yeruva, S., Ramadori, G., & Raddatz, D. (2008). NF-κB-dependent synergistic regulation of CXCL10 gene expression by IL-1β and IFN-γ in human intestinal epithelial cell lines. *International Journal of Colorectal Disease*, 23(3). <https://doi.org/10.1007/s00384-007-0396-6>
- Zaccara, S., Ries, R. J., & Jaffrey, S. R. (2019). Reading, writing and erasing mRNA methylation. In *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (Vol. 20, Issue 10). <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0168-5>
- Zhang, C., & Darnell, R. B. (2011). Mapping in vivo protein-RNA interactions at single-nucleotide resolution from HITS-CLIP data. *Nature Biotechnology*, 29(7). <https://doi.org/10.1038/nbt.1873>
- Zhang, Zhang, Chen, L. Q., Zhao, Y. L., Yang, C. G., Roundtree, I. A., Zhang, Z., Ren, J., Xie, W., He, C., & Luo, G. Z. (2019). Single-base mapping of m6A by an antibody-independent method. *Science Advances*, 5(7). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aax0250>

- Zhang, Zijie, Luo, K., Zou, Z., Qiu, M., Tian, J., Sieh, L., Shi, H., Zou, Y., Wang, G., Morrison, J., Zhu, A. C., Qiao, M., Li, Z., Stephens, M., He, X., & He, C. (2020). Genetic analyses support the contribution of mRNA N6-methyladenosine (m6A) modification to human disease heritability. *Nature Genetics*, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-0644-z>
- Zheng, G., Dahl, J. A., Niu, Y., Fedorcsak, P., Huang, C. M., Li, C. J., Vågbo, C. B., Shi, Y., Wang, W. L., Song, S. H., Lu, Z., Bosmans, R. P. G., Dai, Q., Hao, Y. J., Yang, X., Zhao, W. M., Tong, W. M., Wang, X. J., Bogdan, F., ... He, C. (2013). ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. *Molecular Cell*, 49(1), 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.10.015>
- Zhou, J., Wan, J., Gao, X., Zhang, X., Jaffrey, S. R., & Qian, S. B. (2015). Dynamic m6 A mRNA methylation directs translational control of heat shock response. *Nature*, 526(7574), 591–594. <https://doi.org/10.1038/nature15377>
- Zhu, T., Roundtree, I. A., Wang, P., Wang, X., Wang, L., Sun, C., Tian, Y., Li, J., He, C., & Xu, Y. (2014). Crystal structure of the YTH domain of YTHDF2 reveals mechanism for recognition of N6-methyladenosine. In *Cell Research* (Vol. 24, Issue 12, pp. 1493–1496). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.152>