

eman ta zabal zazu



Universidad  
del País Vasco

Euskal Herriko  
Unibertsitatea

---

---

***IRF7ren erregulazioa  
m6A-bitarteko  
mekanismoen bidez:  
birus-infekzioen eta  
gaixotasun zeliakoaren  
arteko lotura***

---

---

Doktorego Tesia

**Maialen Sebastian de la Cruz**

Leioa, 2023

Zuzendariak:

Ainara Castellanos Rubio

Jose Ramon Bilbao Catalá

Lan hau Euskal Herriko Unibertsitateak (UPV/EHU) Maialen Sebastian de la Cruz-i emandako doktoretza aurreko beka baten bidez finantzatu da (PIF18/119).

Lehenik eta behin eskerrak eman nahi dizkiet Ainara eta Buliri, nire zuzendariei, laborategira iritsi nintzenetik eta urte hauetan guztietan lagundu eta irakatsi didazuen guztiagatik.

Nire laborategiko lankideei ere elkarrekin pasatako denbora eskertu nahi nieke. Izortze, Ane, Itziar, Henar, Jon, Leire eta Luisma, mila esker dudak argitzen laguntzeagatik, ideiak konpartitzeagatik eta emaitzen araberako umore aldaketetan lagun izateagatik. Sobre todo quiero agradecerle a Henar su apoyo y su paciencia para escuchar todas mis idas y venidas, que no han sido pocas.

Me gustaría agradecer a Marta por ser luz en los días más oscuros, por comprenderme, por creer en mí en los momentos en que ni yo lo hacía, y por hacerme ver que todo suma y que cada persona tiene su tempo. Y gracias a todas aquellas personas que habéis sido parte de este proceso, porque de una manera o de otra, vosotros también me habéis ayudado a llegar hasta aquí. Muchísimas gracias!

I'd like to thank Thomas, Alyssa, Rodri... and all the people that were part of my life during the last year, you helped me grow as a scientist and as a person in many different ways and thanks to you I reached my goal. It's been a bumpy ride but I finally made it. Thank you!

Nire esker onak ere nire lagunentzat. Maddalen, Maider, Maddi, Irati, Ana eta Lara, eskerrik asko behar izan dudanetan zulotik ateratzen laguntzeagatik: egindako bidaiak, edozein aurrerapauso ospatzeko edandako zerbezak, barrenak hustutzeko emandako paseoak... mila, mila esker! Eta Mikel, zuri ere eskerrik asko, pixukiderik ezin hobea izateagatik eta Bilbon bizitako azken bi urteak denetan onenak bihurtzeagatik.

Azkenik nire eskerrik beroenak nire familiari. Aita, muchísimas gracias por enseñarme tanto, por procurar que no me faltase de nada, por estar siempre ahí en caso de necesitar ayuda. Ama, zuri dena daukat eskertzeko, mila esker emandako aholku guztiengatik, beti entzuteko eta laguntzeko prest egoteagatik, zure maitasunarekin ni zaintzeagatik, txarrenari ere alde ona bilatzen irakasteagatik, eta egunik okerrenetan ere aurrera egiteko indarra dudala ikusarazteagatik. Aita y ama, gracias por ayudarme a ser la persona que soy, por vuestro apoyo incondicional y por vuestra confianza, este doctorado también es vuestro. Jon, eskerrik asko, anai-arreben arteko maitasunak izandako liskar guztiek baino indar handiagoa duelako eta beti hori demostratu didazulako. Abuelo, gracias por todo el cariño que me diste. Abuela, gracias por tu fortaleza, por ser tan valiente y luchadora. Eres un ejemplo a seguir. Y muchas gracias también a todos mis tíos y primos por apoyarme y por mostrar interés por mi trabajo y mis avances.

Eta nola ez, Unai. Eskerrik asko hilabete zail hauetan izan dezun pazientziagatik, egunik tristenak ere alaitzen saiatzeagatik, ulertezina ere ulertzeko ahalegina egiteagatik, baina batez ere bizitako momentu on eta ez hain onetan beti hor egoteagatik. *“Eta zure eskutik bidean aurrera egin...”* eskerrik asko, egoera zailen aurrean askatu ez, baizik eta indar gehiagorekin heltzeagatik. Bihotz bihotzez, mila esker!

**EDUKIAK**

<b>LABURDURAK .....</b>	<b>7</b>
<b>PROIEKTUAREN JUSTIFIKAZIOA ETA GARRANTZIA .....</b>	<b>13</b>
<b>SARRERA .....</b>	<b>15</b>
<b>1. Gaixotasun zeliakoa .....</b>	<b>16</b>
1.1. Erantzun immunitarioa GZan .....	17
1.1.1. Erantzun immunitario egokitzalea GZan .....	17
1.1.2. Berezko erantzun immunitarioa GZan .....	19
1.2. GZaren garapenean eragiten duten faktore genetikoak .....	20
1.3. GZaren garapenean inplikaturik egon daitezkeen ingurumen-faktoreak .....	22
<b>2. Birus-infekzioak .....</b>	<b>24</b>
2.1. Birus-infekzioak eta GZa .....	25
2.2. Birusen aurkako immunitatea .....	26
2.2.1. I motako IFN seinaleztapen bidea eta IFN ekoizpena .....	26
2.2.2. JAK-STAT seinaleztapen-bidea eta ISGen ekoizpena .....	30
2.2.3. IRF7 .....	32
<b>3. Epi-transkriptomika .....</b>	<b>36</b>
3.1. N <sup>6</sup> -metiladenosina (m6A) .....	37
3.2. m6A makineria .....	38
3.2.1. m6A idazleak .....	39
3.2.2. m6A ezabatzaileak .....	41
3.2.3. m6A irakurleak .....	42
3.3. m6A eta birus-infekzioak .....	44
3.4. m6A erantzun immunitarioan .....	44
<b>HIPOTESIA ETA HELBURUAK .....</b>	<b>47</b>

<b>MATERIAL ETA METODOAK .....</b>	<b>49</b>
<b>1. Materialak .....</b>	<b>50</b>
1.1. Giza-laginak .....	50
1.2. Zelulak eta tratamenduak .....	51
1.2.1. PIC+PTG <i>in vitro</i> ereduak .....	51
1.2.1.1. Endotoxinarik gabeko PTGren prestaketa .....	52
1.2.1.2. PIC+PTG <i>in vitro</i> ereduaren ezaugarriak .....	52
1.2.2. Beste tratamenduak .....	53
<b>2. Metodoak .....</b>	<b>54</b>
2.1. Gainadierazpenak .....	54
2.1.1. Plasmidoaren eraketa .....	54
2.2. Isilarazpen esperimentuak .....	56
2.3. Zelula zatiketa .....	56
2.4. RNA eta proteina erauzketa .....	57
2.5. Gene adierazpenaren azterketa .....	57
2.6. Western Blot .....	58
2.7. RNA immunoprezipitazioa .....	59
2.7.1. m6A RNA immunoprezipitazioa (meRIP) .....	59
2.7.2. m6A makineriako proteinen RNA immunoprezipitazioa .....	60
2.8. ELISA .....	61
2.8.1. Reobirusen aurkako antigorputzen detekzioa serum laginetan .....	61
2.8.2. CXCL10 kuantifikazioa serum laginetan .....	64
2.8.3. m6A totalaren kuantifikazioa .....	64
2.9. Online zerbitzariak .....	65
2.9.1. SRAMP .....	65
2.9.2. RNAfold .....	65
2.10. Estatistika-analisiak .....	66

<b>EMAITZAK</b> .....	<b>67</b>
<b>1. Reobirus infekzioa eta GZa</b> .....	<b>68</b>
1.1. Reobirusen aurkako errektibotasuna detektatzeko teknika baten garapena eta optimizazioa .....	68
1.2. Reobirusaren aurkako erum errektibotasuna GZan .....	70
<b>2. Birusen aurkako immunitatea GZan</b> .....	<b>72</b>
<b>3. m6A metilazioa GZan</b> .....	<b>74</b>
3.1. m6A metilazioa eta m6A makineria GZan .....	74
3.2. m6A makineriaren eta birusen aurkako erantzunaren arteko lotura GZan .....	76
<b>4. Birus-infekzioen eta gluten-kontsumoaren konbinazioaren ebaluazioa hesteetan: PIC+PTG in vitro eredua HCT-15 heste-zeluletan</b> .....	<b>78</b>
4.1. m6A makineria PIC+PTG <i>in vitro</i> ereduan .....	78
4.2. Hantura-transkribatuak eta birusen aurkako transkribatuak PIC+PTG <i>in vitro</i> ereduan .....	81
4.2.1. IRF7 erregulazioa PIC+PTG <i>in vitro</i> ereduan .....	81
<b>5. m6A bidezko IRF7 erregulazioa</b> .....	<b>84</b>
5.1. m6A motiboen iragarpena eta <i>IRF7</i> mRNAren metilazioa baieztatzea .....	84
5.2. m6A makineria bidezko IRF7 erregulazioa .....	86
5.2.1. METTL3 m6A idazle bidezko IRF7 erregulazioa .....	86
5.2.2. ALKBH5 m6A ezabatzaile bidezkoa IRF7 erregulazioa .....	88
5.3. m6Aren eragina <i>IRF7</i> mRNAren metabolismoan .....	90
5.3.1. m6Aren eragina <i>IRF7</i> mRNAren lokalizazioan .....	90
5.3.2. m6Aren eragina <i>IRF7</i> mRNAren egonkortasunean .....	92
5.3.3. m6Aren eragina <i>IRF7</i> mRNAren itzulpenean .....	93
5.3.4. m6A metilazioaren ekarpena IRF7 mailen erregulazioan .....	95
<b>6. m6Aren eragina IRF7ren ibaian beherako jardueran</b> .....	<b>97</b>
<b>EZTABAIDA</b> .....	<b>99</b>
<b>ONDORIOAK</b> .....	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>114</b>

**LABURDURAK**

<b>ac4C</b>	N <sup>4</sup> -azetilzidina
<b>ALKBH5</b>	AlkB homolog 5, RNA demetilasa
<b>Anti-EMA</b>	Endomisikoaren aurkako antigorputzak
<b>Anti-TGA</b>	Transglutaminasaren aurkako antigorputzak
<b>ATF2</b>	<i>Activating transcription factor 2</i> – Transkripzio-faktore aktibatzailea 2
<b>BCA</b>	Bicinchoninic acid – Azido bizikonikoa
<b>CDS</b>	<i>Coding sequence</i> – Sekuentzia kodetzailea
<b>cGAS</b>	<i>Cyclic GMP-AMP synthase</i> – GMP-AMP sintasa ziklikoa
<b>CXCL10/16</b>	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10/16</i> – C-X-C motibodun kemokina ligandoa 10/16
<b>DAMP</b>	<i>Damage-associated molecular pattern</i> – Minari asoziatutako patroiz molekularrak
<b>dsRNA</b>	<i>Double strand RNA</i> – Harizpi bikoitzeko RNA
<b>DTT</b>	Ditiotreitola
<b>eIF4F</b>	<i>Eukaryotic initiation factor 4F</i> – Eukariotoen hasle faktorea 4F
<b>eIF4G2</b>	<i>Eukaryotic translation initiation factor 4 gamma 2</i> – Eukariotoen itzulpenaren hasle faktorea gamma 2
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> – Entzimei lotutako immunoabsortzioko saiakuntza
<b>ESPGHAN</b>	<i>European Society for Pediatric Gastroenterology, Hepatology and Nutrition</i> – Gastroenterologia Pediatrikoko Hematologia eta Nutrizioko Europako Elkarte
<b>EV71</b>	Enterobirus 71
<b>FBS</b>	<i>Fetal bovine serum</i> – Behi fetuaren seruma
<b>FOXO3</b>	<i>Forkhead box O3</i> – Forkhead kutxa O3

<b>FTO</b>	<i>Fat mass and obesity associated alpha-ketoglutarate dependent dioxygenase</i> – Gantz-masa eta gizentasunarekin asoziatutako alfa-ketoglutaratoaren menpeko dioxigenasa
<b>GGD</b>	Glutenik gabeko dieta
<b>GWAS</b>	<i>Genome wide association studies</i> – Genoma osoko asoziazio-azterketak
<b>GZ</b>	Gaixotasun zeliakoa
<b>HCV</b>	Hepatitis C birusa
<b>HDAC3</b>	Histona deazetilasa 3
<b>HLA</b>	<i>Human leukocyte antigen</i> – Giza-leukozitoen antigenoa
<b>hnRNP D</b>	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D</i> – Nukleoko erribonukleoproteina D heterogeneoa
<b>I</b>	Inosina
<b>IFITM1</b>	<i>Interferon induced transmembrane protein 1</i> – Interferonak induzitutako transmintzeko proteina 1
<b>IFN</b>	Interferon
<b>IFNB1</b>	Interferon beta 1
<b>IFNR</b>	Interferon hartzailea
<b>IFN-I</b>	1 motako IFN
<b>IL15/18</b>	Interleukina 15/18
<b>IKK</b>	<i>Inhibitor of NF-<math>\kappa</math>B kinase</i> – NF- $\kappa$ B kinasa inhibitzailea
<b>IRF</b>	Interferon regulatory factor – Interferon faktore erregulatzailea
<b>ISG</b>	<i>Interferon stimulated gene</i> – Interferonak estimulatutako geneak
<b>ISGF3</b>	<i>Interferon stimulated gene factor 3</i> – Interferonak estimulatutako gene faktore 3
<b>IPS1</b>	<i>Interferon beta promoter stimulator protein 1</i> – Interferon beta promoterearen proteina estimulatzailea 1
<b>ISRE</b>	<i>Interferon-sensitive response element</i> – Interferonarekiko erantzun-elementu sentikorra



<b>JAK</b>	Janus kinasa
<b>Inc13</b>	<i>Long non-coding 13</i> – RNA ez kodetzaile luzea 13
<b>lncRNA</b>	<i>Long non-coding RNA</i> – RNA ez kodetzaile luzea
<b>LIE</b>	Linfozito intra-epitelialak
<b>LPS</b>	Lipopolisakaridoak
<b>m1A</b>	N <sup>1</sup> -metiladenosina
<b>m3C</b>	3-metilzitidina
<b>m5C</b>	5-metilzitidina
<b>m6A</b>	N <sup>6</sup> -metiladenosina
<b>m6Am</b>	N <sup>6</sup> ,2'-O-dimetiladenosina
<b>m7G</b>	7-metilguanosina
<b>MAVS</b>	<i>Mitochondrial antiviral signaling protein</i> – Mitokondrioko birusen aurkako seinaleztapen proteina
<b>MDA5</b>	<i>Melanoma differentiation-associated protein 5</i> – Melanoma diferentziazioarekin asoziatutako proteina 5
<b>meRIP</b>	m6A RNA immunoprezipitazioa
<b>mRNA</b>	<i>Messenger RNA</i> – RNA mezularia
<b>METTL3</b>	Metiltransferasa 3, N <sup>6</sup> -adenosine-metiltransferasa konplexuko azpiunitate katalitikoa
<b>METTL14</b>	Metiltransferasa 14, N <sup>6</sup> -adenosine-methyltransferase azpiunitatea
<b>MIC-A</b>	<i>MHC class I chain-related gene A</i> – 1 klaseko MHC katearekin erlazionatutako genea A
<b>MUT</b>	Mutatutako
<b>MYD88</b>	<i>MYD88 innate immune signal transduction adaptor</i> – MYD88 berezko seinale immunitarioaren transdukzio-egokitzaila
<b>NAP1</b>	<i>Nucleosome assembly protein 1</i> – Nukleosoma muntatzeko proteina 1
<b>NCOR2</b>	<i>Nuclear receptor corepressor 2</i> – Nukleo-hartzaile koerrepresorea 2

<b>NFkB</b>	<i>Nuclear factor kappa B</i> – Nukleoko kappa B faktorea
<b>NFX1</b>	<i>Nuclear transcription factor, x-box binding 1</i> – Nukleoko transkripzio-faktorea, x-kutxa lotzailea 1
<b>NK</b>	<i>Natural killer</i> – Hiltzaile naturalak
<b>NKG2D</b>	<i>Natural killer group 2D</i> – Hiltzaile naturalen taldea 2D
<b>OASL1</b>	<i>2'-5'-oligoadenylate synthetase like 1</i> – 2'-5'-oligoadenilato sintetasa gisakoa 1
<b>PABP1</b>	<i>Poly(A) binding protein 1</i> – Poli(A) proteina lotzailea 1
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular pattern</i> – Patogenoei asoziatutako patroi molekularrak
<b>PBS</b>	<i>Phosphate-buffered saline buffer</i> – Fosfato tanpoidun gatz bufferra
<b>PCR</b>	<i>Polymerase chain reaction</i> – Polimerasaren kate-erreakzioa
<b>PFU</b>	<i>Plaque-forming unit</i> – Plaka-sortze unitatea
<b>PIC</b>	<i>Polyinosinic:polycytidylic acid</i> – Azido poliinisinko:polizitidilikoa
<b>PRR</b>	<i>Pattern-recognition receptors</i> – Patroi-ezagutze hartzeileak
<b>qPCR</b>	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i> – Polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa
<b>RBM15</b>	<i>RNA binding motif protein 15</i> – RNA lotze-motibodun proteina 15
<b>REPIC</b>	<i>RNA Epitranskriptome Collection</i> – RNA epitranskriptoma bilduma
<b>RIG-I</b>	<i>Retinoic acid-inducible gene 1</i> – Azido erretinoiko gene induzigarria I
<b>RIP</b>	RNA immunoprezipitazioa
<b>RLR</b>	<i>RIG-I like receptor</i> – RIG-I gisako hartzailea
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medioa
<b>rRNA</b>	<i>Ribosomal RNA</i> – RNA erribosomikoa
<b>RT-qPCR</b>	<i>Real-time quantitative polymerase chain reaction</i> - Denbora errealeko polimerasaren kate-erreakzio kuantitatiboa

<b>SAMHD1</b>	<i>SAM and HD domain containing deoxynucleoside triphosphate triphosphohydrolase 1</i> – SAM eta HD domeinudun deoxinukleosido trifosfato trifosfohidrolasa 1
<b>SD</b>	<i>Standard deviation</i> – Desbideratze estandarra
<b>SDS</b>	Sodio dodezil sulfatoa
<b>SDS-PAGE</b>	Sodio dodecil-sulfato poliakrilamida gel elektroforesia
<b>SEM</b>	<i>Standard error of mean</i> – Batezbestekoaren errore estandarra
<b>siRNA</b>	<i>Small interfering RNA</i> – RNA interferente laburra
<b>SNP</b>	<i>Single nucleotide polymorphism</i> – Nukleotido bakarreko aldaera
<b>SOCS</b>	<i>Suppressor of cytokine signaling</i> - Zitokinen seinaleztapenaren supresorea
<b>SRAMP</b>	<i>Sequence-based RNA adenosine methylation site predictor</i> – Sekuentzian oinarritutako RNA adenosina metilazio guneen auresalea
<b>SRSF3</b>	<i>Serine and arginine rich splicing factor 3</i> – Serina eta arginina ugariko moztitsazte faktorea 3
<b>ssDNA</b>	<i>Single strand DNA</i> – harizpi bakarreko DNA
<b>ssRNA</b>	<i>Single strand RNA</i> – harizpi bakarreko RNA
<b>STAT</b>	<i>Signal transducer and activator of transcription</i> – Transkripzioaren seinale transduktorea eta aktibatzailea
<b>STING</b>	<i>Stimulator of interferon response cGAMP interactor 1</i> – Interferon erantzunaren estimulatzailea eta cGAMP elkarreragilea 1
<b>TBK1</b>	<i>TANK-binding kinase 1</i> – TANK kinasa lotzailea 1
<b>TBS</b>	<i>Tris buffered saline buffer</i> – Tris tanpoidun gatza bufferra
<b>TG</b>	Tratamendurik gabe
<b>TG2</b>	Transglutaminasa 2
<b>TLR</b>	<i>Toll like receptor</i> – Toll motako hartzailea
<b>TRAF6</b>	<i>TNF receptor associated factor 6</i> – TNF hartzaileei asoziatutako faktorea

<b>TRIF</b>	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-<math>\beta</math></i> – TIR-domeinudun egokitzailea, interferon- $\beta$ eragilea.
<b>tRNA</b>	<i>Transfer RNA</i> – Transferentziako RNA
<b>UTR</b>	<i>Untranslated region</i> – Itzuli gabeko eskualdea
<b>VIRMA</b>	<i>Vir like m6A methyltransferase associated</i> – Vir gisako m6A metittransferasa asoziatua
<b>WB</b>	Western Blot
<b>WT</b>	<i>Wild type</i> – Jatorrizkoa
<b>WTAP</b>	Wilms tumor 1 asoziatutako proteina
<b>XPO1</b>	Exportina 1
<b>YTHD</b>	YT521-B homologia domeinua
<b>YTHDC1-2</b>	YTH domeinudun 1-2
<b>YTHDF1-3</b>	YTH N <sup>6</sup> -Metiladenosina RNA proteina lotzailea 1-3
<b>ZC3H13</b>	<i>Zinc finger CCCH-type containing 13</i> – Zink-hatz CCCH-motaduna 13
<b><math>\psi</math></b>	Pseudouridina

## **PROIEKTUAREN JUSTIFIKAZIOA ETA GARRANTZIA**

Gaixotasun zeliakoa (GZ) hanturazko gaixotasun kroniko bat da, sentiberatasun genetikoa duten pertsonengan diEtako glutenaren aurkako erantzun immunitario desegoki batek garatua. GZa duten pazienteetan, faktore genetikoen eta ingurumenekoen arteko elkarrekintzak glutenarekiko tolerantzia galtzea eta hesteetako lesio bat garatzea dakar. Lesio horrek sintoma oso aldakorrek sortzen ditu, eta horiek oso desberdinak dira gizabanakoen artean, gaitza goiz diagnostikatzea zailtzen duelarik, batez ere helduetan, non ohiko sintoma gastrointestinalak ez diren hain maiz ageri.

GZa eritasun konplexua da, sentiberatasun genetikoa duten pertsonengan garatzen dena. Dena dela, sentiberatasun genetikoa horren ondorioz glutenak eragindako erantzun immunitarioak patologiaren heredagarritasunaren %50 baino gutxiago azaltzen du, eta beraz, glutenaz gain, erantzun immunitarioaren aktibazioa eragiten duten ingurumen-faktore gehigarriak egon daitezkeela pentsa dezakegu. Hau kontuan izanda, birus-infekzioak GZaren agente eragile izateko hautagai gisa proposatu dira. Gainera, orain arte, bizitza osorako glutenik gabeko dieta (GGD) zorrotza da hesteetako kalteak gainditzeko eta sintomatologia murrizteko modu bakarra. Hala ere, zaila da GGD estua betetzea, eragin negatiboa baitu GZdun pazienteen bizi-kalitatean, eta hori gutxi ez balitz, kasu batzuetan ez delako eraginkorra, ez baitu sintomatologia baretzen, tratamendu berrien garapenaren beharra aditzera emanez

Hori dela eta, funtsezkoa da gaixotasunaren patogenesisian zein gene, bidezidor eta mekanismo erregulatzailerik parte hartzen duten zehaztea. Ikerketa horiek GZaren garapenaren atzean dauden mekanismo patogenikoak ulertzen lagunduko dute, eta birus-infekzioen eta GZaren arteko erlazioaren inguruko ikuspegi berriak argituko dituzte. Honetaz gain, birusen aurkako bidezidor erregulatzailerik nagusiak ezagutzeak esku hartzeko iturri berriak identifikatzen lagunduko du ere. Horrela, tesi honek bezalako ikerketa-lanek, terapia alternatibo edo prebentzio estrategia edo planteamendu berriak

garatzeko ateak irekitzen dituzte. Gainera, hemen aurkeztutako aurkikuntzek sistema immunitarioaren aktibatzearen atzean dauden mekanismoak ulertzeko ikuspuntu berriak planteatzen dituzte, beste gaixotasun konplexu eta autoimmunitario batzuetara ere estrapola daitezkeenak.

GZaren garapenean birus-infekzioen inplikazioa analizatzeko, proiektu hau RNA birus infekzioen aurkako erantzun immunitarioarekin lotutako faktore funtzionalak bilatzera bideratu da, ikuspegi genetikoak eta hautagaien *in vitro* egiaztapen funtzionalak erabiliz. Zehazkiago, doktore-tesi honetan birus-infekzioak eta glutenaren kontsumoa konbinatu ondorengo IRF7ren gene-erregulazio geruza berri bat aztertu dugu, eta m6A RNA metilaziok birusen aurkako transkribatu horren erregulazioan eta IFN-I bidezidorrean ibaian behera duen jarduera aztertu dugu.

***SARRERA***

## 1. Gaixotasun zeliakoa

Gaixotasun zeliakoa (GZ) hanturazko gaixotasun kronikoa da, glutenaren (garia, garagarra edota zekalea bezalako zerealetan dagoen proteinen nahastea) aurkako erantzun immunitarioak garatua (B Meresse et al., 2009). Eritasun immune hau suszeptibilitate genetikoa duten pertsonetan garatzen da eta munduko populazioaren %1-3ri eragiten dio, azken hamarkadetan goranzko intzidentzia izaten ari delarik (Lerner, 2014; Lerner & Matthias, 2015).

GZaren sintomak oso aldakorrek dira. Batetik, gaixoei sintoma gastrointestinal tipikoak izan ditzakete, hala nola, beherako kronikoa, pisu galera, edota sabeleko mina; bestetik, hestez kanpoko sintoma atipikoak ere garatu ahal dituzte, nekea, hezur-dentsitate baxua edota anemia kasu, eta azkenik, neurogluten gisa sailkatzen diren sintomak ere deskribatu dira, besteak beste migrainak, epilepsia edota zerebeloko ataxia (Feighery, 1999; Lionetti et al., 2015; Rodrigo, 2016). Dena dela, aurkezpen kliniko hauek oso desberdinak dira gizabanakoen artean, eta horrek gaixotasunaren diagnostiko goiztiarra zaildu ohi du, batez ere sintoma gastrointestinalak hain ohikoak ez diren helduetan (Cicarelli et al., 2003; Green, 2005; Green et al., 2001; Lionetti et al., 2015).

GZa duten pazienteetan, faktore genetikoen eta ingurumen-faktoreen elkarreraginak glutenarekiko tolerantziaren galera eta hesteetako kaltearen sorrera dakar. Hesteko lesio honek ezaugarri hauek ditu: linfuzito intraepitelialen (LIE) kopurua emendatzea bai epitelioan baita lamina proprian ere, heste-meheko biloen atrofia edota galera, kripten hiperplasia, heste-zelulen apoptosia eta mukosaren birmoldaketa (Caio et al., 2019; Dieli-Crimi et al., 2015; Kim & Jabri, 2015). Hesteetako kaltearen bereizgarri horiek, eta transglutaminasa (anti-TGA) eta endomisioaren (anti-EMA) aurkako auto-antigorputzen presentzia odolean dira GZa diagnostikatzeko beharrezkoak diren eta kontuan hartzen diren zantzu nagusiak (Husby et al., 2012).



Gaur egun, hesteetako kalteak gainditzeko eta sintomatologia murrizteko modu bakarra bizitza osorako glutenik gabeko dieta (GGD) zorrotza jarraitzea da (Murray et al., 2004). Hala ere, GGD guztiz betetzea zaila da, batez ere, glutenik gabeko produktuen aukera urriagatik eta hauen prezio altuagatik. Hala, GZa duten pertsonen bizi-kalitatea nabarmen kaltetzen da (Samasca et al., 2014). Gainera, gaixo zeliakoen artean azpitalde txiki bat dago zeinak GZ ez-erantzunkorra edo errefraktarioa deritzona jasaten duena. Paziente hauek, GGDrekiko atxikimendu estuan ere, ez diote tratamenduari erantzuten, eta sintoma iraunkorrak edo errepikakorrak izaten dituzte, hesteko hantura eta kalteak desagertzen ez direlarik (Rubio-Tapia & Murray, 2010). Hori dela eta, terapia alternatibo edo prebentzio planteamendu edo estrategia berriak garatzea oso onuragarria izango litzateke GZdun pertsonentzat oro har, eta bereziki GZ errefraktarioa duten pazienteentzat.

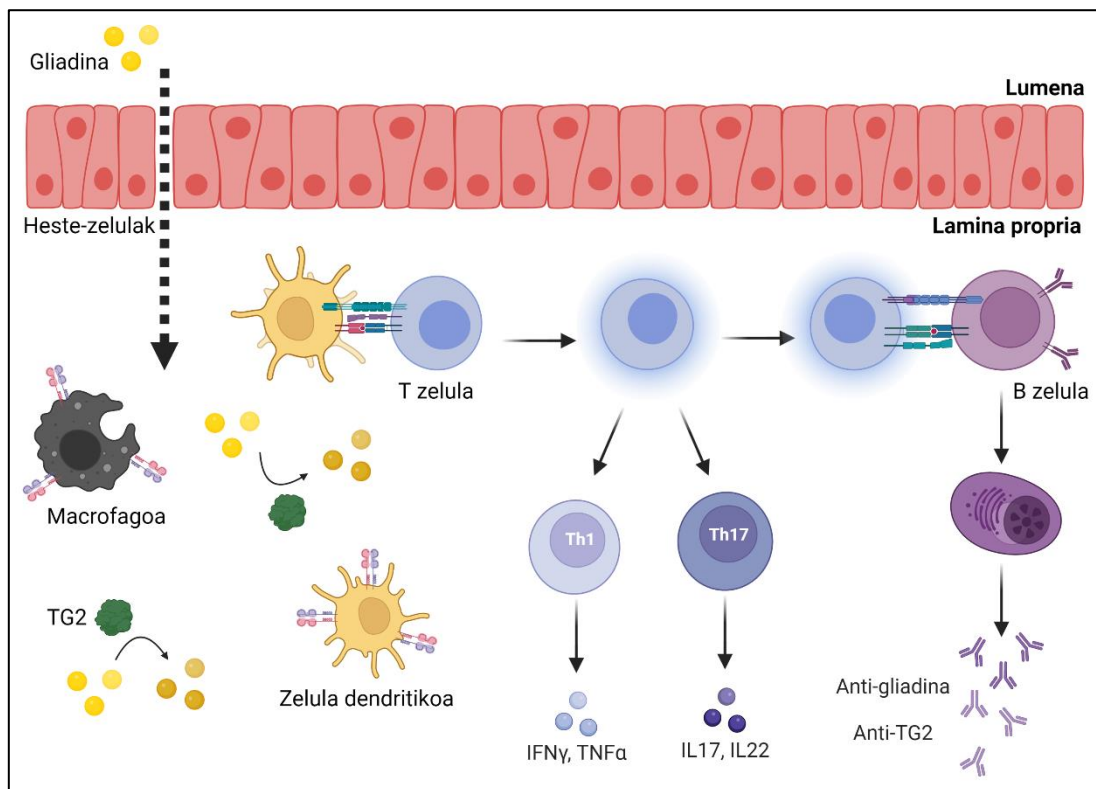
### 1.1. Erantzun immunitarioa GZan

Glutenaren kontsumoak berezko erantzun immunitarioa eta erantzun immunitario egokitzaila aktibatzen ditu eta biek dute eragina GZaren fisiopatologian. Sistema immunitario egokitzailaren ekarpena aski ezaguna da, eta aspaldi deskribatu zen. Aitzitik, berezko immunitatearen ekarpena ez da sakonki ulertzen, eta zenbait ikerketak prozesu honen inguruan ezagutza handia lortzen lagundu diguten arren (Abadie & Jabri, 2014; Kim & Jabri, 2015; Schulzke et al., 1998), puzzlea oraindik ez dago guztiz osatuta.

#### 1.1.1. *Erantzun immunitario egokitzaila GZan*

Glutena gliadina eta glutenina deritzen eta glutaminetan eta prolinetan ugari diren proteinek osatzen dute. Proteina horiek, gliadina bereziki, proteasekiko eta beste entzima gastrointestinal batzuekiko erresistenteak dira. Ondorioz, ez dira erabat degradatzen, eta peptido toxikoak eta immunogenikoak sortzen dituzte (Ciccocioppo et al., 2005; Silano et al., 2009). Peptido immunogeniko hauek hestearen hesi epiteliala zeharka dezakete eta lamina propria igaro, non bertako ehun-transglutaminasek

desamidatuko dituzten. Entzima honek, glutaminak karga negatiboko glutamato bihurtzen ditu, haien immunogenizitatea areagotuz (Briani et al., 2008; Molberg O et al., 1998). Lamina propria dauden zelula antígeno-aurkezleak, deamidatutako gliadina-peptidoak ezagutu eta T linfozitoei aurkezteko gai dira, mintzean daramatzaten HLA-DQ2 edota HLA-DQ8 molekulen bidez. Ondorioz, T zelulek Th1 eta Th17 fenotipoak hartzen dituzte eta hantura-zitokinak jariatzen dituzte, hestean giro inflamatorioa sortaraziz (B Meresse et al., 2009; Briani et al., 2008; Castellanos-Rubio et al., 2009) (1. Irudia).



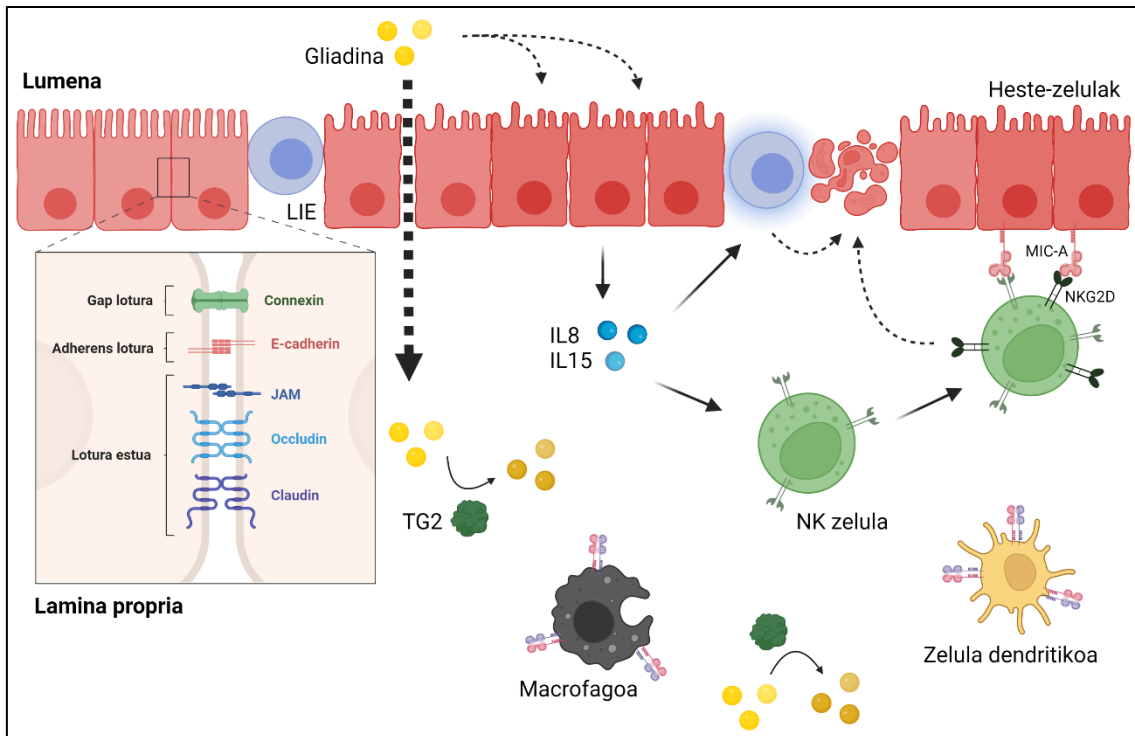
**1. Irudia.** Erantzun immunitario egokitzalearen irudi eskematikoa GZan. Gliadina-peptidoek epiteli-hesia gurutzatzen dute heste-argitik lamina propria, eta TG2 entzimak desamidatzen ditu. Zelula antígeno aurkezleen, hala nola makrofagoen eta zelula dendritikoen, gainazalean dauden HLA-DQ2 edo -DQ8 molekulek gliadina desamidatuen peptidoak ezagutzen dituzte eta T zelulei aurkezten dizkiete. Hala, T zelulak aktibatua egiten dira eta Th1 eta Th17 fenotipoak hartzen dituzte, horrek hantura-zitokinak jarioa sortzen duelarik. B zelulak ere aktibatua egiten dira, eta, ondorioz, anti-gliadina eta anti-TG2 autoantigorputzak sintetizatzen dituzten zelula plasmazitoideak bihurtzen dira. BioRenderrekin sortutako irudia.

Horrez gain, B zelulak ere aktibatzen dira eta gliadinaren aurkako antigorputzak, eta anti-EMA eta anti-TGA auto-antigorputzak ekoizten dituzte. Ehun eta proteina propioen aurkako eraso honen bitartez, GZan gertatzen den erantzun auto-immunitarioa abiarazten da, eta gaixotasunaren ezaugarri den hesteko kalteak eragiten ditu (B Meresse et al., 2009; Lejeune et al., 2021).

### 1.1.2. Berezko erantzun immunitarioa GZan

Epitelio-hesia sistema immunitarioaren osagarri garrantzitsua da, gure organismoan sartzen diren patogenoen aurka babesteko lehen defentsa lerroa baita. Hesteetako zelula epitelialek alde batean heste-lumena eta bestean lamina propioa banatzen dituen horma osatzen dute. Zelula horiek lotura hertsien edo *zonula occludens* bidez lotuta daude, hesia ia iragazgaitz bihurtuz eta molekulak alde batetik bestera igarotzea erregulatzea ahalbidetuz. GZan iragazkortasun hau asaldatuta dago (Jauregi-Miguel et al., 2019; Schulzke et al., 1998) eta gliadina-peptido toxikoek lamina propriara zeharka dezakete. Gliadina-peptido horiek enterozitoen apoptosia eta *IL15* eta *IL8* geneen adierazpena bultzatzen dituzte (Abadie et al., 2020; Goel et al., 2019). Alde batetik, IL15ek linfzito intraepitelialak (LIE) ugaltzea eta aktibazioa sustatzen du, eta NK zelulak aktibatzen dituen NKG2D hartzailearen ekoizpena eragiten du (Abadie & Jabri, 2014; B Meresse et al., 2009). IL8ak bere aldetik, neutrofiloak aktibatu eta hantura-lekuetara erakartzen ditu (Barone et al., 2014; Jelínková et al., 2004) (2. Irudia).

Gainera, estres- eta infekzio-egoeratan, MIC-A molekularen gehiegizko adierazpena gertatzen da heste-zelulen azalean. Zelulen azaleko antigeno hau NKG2D hartzailearekin lotzen da, eta linfzito intraepitelialek profil zitotoxikoa hartzea eragiten du, enterozitoen apoptosia sustatuz (Allegretti et al., 2013; Hü et al., 2004).



**2. Irudia.** Berezko erantzun immunitarioren irudi eskematikoa GZan. Enterozitoek epitelio-hesia osatzen dute, Gap- zein Adherens-loturak edota lotura-estuen bidez elkar konektatzen direlarik. Hala ere, lotura horiek kaltetuta daude GZan, heste-argia eta lamina propioaren arteko iragazkortasuna handituz, horrek gliadina-peptidoak gurutzatzea errazten duelarik. Gliadina-peptido horiek, zelula antígeno hartzaileen bitartez erantzun immunitario egokitzaila aktibatzeaz gain, hantura-zitokinen ekoizpena ere eragiten dute, hala nola IL8 eta IL15, baita MIC-A molekulen adierazpena ere estres-egoerapean dauden enterozitoen gainazalean. Zitokina horiek berezko sistema immunitarioko zelulak aktibatzen dituzte, hala nola LIE eta NK zelulak. Hala, aktibatutako NK zelulek NKG2D hartzaileak dituzte gainazalean eta hartzaile horiek MIC-A molekulak ezagutu eta haiei lotzen zaizkie, zelula immunitarioak fenotipo zitotoxikora aldatuz eta enterozitoen apoptosia eraginez. BioRenderrekin sortutako irudia.

### 1.2. GZaren garapenean eragiten duten faktore genetikoak

Aurretik esan bezala, GZa gaixotasun konplexua da, suszeptibilitate genetikoak duten pertsonengan garatzen dena. Suszeptibilitate genetikoaren erantzule nagusiak HLA II motako DQ2 eta DQ8 hartzaileak dira, 6. kromosoman kokatutako HLA eskualdeko geneek kodetuak. HLA-DQ2 eta HLA-DQ8 heterodimeroak beharrezkoak dira gaixotasuna garatzeko, gliadina-peptidoak ezagutu eta hauek CD4<sup>+</sup> T linfozitoei aurkezteko gai baitira, horrela, erantzun immunitarioa abiaraziz (Ciccocioppo et al., 2005; Sciurti et al., 2018). HLA-DQ2 heterodimeroak *DQA1\*05* eta *DQB1\*02* aleloek kodetzen dituzte, eta paziente zeliakoien ia %90etan identifikatzen dira. Gainerako paziente ia guztiek (%5-10) HLA-DQ8 heterodimeroak adierazten dituzte, gehienetan *DQB1\*03:02*

eta *DQA1\*03* geneek kodetuak (Cecilio & Bonatto, 2015; Megiorni & Pizzuti, 2012). Hala ere, molekula horiek adieraztea ez da nahikoa gaixotasuna garatzeko, GZa pairatuko ez duten biztanleen %30ak alelo horiek izateak frogatzen duen bezala (Caio et al., 2019). Bere osotasunean, HLA eskualde genomikoak gaixotasunari egiten dion ekarpena %40 ingurukoa dela uste da (Megiorni & Pizzuti, 2012). Azken finean, HLA aleloa horiek ezinbestekoak dira, baina ez GZa garatzeko nahikoak.

Errendimendu handiko genotipaketa-plataformen eskuragarritasunak eta aldaketa genomikoei buruzko informazioak genoma osoko asoziazio-azterketak (*Genome Wide Association Study* edo GWAS ingelesez) egiteko aukera eman dute. Azterketa horien bidez, eritasun desberdinak dituzten pertsonen genoma osoa aztertu nahi izaten da, eta gaixotasun bakoitzean ohikoenak diren aldaerak identifikatzea da helburua; ondoren, nukleotido bakarreko aldaeren (single nucleotide polymorphism edo SNP ingelesez) eta patologien arteko asoziazioa azaltzeko (Nica & Dermizakis, 2013; Visscher et al., 2012).

Duela 15 urte GZaren lehenengo GWASa egin zenetik hona (van Heel et al., 2007), GZaren oinarri genetikoaren ezagutza eta ulermenean aurrerapen handiak egin dira. Gaur egun, GZarekiko suszeptibilitatearekin asoziatuta dauden HLA eremutik kanpoko 57 eskualde genomiko identifikatu dira (Dubois et al., 2010; Trynka et al., 2011). Eskualde horietako batzuen eragin funtzionala baliozkotu da (Castellanos-Rubio et al., 2016; Jauregi-Miguel et al., 2019; Olazagoitia-Garmendia et al., 2021). Gainera, asoziatutako SNPen mendeko zenbait mekanismo deskribatu dira, eta GZaren berezko hanturari egiten dioten ekarpena azaldu da.

GZarekin asoziatutako SNP horietako bat, GZaren garapenean parte hartzen duen *Inc13* RNA ez-kodetzaile luzearen (long non-coding RNA edo lncRNA ingelesez) exoian kokatuta dago. SNP horrek *Inc13* eta hnRNPdren arteko loturari eragiten dio, eta ondorioz, *Inc13* bidezko zenbait hantura-generen adierazpen murrizpenean (Castellanos-Rubio et al., 2016).

NFkB bidezidorraren erregulazioan parte hartzen duen *XPO1* genearen 5'UTRan GZarekin asoziatutako beste SNP bat dago. Arrisku aleloaren presentziak m6A metilazioaren emendioa dakar *XPO1* RNA mezulariaren (*messenger RNA* edo mRNA ingelesez) 5'UTRan eta ondorioz, *XPO1* proteina gehiago ekoizten da. *XPO1* proteinaren igoera horrek, NFkBren bidezidorraren gain-aktibazioa eta inflamazioa eragiten ditu (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021).

### 1.3. GZaren garapenean inplikaturik egon daitezkeen ingurumen-faktoreak

Glutena GZaren ingurumen-eragile nagusia da, eta gaixotasunaren garapenean duen zeregina sakon aztertu da. Suszeptibilitate genetikoak duten pertsonengan glutenak abiarazitako erantzun immunitarioa ondo deskribatuta dago. Hala ere, glutenaz gain, erantzun immunitarioaren aktibazioan parte hartzen duten beste ingurumen-eragile batzuk ere egongo dira ziurrenik.

Traktu gastrointestinallean giza gorputzeko mikrobio-populazio handiena dago (Zhang et al., 2020). Hesteetako mikrobiotak funtzio garrantzitsua betetzen du digestioan eta ostalariaren erantzun immunitarioaren modulazioan; horregatik, bere osieran gertatzen diren aldaketek hesteetako epitelio-hesian eragin dezakete, hesteko iragazkortasuna emendatuz, esaterako (Lerner et al., 2017). Izan ere, zenbait ikerketek azaldu dute gaixotasun autoimmunitarioak dituzten pazienteek hesteetako mikrobiomaren (biroma barne) osieran eta aniztasun proportzioetan desberdintasunak dituztela, pertsona osasuntsuekin alderatuta (Pecora et al., 2020; Spencer et al., 2022; Zhang et al., 2020), eta horrek iradoki lezake mikrobiota patologia horien garapenean inplikaturik dagoela. Hala ere, GZari dagokionez ez da oraindik asko sakondu ikerketa-eremu honetan, eta ezer gutxi dakigu mikrobiotak patogenesia izan dezakeen eraginari buruz (Leonard et al., 2021).

Duela gutxi, Epstein Barr birusaren eta esklerosi anizkoitzaren arteko elkarketaren aurkikuntzak (Bjornevik et al., 2022) birus-infekzioek gaixotasun autoimmunitarioen garapenean izan dezaketen garrantzia azpimarratu du. GZaren patogenesisi dagokionez, errotavirus eta reobirusen infekzioak dira balizko eragile-biralen hautagai nagusiak. Hainbat ikerketek *Reoviridae* familiako birus horien infekzioen eta GZaren arteko lotura erakutsi dute, nahiz eta oraindik ez den balioetsi (Bouziat et al., 2017; Lars C Stene et al., 2006).

## 2. Birus-infekzioak

Lehen esan bezala, birus-infekzioak zenbait gaixotasun autoimmuneren eragile gisa proposatu dira, GZa barne.

Birusak bizi-unitate konplexuak dira, ez baitira gai beren bizi-zikloa osatzeko beste zelula bat kutsatu gabe, zelula ostalariaren makineria behar baitute genoma erreplikatzeko. Eboluzioan zehar, organismo ostalariak eta birusek elkarrekin eboluzionatu dute, eta elkarrekintza honen ondorioz, birus mota ugari sortzearekin batera, haien aurkako defentsa-mekanismo desberdinak ere garatu dira (Kaján et al., 2020). Ugaztunetan, birusek zelula mota ezberdin asko kutsa ditzakete, hala nola azaleko zelula epitelialak, T zelulak eta sistema immunitarioko beste hainbat zelula, baita neuronak zein nerbio-sistema zentralako beste zelula batzuk ere. Hala ere, birusen sarbide nagusia arnasbideak eta traktu gastrointestinala dira (Liang & Bushman, 2021; Spencer et al., 2022). Azken honek giza gorputzeko birus-populazio handiena biltzen du, eta birus gordailu erraldoi honi hesteetako biroma esaten zaio (Cao et al., 2022). Global Virome datu-baseak dioenez, giza heste-biromaren %97,7 fagoak dira (bakterioak kutsatzen dituzten birusak), %2,1 birus eukariotikoak dira (landare eta ugaztunen birusak, batik bat) eta %0,1 arkeobakteorio-birusak dira (*archaea* erreinuko prokariotoak kutsatzen dituzten birusak) (Gregory et al., 2020).

Eukariotoen DNA-birus gehienak, sor edo latentzia-fasean daude baldintza egonkorretan (26). Bien bitartean, RNA-birusak ez dira ohikoak egoera osasuntsuan (Liang & Bushman, 2021). Hesteetako infekzioetan parte hartzen duten birus eukariotikoei birus enteriko edo heste-birus deritze. Oro har, giza hesteetako RNA biroma DNA biroma baino askoz gutxiago aztertu da. Izan ere, RNA birusak, DNA birusekin alderatuta, ez dira hain egonkorak lagin biologikoetan eta horrek zaildu egiten du sekuentziazio metagenomikoaren bidezko identifikazioa (Krishnamurthy et al., 2016).



Pertsonek birus-infekzio bat jasaten dutenean RNA birus patogenoak giza-hesteetan ager daitezke, beherakoak eragin ditzaketelarik (Julio-Pieper et al., 2021). Gastroenteritis akutuan gehien detektatzen diren birus eukariotikoak *Reoviridae* (errotavirus) eta *Picornaviridae* (enterobirusak, ekobirusak, eta abar) familiako birusak dira (Finkbeiner et al., 2008; Wilhelmi et al., 2003). Alabaina, errotavirusa da 5 urtetik beherako haurren artean heriotza gehien eragiten dituen birusa. (Fulci et al., 2021). Honetaz gain, hesteetako birus-infekzio batzuk gaixotasun autoimmuneen garapenarekin erlazionatu dira. Adibidez, enterobirusak 1 motako diabetesa garatzeko birus-hautagai nagusiak dira, Coxsackie B birusa izanik paziente prediabetiko eta diabetikoetan gehien agertzen den enterobirusa (Filippi & Von Herrath, 2008; Hyöty & Taylor, 2002).

### 2.1. Birus-infekzioak eta GZa

GZari dagokionez, HLAren arrisku genotipoa duten 1-4 urte bitarteko 6000 haur baino gehiagoren kohorte-azterketa batek erakutsi zuen lotura dagoela infekzio gastrointestinalak pairatu izanaren eta infekziotik hiru hilabetera GZaren autoimmunitatea garatzeko arriskuaren artean (Kempainen et al., 2017; Lindfors et al., 2020). Gainera, ikerketa horrek agerian utzi zuen errotavirusaren aurkako txertoa hartu zuten haurrek GZaren autoimmunitatea izateko arrisku txikiagoa zutela txertatu gabeko haurrekin alderatuz gero. Honek, GZarekin erlazionatutako infekzio gastrointestinalen portzentai bat, gutxienez, errotavirus-infekzioak izan zitezkeela iradokitzen du (Kempainen et al., 2017; Lindfors et al., 2020). Honetaz gain, errotavirusak GZaren eragile gisa proposatu izan dira, errotavirus-infekzio errepikatuen ebidentzia serologikoa eta GZaren autoimmunitatearen hasiera korrelazionatuta baitaude (Lars C Stene et al., 2006).

Ugatzunen T1L ortoreobirusa (reobirusa), *Reoviridae* familiako dsRNA birus enterikoa, GZaren birus-eragile gisa proposatu da ere (Bouziat et al., 2017). Bouziat *et al*-ek paziente zeliakoek reobirusen aurkako antigorputzen maila altuagoak zituztela adierazi zuten. Reobirus-infekzioak glutenarekiko ahoko tolerantzia apurtzen du eta TG2 aktibatzen.

Gainera, T zelulen fenotipoaren aldaketa eragiten du, T zelula erregulatzailerik periferiko izatetik dietaren antigenoren aurkako Th1 motako zelula izatera, eta aldaketa hau IFN-I eta IRF1ren menpeko mekanismo baten bidez gertatzen dela aipatzen da. Bestetik, Brigleb *et al*-en ikerketa batek reobirus-infekzioan ikusitako hantura-egoeraranzko aldaketa hori NK zelula aktibatuek eragiten dutela erakutsi zuen (Brigleb et al., 2022).

## 2.2. Birusen aurkako immunitatea

Birusen aurkako erantzun immunitarioa organismo ostalariak duen birusen kontrako lehen defentsa lerroa da. Ugaztunetan, birus-infekzioek *IFN* gene familiaren adierazpena eragiten dute zelula ostalarian. IFN ekoizpenak birusaren aurkako erantzuna aktibatzea dakar, birusaren erreplikazioa inhibitzeko interferonak estimulatutako geneak (*Interferon stimulated genes* edo ISG ingelesez) indusituz (Schmid et al., 2010; Schoggins & Rice, 2011). ISGek birusen aurkako jardura duten proteinak kodetzen dituzte, eta egoera basalean adierazten badira ere, birus-infekzioean adierazpena asko emendatzen da (Schoggins & Rice, 2011). ISG horiek IRF eta STAT familiako transkripzio-faktoreek erregulatzen dituzte, bai JAK-STAT bidezidorraren menpe baita modu independentean ere (Chiang & Liu, 2019; Schmid et al., 2010).

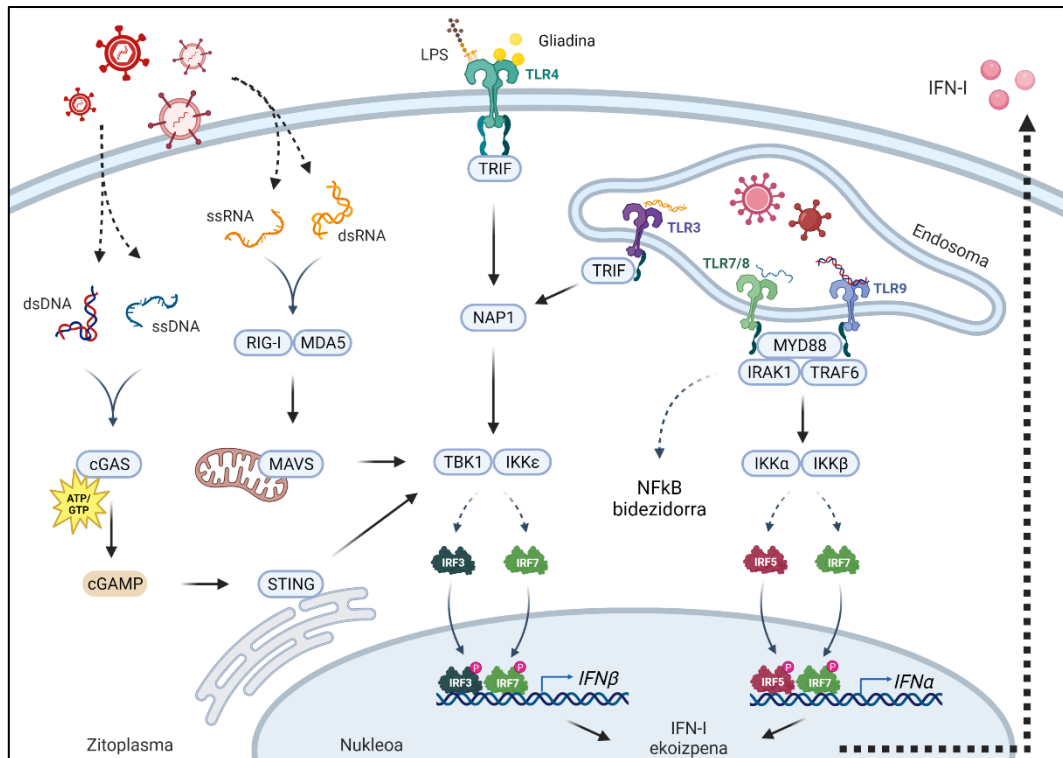
### 2.2.1. *I motako IFN seinaleztapen bidea eta IFN ekoizpena*

IFN proteinak 1950eko hamarkadan identifikatu ziren eta hiru familiatan sailkatzen dira: I, II eta III. Horien artean, I. motako IFNak dira IFN familia nagusia, eta hainbat *IFNa* genek eta *IFNb* gene bakarrak kodetzen dituzte. Hala ere, guztiak lotzen dira mintz zelularreko konplexu heterodimerikoa den interferon hartzailera (*IFN receptor* edo IFNR ingelesez), birusen aurkako funtzioak betetzeko (Negishi et al., 2018). Modu horretan, IFNek birus-infekzioen aurkako berezko erantzun immunitarioan paper garrantzitsua dute. Hala ere, haien aktibazio okerrak gaixotasun autoimmunitarioak garatzen lagun

dezake, lupus eritematoso sistemikoa esaterako (Banchereau & Pascual, 2006). Beraz, IFNen ekoizpena zorrotz erregulatuta egotea ezinbestekoa da.

Birus-infekzioetan, IFNak IFN-I bidezidorreko transdukzio-seinaleztapen zenbait urratsen ondorioz sintetizatzen dira (3. irudia). Seinaleztapen ur-jauzi hori PRR zitoplasmatico edota endosomikoen bidezko patogenoei asoziatutako patroio molekularren (*Pathogen-associated molecular patterns* edo PAMPs ingelesez) ezagutzearen ostean edo zitokinak beren hartzaileetara lotzean hasten da (Medzhitov & Janeway, 2000). Patroioak ezagutzeko hartzaileak (*Pattern-recognition receptor* edo PRR ingelesez), mintzetako Toll gisako hartzaileak (*Toll-like receptor* edo TLR ingelesez) eta RIG-I gisako hartzaile (*RIG-I like receptors* edo RLR) zitosolikoak barne, berezko erantzun immunitarioaren funtsezko faktoreak dira, interferon faktore erregulatuzaileen (*Interferon Regulatory Factor* edo IRF ingelesez) familiako transkripzio-faktoreak aktibatzen baitituzte.

Ugaztunetan, IRF transkripzio faktoreen familia IRF1-9 izena duten bederatzi kidek osatzen dute (Mancino & Natoli, 2016; Paun & Pitha, 2007). Bederatzi IRF horietatik, IRF3 eta IRF7 birus-infekzioen osteko *IFN* geneen indukzioan inplikatuak dauden transkripzio-faktoreak dira. IRF1 eta IRF5 ere inplikatuak daude birusen aurkako erantzunean, neurri txikiagoan bada ere (Negishi et al., 2006; Takaoka et al., 2005). IRF familiako proteinek paper kritiko eta askotarikoak betetzen dituzte mikrobioen ezagutzatik IFN eta hantura-zitokinen adierazpenerako bitarteko prozesuan (Ikushima et al., 2013).



**3. irudia.** IFN-I bidezidorraren irudi eskematikoa. Birusak zelula kutsa ditzake bere azido nukleikoak soilik zuzenean sartuz edo endosomen bidez birus osoak sartuz. Beraz, virus-infekzioek IFN-I ekoizpena seinaleztapen-bide desberdinetatik eragiten dute. Alde batetik, birus-partikuletatik eratorritako DNA edo RNA molekula zitoplasmatikoez IFN-I ekoizpena cGAS-STING eta RIG-I/MDA5-MAVSen bidez eragiten dute, hurrenez hurren, bi bide hauek TBK1/IKKε-n elkartzen direlarik. Harizpi bikoitzeko RNA (dsRNA) molekulak TLR3 hartzailen endosomalek ere ezagutzen dituzte eta TBK1/IKKε aktibatzen dute TRIF-NAP1 bidez. TLR4 hartzailen lotugaiak diren LPS eta gliadinak ere TRIF-NAP1 bidea aktibatzen dute. TBK1/IKKε-k IRF3 eta IRF7 fosforilatzen ditu, nukleorako translokazioa sustatuz, eta batez ere *INFB1* genearen adierazpena eraginez. Bestetik, TLR7/8 eta TLR9 hartzailen endosomalek harizpi bakarrek DNA (ssDNA) eta harizpi bikoitzeko DNA (dsDNA) ez-metilatuak ezagutzen dituzte, hurrenez hurren, eta IKKα/b aktibatzen dute. NFκB bidezidorra MyD88-TRAF6 bidez aktibatzen da ere. IKKα/b-k IRF5 eta IRF7 fosforilatzen ditu, nukleorako translokazioa sustatuz, eta batez ere *INFα* genearen adierazpena eraginez. BioRenderrekin sortutako irudia.

TLR seinaleztapena IRF proteinak aktibatzen bidezidorraren garrantzitsuenetako bat da (Medzhitov, 2001; Uematsu & Akira, 2007). TLR seinaleztapenaren bidezko erregulazioak bi bide ditu: alde batetik MyD88 proteina egokitzailearen menpeko bidea dago, eta bestetik TRIF proteina egokitzailearen menpeko bidea. Bi bideek transkripzio-faktore asko aktibatzen dituzte, IRFak barne (Kawai & Akira, 2006a; Negishi et al., 2018; Uematsu & Akira, 2007). Behin aktibatuta, IRFak DNAREN sekuentzia espezifikoekin lotu daitezke (ISRE bezala ere ezagutzen dira) eta IFN-I eta hantura-zitokinak kodetzen dituzten geneen transkripzioa dezakete (Aria Csumita et al., 2019; Tanaka et al., 1993).

TLR3 batez ere zelula barneko endosomen eta fagosomen mintzean aurkitzen da. TLR3k birusen RNA eta harizpi bikoitzeko RNA (*double strand RNA* edo dsRNA ingelesez) analogo sintetikoa den poly(I:C) ezagutzen ditu (Alexopoulou et al., 2001; Matsumoto & Seya, 2008). Aitzitik, TLR4 mintz zelularreko hartzailea da, zeinak bakterio gram-negatiboen lipopolisakaridoak (LPS) eta beste PAMP edo DAMP batzuk ezagutzen dituen (Y.-C. Lu et al., 2008; Negishi et al., 2012). TLR4k glutenetik eratorritako gliadina-peptidoak ere ezagutu ditzake (Palová -Jelínková et al., 2013). Bai TLR3k eta bai TLR4k TRIF proteina egokitzailea erabiltzen dute seinaleztapen ur-jauzian behera NAP1 eta TBK1 errekrutatzeke, eta IRF3 eta IRF7 fosforilazio bidez aktibatzeke (Kawai & Akira, 2005; Matsumoto & Seya, 2008; Perry et al., 2004). TLR3z gain, TLR7/8 eta TLR9 dira birusen PAMPak ezagutzeko endosometako PRR ezagunenak. TLR7/8 eta TLR9k birusen harizpi bakarreko RNA (*single strand RNA* edo ssRNA ingelesez) eta DNAREN metilatu gabeko CpG motiboak ezagutzen dituzte, hurrenez hurren (Chan et al., 2015; de Oliveira Mann & Hornung, 2021; Kawai & Akira, 2006b). TLR horiek MyD88 errekrutatzen dute IKKa edo IKKbren menpeko fosforilazioa eta IRF7 edo IRF5ren aktibazioa eragiteko (Balkhi et al., 2010; Bergstrøm et al., 2015). IRF7 TRAF6rekin ere elkartzen da bere auto-aktibaziorako (Honda K et al., 2005; Kawai et al., 2004).

Bestalde, RNA birus batzuk zitoplasman sartzen dira zuzenean, eta bertan RLR familiako RIG-I eta MDA5 kideek detektatzen dituzte (Kato et al., 2006; Yoneyama et al., 2005). Lotugaiekiko ezagutzak (batez ere dsRNArenak) RIG-I eta MDA5 mitokondrietara mugitzea eragiten du, eta bertan MAVSekin (IPS1 ere deitua) elkartzea dakar (Kawai & Akira, 2006a; H. Kumar et al., 2006; Q. Sun et al., 2006). Interakzio honek TBK1 eta IKK-e aktibatzeke eta IRF3 eta IRF7 fosforilatzeko beharrezkoa den seinale-transdukzioari hasiera ematen dio (Fitzgerald et al., 2003; Sharma et al., 2003). RLR-bidezko IFN-I geneen adierazpenaren antzera, IRF3k eta IRF7k zitosoleko DNA eta endosometako DNA edo RNA molekulen ezagutzaren ondorengo IFN-I indukzioan ere parte hartzen dute. cGAS

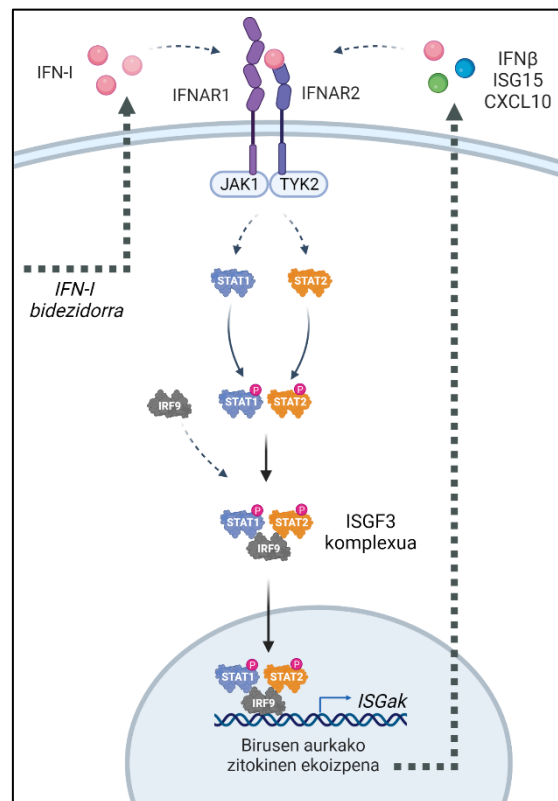
birusen DNARA lotzeak ATP eta GTPtik eratorritako cGAMPen ekoizpena katalizatzen du (Cai et al., 2014; L. Sun et al., 2013; J. Wu et al., 2013). cGAMP STING proteinarekin elkartu eta honen aktibazioa eragiten duen bigarren mezulari bat da. STINGek proteina egokitzailerik gisa jokatu du, zeinak TBK1-en menpeko IRF3 eta IRF7ren fosforilazioa sustatu duen (Ishikawa et al., 2009; Zhong et al., 2008).

Birus-infekzioek IRF3 eta IRF7ren fosforilazio espezifikoak eragiten dituzte. Fosforilazio honek IRF3 bere buruarekin edo fosforilatutako IRF7rekin dimerizatzea ahalbidetzen du, eta horrela CBP/p300 eta beste zenbait koaktibatzailek osatu duten konplexua eratzen da (Honda & Taniguchi, 2006; Yoneyama et al., 1998). Konplexu koaktibatzaile hau nukleora lekualdatzen da ondoren, eta IFN-I geneen promotoreetako ISRE sekuentziekin lotzen dira hauen transkripzioa sustatuz (Honda & Taniguchi, 2006). Horrela, interferon kantitate handiak ekoizten dira eta birusen aurkako erantzun egokia indusitzen da.

### 2.2.2. *JAK-STAT seinaleztapen-bidea eta ISGen ekoizpena*

Zelula mota ia guztiek erantzuten dituzte IFN-I bidezko birusen aurkako immunitate eraginkorarekin (Müller et al., 1994; Platanias, 2005). IFNak bere hartzaileekin lotzen direnean, IFNR-JAK dimerizazioa edo oligomerizazioa gertatu da, eta horrek aukera ematen du JAKen tirosinen hondarren transfosforilazioa ahalbidetzen du. Horrela, IFNRri lotutako JAK-STAT bidezidorraren seinale-transdukzioa hasten da, ISGren transkripzioa indusituta amaituko dena. IFN bere hartzaileari lotu eta JAKen fosforilazioa gertatu ostean, JAK aktibatuek IFNRren alde zitoplasmatikoen fosforilazioa eragiten dituzte, STAT proteinentzako lotura-gunak hornituz. Ondoren, JAK-STAT elkarrekintza gertatu da, eta STAT proteinen tirozina hondarrak fosforilatu dira. STAT1 eta STAT2 fosforilatuak STAT1/STAT2 heterodimeroa eratzea dakar, zeina IRF9rekin elkartu eta ISGF3 konplexua osatu duen. Gero, nukleora sartzen da ISGen adierazpena abiarazteko hauen promotoreetako ISREren sekuentzietara lotzean (Chiang

& Liu, 2019; Ivashkiv & Donlin, 2014; Negishi et al., 2018; Pestka et al., 2004; Schmid et al., 2010; Taniguchi & Takaoka, 2001) (4. Irudia).



**4. irudia.** JAK-STAT bidezidorraren irudi eskematikoa. IFN-I IFNRekin lotzen da eta JAK-TYK2 kinasak aktibatzen ditu, zeinak STAT1 eta STAT2 fosforilatu eta euren dimerizazioa sustatzen duten. IRF9 STAT1 eta STAT2rekin lotzen da eta ISGF3 konplexua eratzen da. ISGF3 konplexua nukleora lekualdatzen da eta ISGen adierazpena eragiten du. Horrela, IFNβ, ISG15 eta CXCL10 bezalako birusen aurkako zitokinak ekoizten dira, besteak beste. IFNβ IFNRekin lotu daiteke eta erregulazio atzeraelikatze positibo bat sortu. BioRender bidez sortutako irudia.

Hainbat ISGren birusen aurkako antibiralak ondo aztertu eta deskribatu dira. Adibidez, IFIT1-3, biperina eta Mx1ek birusaren erreplikazioa inhibitu dezakete (Schoggins & Rice, 2011). JAK2, STAT1, STAT2 eta IRF9, IFN erantzunak indartzeko JAK-STAT bidezidorreko seinaleak amplifikatzen dituzten beste ISG batzuk dira (Ivashkiv & Donlin, 2014). Gainera, RIG-I, cGAS, IRF5 eta IRF7 bezalako ISGek zelulak prestatu ditzakete birusen PAMPen ezagutza areagotzeko eta IFN adierazpen emendatua lortzeko (Schneider et al., 2014). IRF transkripzio-faktoreek hainbat ISGren adierazpena induzitu dezakete zuzenean, JAK-STAT bidezidorrak gaindi (Wu & Chen, 2014). Adibidez, IRF3k *ISG15* eta *SAMHD1*en adierazpena abiarazten du birusen aurkako erantzun

immunitarioaren lehen defentsa-mekanismo gisa (Maelfait et al., 2016; Morales & Lenschow, 2013). IRF7k ISG adierazpena ere erregulatu dezake IFN bitarteko seinaleztapenik ez dagoenean (Daffis et al., 2008; Schoggins & Rice, 2011).

### 2.2.3. *IRF7*

IRF familiak NFkB familiarekin batera eboluzionatu du (Hiscott, 2007; Nehyba et al., 2009). Ondorioz, ezaugarri batzuk partekatzen dituzte: bi familiak PRR berdinekin eta IKK bide beretik datozen seinaleen bidez aktibatzen dira; IFN-b moduko zitokinen erregulazioan batera jarduten dute, eta berezko erantzun immunitarioaren partaide garrantzitsuenak dira (Honda & Taniguchi, 2006; Iwanaszko & Kimmel, 2015; Tamura et al., 2008).

IRF familiako kideek antzekotasun nabarmena aurkezten dute N-muturreko DNARA lotzeko domeinu (DNA Binding Domain edo DBD ingelesez) kontserbatuari dagokionez. Domeinu hau triptofano bostekoan datza, eta DNARI lotzeko funtsezkoa da (Aria Csumita et al., 2019; Tanaka et al., 1993; Veals et al., 1992). C-muturrak, ordea, desberdinak dira IRF familiako kideen artean, kide bakoitzari funtzio ezberdinak esleitzeko. Orokorrean, kide guztiek IRF-lotura domeinu bat, nukleorako esportazio-sekuentzia bat, domeinu autoinhibitzaile bat eta PAMP bezalako seinaleei erantzuten dien domeinu bat dituzte (W. Chen & Royer, 2010). Seinaleei erantzuteko domeinuak fosforilazioa jasaten duten serina hondar gakoak ditu, patogenoek zelulak kutsatzean fosforilatzen direnak, IRF proteinen aktibazioa eraginez (Ikushima et al., 2013; Ning et al., 2011).

IRF proteinen artean, IRF3 eta IRF7 dira dsRNA birusen, hala nola errotabirusa eta reobirusa, aurkako erantzunean parte hartzen duten IRF familiako kide nagusiak. IRF3 konstitutiboki adierazten den arren, honen adierazpena zorrotz erregulatuta dagoen transkripzio-faktore bat da. Egoera basalean, konformazio inaktiboan egon ohi da zitoplasman, auto-inhibizio mekanismoen ondorioz (Qin et al., 2003; Yanai et al., 2018). IRF7 aktibatzeke prozesua IRF3renaren antzekoa da. Hala ere, IRF3ren aldean, IRF7 maila baxuetan adierazten da egoera basalean, baina birus-infekzioak gertatzen



direnean IFN-I bidezko erantzunen ondorioz, IRF7ren adierazpena asko emendatzen da modu autokrinoan eta atzeraelikatzeko positiboaren bitartez (Kawai et al., 2004; Litvak et al., 2012; Ning et al., 2011).

IRF7 infekzio ondorengo fase berantiarrean parte hartzen du, IRF3k ez bezala, birusen aurkako erantzun goiztiarrean jarduten baitu (W. Wu et al., 2020). Birus-infekzioen lehen fasean, zelulan maila baxutan dagoen IRF7 endogenoa fosforilatu eta aktibatzen da IFN-I seinaleztapen-bidearen bidez (Honda K et al., 2005; Honda & Taniguchi, 2006). Aktibatzean, IRF7k, IRF3, NFκB, c-Jun, AFT2 eta p300/CREBri lotzen den proteinarekin batera, transkripzioa areagotzen duen konplexua eratzen du eta *IFNB1* genearen promotorearekin lotzen da (Wathelet et al., 1998), IFNβ ekoizpena areagotuz eta, ondorioz, JAK-STAT seinaleztapen-bidea aktibatuz. IRF7 bera ISG bat da eta beraz, ISF3 konplexua IRF7ren promotorean kokatzen da IRF7ren sintesia areagotuz. Ondoren, IRF7 sintetizatu berria aktibatzen da eta IFN induitzen du, gero eta IRF7 eta IFN gehiago sortzeko (Marie et al., 1998; Ning et al., 2011; Sato et al., 1998). Horrela, zelularen IRF7 iturri nagusia den erregulazio positiboko atzeraelikatzeko sortzen da.

IRF7 IFN-I erantzunaren erregulatzailer nagusitzat jotzen da, birus-infekzioen fase berantiarrean bidezidor hori aktibatuta mantentzearen funtzio kritikoa betetzen baitu (Honda K et al., 2005). Ondorioz, IRF7ren erregulazio egokia funtsezkoa da erantzun immunitario egokia lortzeko. Izan ere, IRF7 maila altuak etengabe izateak gehiegizko erantzun immunitarioa ekar lezake, baita egoera basalean ere, eta horrek, era berean, autoimmunitatearen garapena eragin dezake. IRF5 da orain arte gaixotasun autoimmunitarioei dagokionez gehien aztertutako den IRF familiako kidea, eta bere sekuentzian lupus eritematoso sistemikoarekin lotura duten polimorfismo asko aurkitu dira; hala ere, aldaera hauen funtzionaltasuna ez da oraindik ikertu (Banchereau & Pascual, 2006). Ordea, ezer gutxi dakigu IRF7k autoimmunitatean duen inplikazioaz.

Proteina mailako IRF7ren erregulazioa sakon aztertu da eta aski ezaguna da. Besteak beste TBK1, IKKe eta IKKa bidezko fosforilazioaz aktibatzen dela jakina da (Hemmi et al., 2004; Iwamura et al., 2001; Sharma et al., 2003). Hala ere, fosforilazioaz gain IRF7k itzulpen osteko beste eraldaketa batzuk ere jasaten ditu. Eraldaketa horien artean ubikitinazioa, sumoilazioa eta azetilazioa daude. Ubikitinazioak degradazioari (Higgs et al., 2010) eta aktibazioari (Ling et al., 2019; Ning et al., 2008) eragiten die, ubikitinazio motaren arabera. Sumoilazioak (Kubota et al., 2008) eta azetilazioak (Caillaud et al., 2002), bestetik, IRF7ren transkripzioan duen jardueran eta DNArri lotzeko duen gaitasuna kaltetzen dituzte, hurrenez hurren.

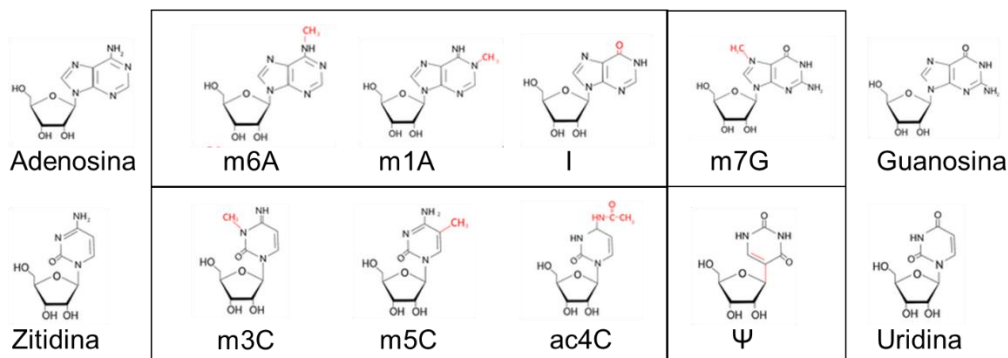
IRF7ri eragiten dioten itzulpen osteko eraldaketa asko identifikatu diren arren eta IRF7 proteina mailatan duen eragina deskribatu den arren, proteinen sintesia kontrolatzeko bi mekanismo baino ez dira deskribatu. Alde batetik, *IRF7* mRNAren itzulpena 4E-BP1/2 itzulpen-errepresoreek erreprimitzen dute eIF4F konplexuaren eraketa inhibitzen dutenean (Colina et al., 2008). Bestalde, OASL1ek *IRF7* mRNAren itzulpena inhibitzen du IRF7ren 5'UTRra lotuz eta seguraski 43Sren itzulpenaren aurre-abiarazte konplexuaren eskaneatzea eragotziz (M. S. Lee et al., 2013).

Azkenik, IRF7ren transkripzio mailako erregulazioari buruz ezer gutxi deskribatu da. Giza *IRF7* genea 11p15.5 kromosoman dago, eta lau isoforma edo moztitsasketa-aldaera natural kodetzen ditu (L. Zhang & Pagano, 2002). *IRF7*ren promotorean, TATA kaxaren alboan, CpG uharte bat dagoela uste da. CpG uharte metilatuta dago giza fibroblastoetan, eta IRF7ren promotorearen metilazio honek genea isilaraztea dakar zelula hauetan (R. Lu et al., 2000). *IRF7* isilarazteko beste mekanismo epigenetiko bat ere deskribatu da, non FOXO3 transkripzio-faktorea NCOR2 eta HDAC3rekin elkartzen den eta *IRF7*ren promotorerara errekrutatzen dituen, histonen deazetilazioaren ondorioz kromatina-egitura itxia mantentzeko (Litvak et al., 2012).

Makineria epitranskriptomikoa, eta zehazkiago m6A makineria, *IRF7*ren erregulazioan inplikaturik dago ere, nahiz eta m6A markarekin zerikusirik ez izan. YTHDF3 m6A irakurlea PABP1 eta eIF4G2rekin elkartzen da FOXO3 proteinaren sintesia sustatzeko, FOXO3 mRNAko itzulpen-hastapeneko eskualdera lotuz (Y. Zhang et al., 2019). Horrela, zeharka bada ere, YTHDF3k *IRF7*ren adierazpenari eragiten dio. Hala ere, oraindik ez da azaldu m6A marka epitranskriptomikoak *IRF7*n izan dezakeen eragin zuzena.

### 3. Epitranskriptomika

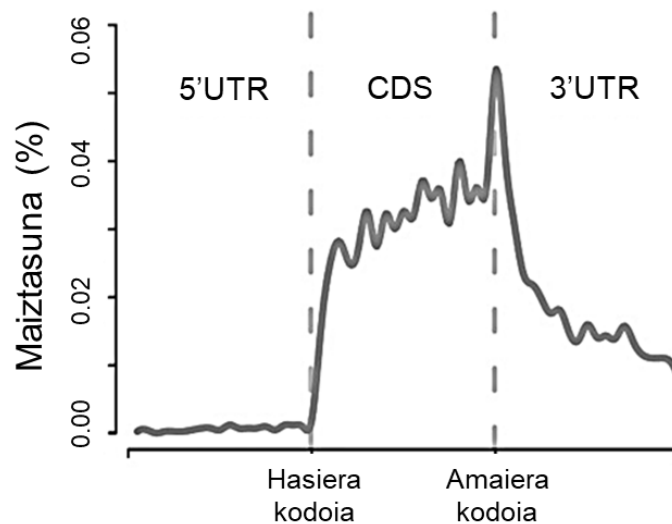
Epitranskriptomika RNA transkribatu osteko eraldaketak aztertzen dituen epigenetikaren adarra da. Orain arte, 150 eraldaketa kimiko baino gehiago identifikatu dira RNA molekuletan (Kumar & Mohapatra, 2021; Mathlin et al., 2020). Gehienak kodetzen ez diren RNA txikietan gertatzen dira, hala nola, transferentziako RNA (ingelesez transfer RNA edo tRNA) eta RNA erribosomikoan (ribosomic RNA edo rRNA) (Machnicka et al., 2013; Schwartz, 2016). Hala ere, marka epitranskriptomikoak mRNA eta lncRNA molekuletan ere aurkitu daitezke, besteak beste, m6A (Dominissini et al., 2012), m1A (Dominissini et al., 2016), inosina (Slotkin & Nishikura, 2013), m7G (Furuichi & Sekiya, 2015), m3C (Luang Xu et al., 2017), m5C (Hussain et al., 2013), ac4C (Arango et al., 2018) eta pseudouridina (Simen Zhao & He, 2015) (5. irudia). Horien artean, m6A da zenbait espezie eukariotoen (esaterako, legamia, landare, euli eta ugaztunak) mRNA molekuletako transkripzio osteko eraldaketa nagusia (Desrosiers et al., 1974; Schwartz, 2016; Yue et al., 2015). Azken hamarkadan sakon aztertu da eta egoera osasuntsuetan zein gaixotasunetan duen inplikazioa deskribatu da.



**5. Irudia.** mRNA eta lncRNA molekuletako aldaketa epitranskriptomiko nagusien formula kimikoak. Aldaketa kimikoak gorrix nabarmenduta daude eta aldamenean, aldatu gabeko RNA baseak ageri dira. (Mathlin et al., 2020) artikulutik moldatutako irudia.

### 3.1. N<sup>6</sup>-methyladenosina (m6A)

m6A aldaketa, adenosina (A) nukleotidoari gehitzen zaion metilo talde batean datza. Metilo talde gehigarri hori DRACH moduan ezagutzen den kontsentsuzko sekuentzian kokatzen da, non D = A, G edo U; R = A edo G, eta H = A, U edo C diren (Dominissini et al., 2012; Linder et al., 2015). m6A aldaketa kimikoa 1970eko hamarkadan aurkitu zen lehen aldiz (Desrosiers et al., 1974), baina haren funtzioa eta zelula-prozesuetan duen papera ez zen ezagutu duela 10 urte arte, bereizmen handiko sekuentziazio-, mapaketa- eta kuantifikazio-technikak garatu arte, hain zuzen. Orain arte, 10.000 m6A motibo baino gehiago baliozkotu dira giza RNA transkriptoen %25 baino gehiagotan, eta batez ere exon luzeetan, amaiera kodoien inguruan eta 3'UTRtan kokatzen direla frogatu ahal izan da (Meyer et al., 2012) (6. Irudia).



**6. irudia.** m6A aldaketa kimikoaren maiztasuna eta banaketa mRNA molekuletan zehar. (Z. Zhang et al., 2019) artikulutik moldatutako irudia.

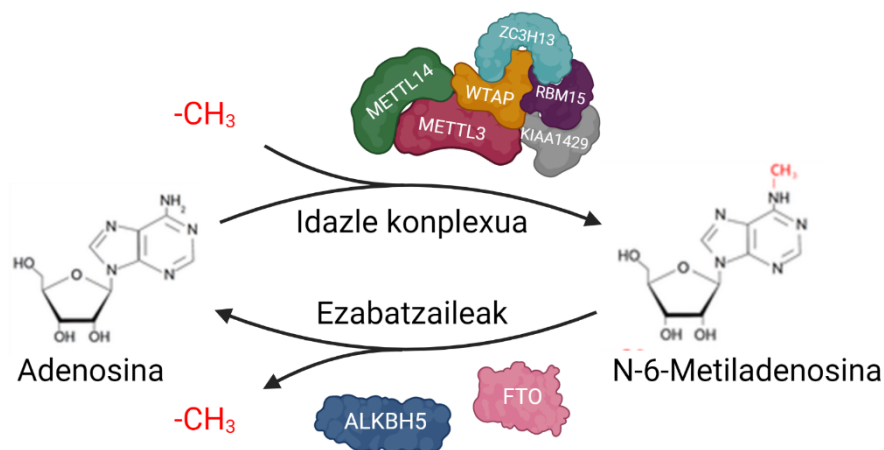
Ikerketa ugari aztertu dute eraldaketa honek mRNA molekulen metabolismoan dituen ondorioak. Gaur egun, jakina da m6Ak RNAREN konformazioa, egitura (N. Liu et al., 2017) eta egonkortasuna (Huang et al., 2018; C. Tang et al., 2017; X. Wang et al., 2014) alda ditzakeela, mRNAren heltze-prozesuan eragin dezakeela, *splicing* edo moztitsasketan parte hartuz eta poliadenilazio alternatiboa bultzatuz (C. Tang et al., 2017; Xiao et al., 2016);

eta nukleoko prozesamendua eta mRNA molekulen nukleo-esportazioa areagotu ditzakeela (Lesbirel & Wilson, 2019; Roundtree et al., 2017). Gainera, m6Ak itzulpen eta mRNAren endekapen prozesuetan ere parte hartzen du (A. Li et al., 2017; Mao et al., 2019; Meyer et al., 2015; Shi et al., 2017; X. Wang et al., 2015; Y. Yang et al., 2017).

mRNAren metabolismoan funtsezko faktorea izateaz gain, m6A eraldaketak zeluletan gertatzen diren hainbat prozesutan ere funtzio garrantzitsua betetzen du, besteak beste, bereizketa eta birprogramazio zelularrean, ziklo zelularren erregulazioan eta erritmo zirkadianoaren mantentzean (Fustin et al., 2013; Geula et al., 2015; H. Luo et al., 2021). Gainera, m6A estres egoerei aurre egiteko zelularen erantzunean, erantzun immunitarioaren erregulazioan eta autoimmunitatean inplikatur dago ere (Bechara & Gaffen, 2021; Lou et al., 2021; J. Luo et al., 2021; Shulman & Stern-Ginossar, 2020; L. Tang et al., 2021).

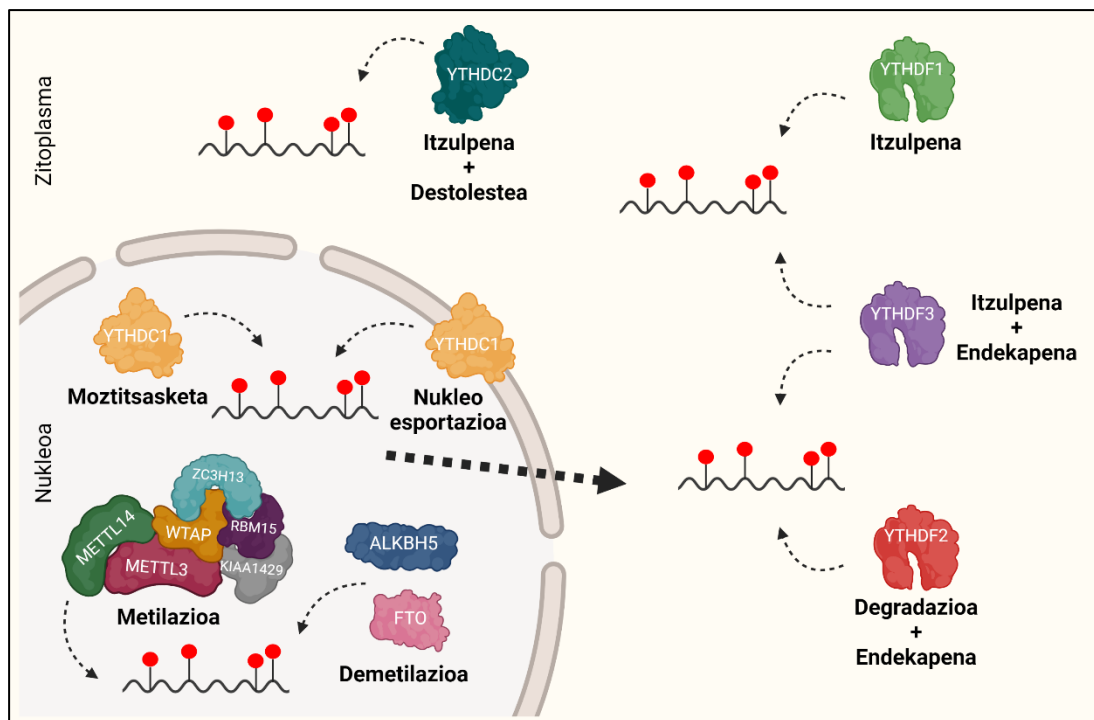
### 3.2. m6A makineria

m6A eraldaketa dinamikoa da, ez iraunkorra, eta m6A makineriak erregulatzen du (7. irudia).



**7. Irudia.** m6A aldaketa epitranskriptomikoa m6A idazle konplexuak adenosina nukleotidoan metilo talde bat gehitzean sortzen da. M6A ezabatzaileek, ordea, m6A marka kentzen dute RNAren metilazioa dinamikoa izatea eraginez. BioRenderrekin sortutako irudia.

Makineria honako hauek osatzen dute: metil transferasek edo idazleek, demetilasek edo ezabatzaileek, eta m6A marka ezagutu eta RNARA lotzen diren proteinek edo irakurleek. Hauek m6A marka kodetzen edo *idazten*, kentzen edo *ezabatzen*, edota deskodetzen edo *irakurtzen* duten proteinak dira, hurrenez hurren (Maity & Das, 2016; Y. Yang et al., 2018) (8. irudia).



**8. Irudia.** m6A makineriaren eta hauek zelulan duten kokapen nagusiaren irudi eskematikoa. Haien funtzioa proteina edo proteina multzo bakoitzaren azpian edo aldamenean adierazita dago. BioRenderrekin sortutako irudia.

### 3.2.1. m6A idazleak

Metilo taldea adenosina erribonukleotidoetan gehitzen duten proteina familiari m6A idazle deritze. m6A metiltransferasa konplexu baten bidez gehitzen da RNA molekuletan. Metil transferasa edo idazle-konplexua honako hauek osatzen dute: METTL3, METTL14, WTAP, KIAA1429, RBM15 eta ZC3H13.

METTL3 idazle-konplexuaren azpiunitate katalitikoa da, eta nukleoan dago (X. Wang et al., 2017). METTL3k batez ere nukleoan betetzen du bere funtzioa, non metil transferasa

aktibitatea handiagoa dela egiaztatu den (Harper et al., 1990). Hala ere, metil transferasa aktibitatearekin zerikusirik ez duten beste prozesu batzuetan ere parte har dezake; izan ere, METTL3 zitoplasmara ere pasa daiteke eta itzulpenean parte hartu (Lin et al., 2016). METTL3-rik ez duten saguak enbrioien lehen fasean hiltzen dira, honek enbrioia-aren garapenean eta bizitzaren lehen faseetan duen garrantzia adierazten duelarik. Hain zuzen ere, METTL3k enbrio-igarapenaren modulazioan, zelulen birprogramazioan eta espermatogenesisian duen funtzioa deskribatu da (T. Chen et al., 2015; Geula et al., 2015; Xu et al., 2017). METTL3k T zelulen homeostasia eta endoteliotik ehun hematopoietikorako trantsizioan ere parte hartzen du (T. Chen et al., 2015; Geula et al., 2015; Xu et al., 2017).

METTL3k heterodimero egonkorra osatzen du METTL14rekin. METTL14 m6A idazle-konplexuko beste osagai bat da, zeinak METTL3 RNA molekulekin lotzeko aldazio gisa jokatzen duen, METTL3ren jardura katalitiko aktibatuz eta indartuz (P. Wang et al., 2016). Horrela, nahiz eta METTL14k ez duen zuzenean katalizatzen metilo taldearen transferentzia, METTL3 bezain erabakigarria da RNAREN metilazioan. Azken hori METTL14 delezioak berresten du, izan ere METTL14en faltak enbrioien zelula amen autoberritzea blokeatzen du, eta kasu hauetan enbrioia-aren garapenaren akatsak eta gametogenesi okerra gertatzen dira, METTL3 falta denean bezala (Y. Wang et al., 2014).

WTAPek METTL3 eta METTL14rekin bat egiten du, hiruak batera metil transferasaren konplexu katalitiko nagusia osatuz (Kobayashi et al., 2018; Ping et al., 2014). WTAPek ez du metil transferasa aktibitatearik, baina beharrezkoa da m6A idazle-konplexuaren nukleoko kokapen egokirako (Ping et al., 2014).

KIAA1429 (VIRMA ere deitua) eta RBM15 (eta/edo RBM15B paralogoa) METTL3/METTL14/WTAP konplexuarekin lotzen dira, eta m6A idazle-konplexua mRNA edo lncRNA sekuentzien kokapen zehatzetara bideratzen dute, m6A metilazioaren espezifikotasuna bermatzeko beharrezkoak direla iradokiz (Patil et al., 2016; Schwartz et



al., 2014; Yue et al., 2018). Bestalde, ZC3H13k WTAPen eta RBM15en arteko egokitzailerik gisa jarduten duela egiaztatuta da saguetan eta eulietan (Knuckles et al., 2018).

### 3.2.2. m6A ezabatzaileak

m6A ezabatzaileak demetilasa jardueran duten proteinak dira, eta RNA molekuletako m6A marketatik metilo taldea kentzen dute. Hauen aurkikuntza oso garrantzitsua izan zen epitranskriptomikaren alorrean, lehen aldiz frogatu baitzen RNA molekulen transkripzio osteko eraldaketa itzulgarrien ebidentzia. Oraingoan bi m6A ezabatzaile baina ez dira ezagutzen: FTO eta ALKBH5 (Jia et al., 2011; G. Zheng et al., 2013).

FTOk m6A markak demetilatzen ditu, hau da, metilo taldea kentzen du, eta bere inhibizioak mRNA molekulen m6A maila orokorrak igotzea eragiten duela frogatu da (Su et al., 2018). m6A markez gain, FTOk ere beste marka batzuk ezagutzen ditu, adibidez m6Am, eta beraz ez da m6Aren demetilasa espezifikoia (Zou et al., 2016). FTOk mRNAren heltze prozesuan parte hartzen du, hala nola, moztitsasketan eta poliadenilazio alternatiboan (Bartosovic et al., 2017; Zhao et al., 2014).

ALKBH5en demetilasa jardueran FTOren antzekoa da. Hala ere, badirudi ALKBH5ek m6A markak soilik ezagutzen dituela, eta ezagutza hau sekuentziaren menpekotik delarik. Izan ere, ssRNA molekuletan m6Aren kontsentsuzko sekuentziarekiko joera azaldu du, beste edozein metilatutako nukleotidoen aldean (Zou et al., 2016). ALKBH5 ehun gehienetan adierazten da, testikuluetan adierazpen bereziki altua duelarik. Hain zuzen ere, espermatoogenezian eta ugalkortasunean eragina duela ikusi da saguetan (C. Tang et al., 2017; G. Zheng et al., 2013). Gainera, ALKBH5ek zeregin garrantzitsua du birus-infekzioen aurkako erantzun immunitarioan makrofagoetan (Y. Liu et al., 2019; Q. Zheng et al., 2017).

### 3.2.3. m6A irakurleak

m6A irakurleak RNArak lotzen diren eta bertako m6A metilazio markak ezagutzen dituzten proteinak dira, zeinak RNArekin lotzen diren molekula hauen prozesamenduan duten funtzioa gauzatzeko. YTH proteina familiako kideak, YTHDF1-3 eta YTHDC1-2 barne, gehien ikertu diren m6A irakurleak dira eta haien funtzio molekularrak deskribatu dira (9. irudia) (Zhen et al., 2020).

YTHDF1 zitoplasman dago, eta itzulpen-hastapeneko makineriakin elkarreragiten du m6A markak dituzten mRNA molekulen itzulpenaren eraginkortasuna emendatzeko (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021; X. Wang et al., 2015; Zong et al., 2021). YTHDF1-RNA elkarrekintza eremuek, m6Aren sekuentzia adostuek mRNA molekuletan duten sakabanaketarekin bat datoz, YTHDF1ek RNArekin lotzeko duen sekuentzia-espezifikotasuna berretsiz (X. Wang et al., 2015).

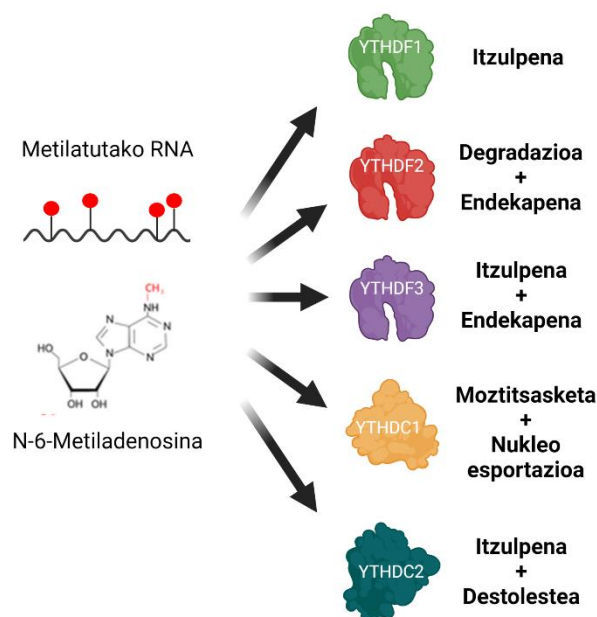
YTHDF2 ere zitoplasman dago. Hala ere, bereziki P gorputzetan kokatzen da mRNA molekulen gainbehera eragiteko (X. Wang et al., 2014). YTHDF2k CCR4-NOT deadenilasa-konplexua errekrutatzen du eta, horrela, m6A duten mRNA eta lncRNAen degradazioa azkartzen du (Du et al., 2016).

YTHDF3-k paper bikoitza du RNAREN prozesamenduan. Batetik, frogatu da YTHDF1ekin elkartzen dela proteinen sintesia eragiteko (A. Li et al., 2017). Bestalde, YTHDF2rekin ere lotzen da, eta horrela mRNAren endakapenean eta degradazioan parte hartzen du (Shi et al., 2017).

YTHDC1 da nukleoan dagoen YTH familiako kide bakarra (B. Zhang et al., 2010). Gutxienez bi rol desberdin deskribatu dira YTHDC1erako, elkartzen den proteinen arabera. YTHDC1ek moztitsasketa-faktoreak errekrutatzen ditu, SR proteinak kasu, moztitsasketa prozesua blokeatzen du, mRNA eta lncRNA molekuletan exoien barneratzea sustatuz (Xiao et al., 2016). YTHDC1 NXF1ekin eta SRSF3rekin ere lotzen

da, eta mRNA eta lncRNAen esportazio nuklearra bultzatzen du, m6A duten mRNA molekulak nukleotik kanpora lekualdatzea sustatuz (Roundtree et al., 2017).

YTHDC2 YTH proteina familiako kiderik handiena da, 160 kDa-eko pisu molekularrekin. Izan ere, YTH eta RNArekin lotzeko domeinuz gain, beste bi helikasa domeinu ditu. YTHDC2 da YTH familiako kideen artean helikasa aktibitatea duen bakarra (Hsu et al., 2017; Wojtas et al., 2017). Ezaugarri berezi hori dela eta, RNA molekulen bigarren mailako egitura aldatzeko gai da, m6A marken arabera (Tanabe et al., 2016; Wojtas et al., 2017). m6A eraldaketek erribosomaren pausatzea eragiten dute, A nukleotido metilatuan geldiaraziz, eta beraz itzulpena moteldu eta eraginkortasuna murrizten dute (Choi et al., 2016; Mao et al., 2019). Hala ere, nahiz eta itzulpenaren eraginkortasuna txikiagoa den m6A markak dituzten mRNA molekuletan, m6A markak kenduz gero haien itzulpena eten egiten da (Mao et al., 2019). Hau, neurri batean, YTHDC2ren aktibitateagatik gertatzen da, YTHDC2k m6A markak ezagutu eta RNAren bigarren mailako egitura zabaltzen duelako, orokorrean mRNA metilatuen itzulpena areagotuz. Horrela, YTHDC2k m6Adun mRNAen itzulpenean eragiten du zeharka (Mao et al., 2019).



**9. irudia.** m6A irakurleek m6A markak ezagutu eta mRNA molekulen metabolismoa erregulatzen dute, haien patua zehaztuz. BioRenderrekin sortutako irudia.

### 3.3. m6A eta birus-infekzioak

mRNA eta lncRNA molekulen antzera, birusen RNA molekulek ere m6A eraldaketak dituzte (Brocard et al., 2017; Gokhale et al., 2016; Kennedy et al., 2017; Tsai & Cullen, 2020). Gainera, jakina da birusek zelula ostalariaren zenbait generen adierazpena alda dezaketela beren onurarako. Testuinguru honetan, aldaketak atzeman dira m6A makineriako kideen artean birus-infekzio batzuen ondoren, m6A aldaketa birusen bizi-zikloaren funtsezko erregulatzailea izan daitekeela aditzera emanez. Adibidez, 71 enterobirusak (EV71) eta C hepatitisaren birusak (HCV) m6A motiboak dituzte genomak, beren bizi-zikloari modu ezberdinean eragiten diotenak. Alde batetik, METTL3 eta METTL14 gainadierazita daude EV71 infekzioan zehar, ziurrenik EV71ek bultzatuta, bere erreplikazioa areagotzeko (Hao et al., 2019). Bestalde, YTHDF irakurleak zitoplasmatik adiposometara lekualdatzen dira HCVren infekzioan zehar, eta HCV genomarekin elkartzen dira, m6A marken arabera, eta RNA molekulak birus-partikula berrietan sartzea eragozten duten. YTHDF2-HCV RNA molekulen arteko lotura honen ondorioz, birus muntaketa eta HCV partikulen ekoizpena oztopatzen dira (Gokhale et al., 2016).

Birusen aldaketa epitranskriptomikoen erantzun immunitarioa ekiditeko mekanismo gisa joka dezaketela iradoki da. Izan ere, m6A eraldaketa duten RNA molekulek ezin dituzte TLRak eta berezko sistema immunitarioa aktibatuta, eta bai ordea, eraldaketarik gabeko RNA molekulek (Karikó et al., 2005). Era berean, RIG-I RNA birala antzeman dezake IFN-I bidearen indukzioaren bidezko birusen aurkako erantzun immunitarioa aktibatzeko, baina m6A duten birusen RNA molekulek ez dute erantzun hori pizten, birusek berezko sistema immunitariotik ihes egitea ahalbidetuz (Durbin et al., 2016; M. Lu et al., 2020).

### 3.4. m6A erantzun immunitarioan

m6A eraldaketak erantzun immunitarioaren erregulazioan parte hartzen du, bai birus-infekzioen aurkako berezko erantzun immunitarioan, baita autoimmunitatean ere.

IFN-I bidezidorrak berebiziko garrantzia du birusen aurkako erantzunean, ISGen adierazpena eta erantzun immunitarioa aktibatzea eragiten duten zitokinak sortzea eragiten duelarik (Negishi et al., 2018; Schoggins & Rice, 2011). Beraz, honen adierazpenak kontrolpean egon behar du. Birusen aurkako transkripto batzuk m6A aldaketak dituztela eta m6A menpeko mekanismoek erregulatzen dituztela egiaztatu da (McFadden et al., 2021; Winkler et al., 2019; Q. Zheng et al., 2017). m6A markek *IFNB1*en transkripzioa modu negatiboan erregulatzen dute METTL3 eta YTHDF2 bidez, hauen aktibitatearen galerak *IFNB1* mRNAren egonkortasuna handitzen baitu (Winkler et al., 2019). *TRAF3*, *TRAF6* eta *MAVS* mRNA molekulek ere m6A markak dituzte euren 3'UTRetan. Kasu hauetan, m6A metilazioa beharrezkoa da birusen aurkako erantzun egokia lortzeko. Izan ere, birus-infekzioetan ALKBH5ek m6A markak ezabatzen dituela ikusi da, hauek nukleotik zitoplasmara lekualdatzea blokeatuz eta ondorioz, birusen aurkako berezko erantzun immunitarioa eragotziz (Q. Zheng et al., 2017). Era berean, *IFITM1* mRNAren itzulpena m6A metilazioa eta METTL3 eta METTL14ren menpekoa da, hauek areagotzen dutelarik (McFadden et al., 2021).

Autoimmunitatearen testuinguruan, m6Ak T zelulen homeostasian parte hartzen du, IL-7/STAT5/SOCS bidezidorrean eragina baitu (H. B. Li et al., 2017; J. Yang et al., 2019). SOCS proteina familia JAK-STAT seinaleztapenaren proteina inhibitzaileek osatzen dute, SOCS1-3 mRNAk kodetuta. SOCS1-3 mRNA hauen adierazpena m6A-mendeko mekanismoek erregulatzen dute, zeinak degradazioa sustatzen duen. Horrela, SOCS1-3 desagertzean JAK/STAT bidea aktibatzen da eta T zelula heldugabeen proliferazioa eta bereizketa hasten da (H. B. Li et al., 2017).

Zenbait ikerketek patologia autoimmuneak dituzten pertsonen m6A makineriako kideen adierazpena aldatua dutela jakinarazi dute, hala nola lupus eritematoso sistemikoa eta artritis erreumatoidea duten pazienteek (Wardowska, 2021). Hala ere, oraindik gutxi dakigu m6A aldaketak gaixotasun autoimmuneetan duen efektuari buruz. GZari dagokionez, Olazagoitia-Garmendia *et al*-en lana da orain arte m6A eta GZaren patogenesisiaren arteko erlazioaren berri ematen duen ikerketa ezagun bakarra, non XPO1/NFkB/IL8 ardatzaren erregulaziorako glutenaren eta m6Aaren mendeko mekanismoa deskribatzen den (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021).

***HIPOTESIA ETA HELBURUAK***

Ikerketa honen hipotesia da reobirusen infekzioek GZaren garapenean parte hartzen dutela m6A bitarteko mekanismoen bidez, eta RNA birus enteriko horrek aurretik infektatutako pazientetan, glutenak IFN-I bidezidorra berraktibatu dezakeela, birusen aurkako transkribatuen m6Aren menpeko erregulazioaren bitartez.

Lan honek lau helburu nagusi ditu hipotesi hau frogatzeko:

1. Reobirusak GZa garatzeko birus-eragile abiarazle berri gisa aztertzea.
  - a. Giza serumean reobirusaren aurkako antigorputzak kuantifikatzeko teknika bat garatzea.
  - b. Reobirus-infekzioen eta GZaren garapenaren arteko lotura ebaluatzea.
2. Birusen aurkako erantzun immunitarioak GZaren patogenesisian parte hartzen duen zehaztea.
  - a. Birus-infekzioekin zerikusia duten hantura-zitokinen mailak konparatzea gizabanako zeliako eta ez-zeliakoetan.
  - b. Berezko immunitatearen erregulazioan inplikaturako faktoreak identifikatzea.
3. m6A metilazioak GZaren patogenesisian duen papera ulertzea.
  - a. m6A metilazio mailak konparatzea gizabanako zeliako eta ez-zeliakoetan.
  - b. m6A makineriako kideek GZan duten inplikazioa ikertzea.
4. Hesteetako birus-infekzioen eta glutenaren kontsumoaren antzeko *in vitro* eredu bat sortzea.
  - a. Ingurumen-faktore horiek m6A makineriako kideen, hantura-zitokinen eta berezko erantzun immunitarioarekin erlazionaturako geneetan duten eragina aztertzea.
  - b. Birus-infekzioen eta GZaren arteko balizko lotura ebaluatzea, hantura eragiten duten m6A-bitarteko mekanismoen bidez.



***MATERIAL ETA METODOAK***

## 1. Materialak

### 1.1. Giza laginak

Gaixotasun zeliakoa (GZ) Gastroenterologia Pediatrikoko Hepatologia eta Nutrizioko Europako Elkartearen (*European Society of Pediatric Gastroenterology Hepatology and Nutrition* edo ESPGHAN ingelesez) arabera diagnostikatu zen, errekrutatzeke unean indarrean zeuden irizpideen arabera. Irizpide horiek honako hauek ziren: gliadinaren, endomisioaren (anti-EMA) eta transglutaminasaren (anti-TGA) aurkako antigorputzen determinazioa eta baita konfirmaziorako heste-meheko biopsia ere (Husby et al., 2012).

Odol periferikoko serum laginak GZarekin lotutako antigorputzen neurketarako bildu ziren eta -80 °C-tan gorde ziren erabili arte. Erabilitako giza serum laginen informazioa

1. Taulan laburbilduta dago.

1. Taula. Erabilitako giza hesteetako biopsia laginen pazienteei buruzko xehetasunak.

Dx	Lagin kopurua	Adina , (Batezbestekoa ± Desbideratze estandarra)	Sexua	Serologia zeliakoaren positibotasuna
Zeliakoak	n = 44	5.5 ± 3.6	Emakumeak 59.1%	100%
			Gizonak 40.9%	
Ez-zeliakoak (Kontrolak)	n = 44	9.6 ± 2.7	Emakumeak 47.7%	0%
			Gizonak 52.3%	

Pertsona bakoitzaren duodeno distaleko biopsia zatiak ohiko diagnostikorako endoskopia saioetan lortu ziren, gurasoen baimen informatua lortu ondoren. Pazienteetako inork ez zuen beste gaixotasun immunologiko konkomitanterik. Kontrol

taldeko kide batek ere ez zuen heste meheko hanturarik biopsia egitean. Giza hesteetako biopsia laginen informazioa 2. Taulan laburbilduta dago.

**2. Taula.** Erabilitako giza serum laginen pazienteei buruzko xehetasunak.

Dx	Lagin kopurua	Adina (Batezbestekoa ± Desbideratze estandarra)	Sexua	Serologia zeliakoaren positibotasuna	GZrako arrisku HLA-ren positibotasuna	Marsh sailkapena (0-3)
Zeliako aktiboak	n = 16	5.7 ± 4.2	Emakumeak 58.3%	100%	HLA-DQ2 83.3%	3 – 100% ⇒ 3a – 250 %
			Gizonak 41.7%		HLA-DQ2/DQ8 16.7%	⇒ 3b – 33.3% ⇒ 3c – 41.7%
Zeliakoak glutenik gabeko dietan	n = 13	2.0 ± 0.7	Emakumeak 66.7%	0%	HLA-DQ2 72.7%	0 – 90.9%
			Gizonak 33.3%		HLA-DQ2/DQ8 27.3%	1 – 9.1%
Ez-zeliakoak (Kontrolak)	n = 16	8.1 ± 3.6	Emakumeak 68.8%	0%	N/A	0 100%
		Gizonak 31.3%				

### 1.2. Zelulak eta tratamenduak

HCT-15 hesteetako zelula-lerroa (Sigma-Aldrich, Poole, UK (#91030712) %10 FBS (Millipore, Burlington, MA, AEB #S0115), 100 unitate/ml penizilina eta 100 µg/ml estreptomizinarekin (Lonza, 17-602E) osatutako RPMI medioan (Lonza, 12-115F) kultibatu zen.

#### 1.2.1. PIC+PTG in vitro ereduak

Birus infekzioa simulatzeko, PIC sintetikoa (InvivoGen, San Diego, CA, AEB) erabili zen 1,5 µg/ml-ko amaiera-kontzentrazioan, eta Lipofektamina-2000 (Invitrogen, #11668027) erabilia transfektatu zen zeluletan.

Gluten kontsumoaren simulaziorako, pepsina eta tripsinarekin digeritutako gliadinarekin (PTG) estimulatu ziren zelulak, 1,5 mg/ml-ko amaiera-kontzentrazioan.

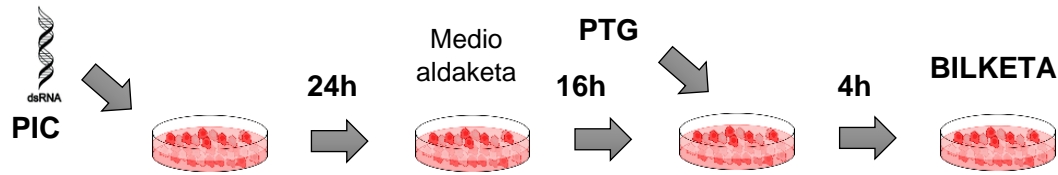
#### 1.2.1.1. Endotoxinarik gabeko PTGren prestaketa

PTGa pepsina eta tripsinaren digestio entzimatiakoaren bidez prestatu zen, aurretik deskribatutako pausuak jarraituz (Mendoza-Gomez et al., 2022). Lehenik, 5 g gliadina (Sigma-Aldrich, #G3375) 50 mg pepsinarekin (Sigma-Aldrich, 6887) eta nahatu eta 0,2 M HCl 50 ml-tan disolbatu zen, eta gau osoan zehar 37 °C-tan mugimendu arinean inkubatu zen. Ondoren, 50 mg tripsina (Sigma-Aldrich, #T9201) pepsinaz digeritutako gliadinari gehitu zitzaion, zeina aldeztu aurretik pH 7,4ra neutralizatu zen 1 M NaOHrekin, eta gero 5-6 orduz 37 °C-tan eta leunki irabiatuz inkubatu zen. Azkenik, nahastea 1-2 orduz irakiten mantendu zen entzimen aktibitatea eteteko, 10 minutuz 2000 g-tan zentrifugatu zen eta PTGdun soluzioa filtrazio bidez purifikatu zen 0,22 µM-ko iragazkiak erabiliz. Gainera, PTGn endotoxinaren presentzia neurtu zen PYROGENT® Plus Single Test kit-arekin (Lonza, #N289-25), eta proteina kantitate totala BCA erreaktiboa (Thermo Scientific, #23227) erabiliz kuantifikatu zen lehen aldiz erabili aurretik. PTG soluzioa alikuotatan gorde zen -80 °C-tan erabili arte.

#### 1.2.1.2. PIC+PTG in vitro ereduaren ezaugarriak

PIC+PTG *in vitro* ereduaren PIC tratamendua 24 orduz eta PTG estimulazioa 4 orduz konbinatuta lortu zen. Hau garatzeko hainbat urrats jarraitu ziren. Lehenik eta behin, 300.000 HCT-15 heste-zelula erein ziren putzu bakoitzean, eta zelulak oraindik suspentsioan zeudenean, PIC gehitu zitzaion Lipofektamina 2000-rekin transfektatu zitezela. 24 orduko inkubazioaren ondoren, PICdun transfekzio-medioa RPMI medio freskorekin ordezkatu zen, eta zelulak gau osoan zehar inkubatu ziren. Hurrengo goizean medioari PTG gehitu zitzaion, modu extra-zelularrean. Azkenik, PTG

estimulazioaren 4 orduak pasa ondoren, zelulak jaso ziren RNA eta proteinen analisirako (10. irudia).



**10. irudia.** PIC+PTG in vitro ereduaren garapenerako jarraitu beharreko pausuen irudi eskematikoa.

### 1.2.2. Beste tratamenduak

mRNAren egonkortasun-analisietarako, ovMETTL3 transfekziorako eta bi tratamendu ezberdin aplikatu ziren esperimentu independenteetan. Alde batetik, HCT-15 zelulak D aktinomizinarekin (Sigma-Aldrich, #A9415) tratatu ziren 5  $\mu\text{g/ml}$ -ko amaiera-kontzentrazioan 2, 4 eta 6 orduz; eta bestetik, HCT-15 zelulak zikloheximidarekin (Sigma-Aldrich, #01810) tratatu ziren 20  $\mu\text{g/ml}$ -ko amaiera-kontzentrazioan 3 eta 24 orduz.

m6A inhibizioaren eragina aztertzeko, 250.000 zelula erein ziren eta hurrengo goizean 100mM zikloezinarekin (Sigma-Aldrich, #A48105) tratatu ziren 3 orduz.

## 2. Metodoak

### 2.1. Gainadierazpenak

Gainadierazpen esperimentuetarako, 250.000 zelula erein ziren putzu bakoitzean eta 500 ng plasmido transfektatu zen X-TremeGENE HP DNA transfektatzeko errektiboa (Sigma-Aldrich, #6366546001) erabiliz. Gainadierazpen bikoitza lortu nahi zen kasuetan, plasmido bakoitzaren 250 ng erabili ziren. Zelulak 48 ordu ondoren jaso ziren.

METTL3ren gainadierazpenerako, Addgene atarian eskura zegoen plasmidoa erabili zen (#53739). YTHDC1ren gainadierazpenerako, Curie Institutuko (Paris) Dr. Alena Shkumatavaren laborategiak adeitasunez hornitutako Gateway errekonbinazioarekin klonatutako Flag isatsdun YTHDC1 plasmidoa (Graindorge et al., 2019) erabili zen. YTHDC2ren gainadierazpenerako, Chicagoko Unibertsitateko Prof. Chuan Heren taldeak adeitasunez emandako Flag isatsdun YTHDC2 plasmidoa erabili zen, zeinean *YTHDC2* genearen sekuentzia kodetzailea pFastBac bektorean klonatu zen (Hsu et al., 2017). *IRF7*ren gain-adierazpenerako, VectorBuilderren (Neu-Isenburg, Alemania) erositako *IRF7* genearen sekuentzia kodetzailea duen CMV promotorearen menpeko gainadierazpen plasmidoa erabili zen.

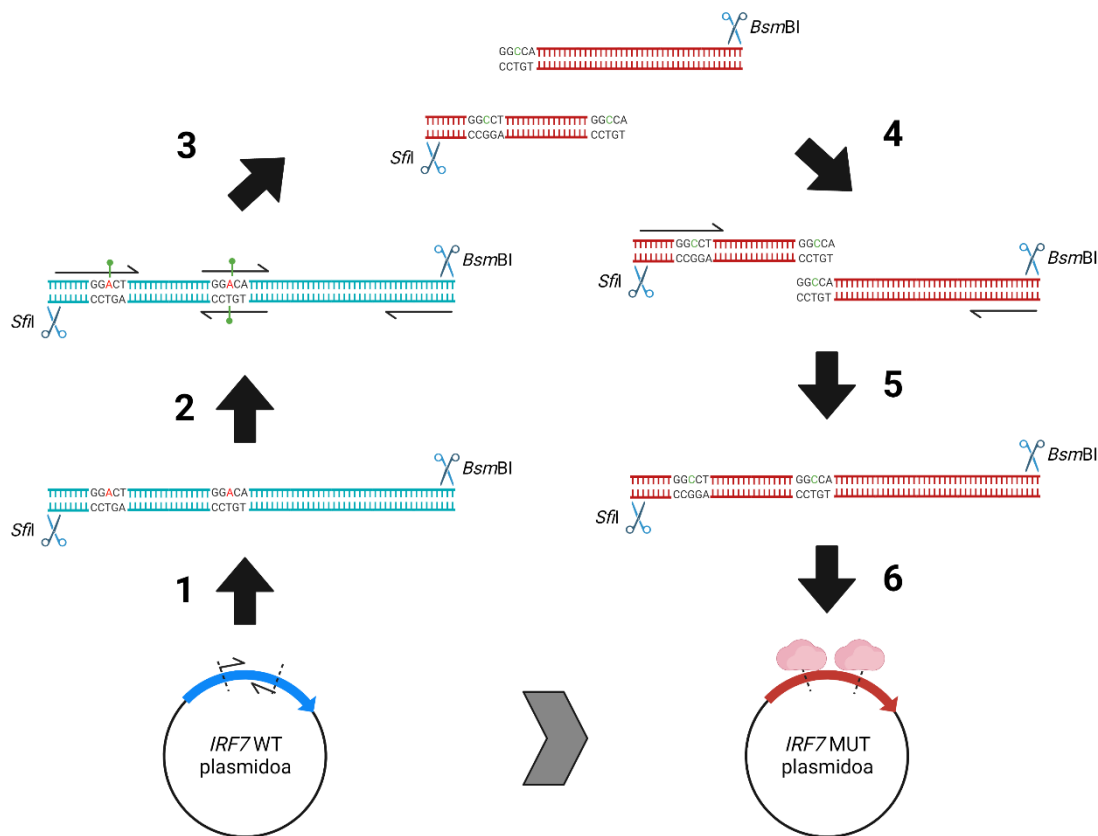
#### 2.1.1. *Plasmidoaren eraketa*

MUT *IRF7* plasmidoa (m6A motiboak kenduta) lau urratsetan eraiki zen (11. irudia). Lehenik eta behin, m6A motiboak hartzen zituen eskualdea (250bp) PCR bidez amplifikatu zen *BsmBI* eta *SfiI* entzimentzat errestrikzio guneak zituzten hasle espezifikoekin (1. gezia). Ondoren, m6A motiboak kendu ziren aurreko *BsmBI/SfiI* PCR produktua berranplifikatuz. Horretarako, m6A kontsentsuzko motiboaren A nukleotidoan puntu-mutazio isil bat (A→C) sartzeko hasle espezifikoak erabili ziren, PCR produktu mutatu bat sortuz (2. eta 3. geziak). Lortutako tamaina antzeko bi azpiproduktuak teilakatze PCR bidez batu ziren (4. eta 5. geziak). Azkenik, PCR produktu mutatua *IRF7* gainadierazpen bektorean klonatu zen *BsmBI* (NEB #R0580) eta *SfiI* (NEB #R0123S)

errestrikzio-entzimak erabiliz (6. gezia). Mutagenesirako eta klonaziorako erabilitako hasleak 3. Taulan zerrendatu dira.

3. Taula. MUT *IRF7* plasmidoaren eraketarako erabilitako hasleak eta haien sekuentziak.

IZENA	HASLEAREN SEKUENTZIA (5'→3')
IRF7 Fw + <i>Sfi</i> I	AGGGTGGGCCCCCAGGGCCATT
IRF7 Rv + <i>Bsm</i> BI	GGGTCGTCTCTACTGCCACCCC
IRF7 Fw + <i>Sfi</i> I + 1 <sup>st</sup> m6A mutation	GGTGGGCCCCCAGGGCCATTCCTGGCACACACACATGCTGGCCT
IRF7 Fw + 2 <sup>nd</sup> m6A mutation	GAGAGGGCCAAGAAGGGCTT
IRF7 Rv + 2 <sup>nd</sup> m6A mutation	AAGCCCTTCTTGGCCCTCTC



11. irudia. *IRF7*ren sekuentzia kodetzailetik m6A motiboak ezabatzeko eta *IRF7* MUT plasmidoa sortzeko jarraitutako urratsen irudi eskematikoa. BioRenderrekin sortutako irudia.

## 2.2. Isilarazpen esperimentuak

Isilarazpen esperimentuak egiteko, 150.000 zelula erein ziren putzu bakoitzean eta ALKBH5en edo METTL3ren aurkako siRNA espezifikoak, edo siRNA kontrol negatiboa zeluletara transfektatu ziren Lipofektamina RNAiMax erreaktiboa (Thermo Fisher, #13778075) erabiliz. *ALKBH5* isilarazteko erabilitako siRNA molekulen amaiera-kontzentrazioa 30 nM izan zen, eta *METTL3* isilarazteko 60 nM. Erabilitako siRNA molekulen sekuentziak 4. Taulan daude.

**4. Taula.** Isilarazpen esperimentuetan erabilitako siRNA molekulen sekuentziak.

HELBURUA	KOKAPENA	PRODUKTUAREN ERREFERENTZIA
<i>ALKBH5</i>	4. exoia (3'UTR)	IDT, #hs.Ri.ALKBH5.13.1
	1. eta 2. exoiak (CDS)	IDT, #hs.Ri.ALKBH5.13.3
<i>METTL3</i>	11. exoia (3'UTR)	IDT, #hs.Ri.METTL3.13.1
	5. exoia (CDS)	IDT, #hs.Ri.METTL3.13.2
Kontrol negatiboa	Inon ez	IDT, #51-01-14-01

16 orduren buruan, siRNA molekuladun transfekzio medioa RPMI medio freskorekin ordezkatu zen. Zelulak medio aldaketatik 48 ordutara jaso ziren. PIC+PTG eremuan, PIC tratamendua METTL3ren aurkako siRNA molekulak transfektatu eta 24 ordu geroago hasi zen.

## 2.3. Zatiketa zelularra

Zatiki nuklearrak eta zitoplasmikoak C1 apurketa bufferrean (1,28 M sakarosa, 40 M Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, %2 Triton X-100) lisatu ziren eta ondoren zentrifugatu egin ziren. Hauspeakin zelularrak C1 soluzio diluituan (%20 C1 apurketa buffer, %20 PBS) berreseki eta izotzetan mantendu ziren 15 minutuz. Lisatuak 2500 g-tan zentrifugatu ziren 15 minutuz 4 °C-tan; hauspeakina zatiki nuklear gisa gorde zen, eta gain-jalkina zatiki zitoplasmatiko gisa. RNA bi zatikietatik erauzi eta geneen adierazpena



aztertu zen intereseko RNA molekulen kokapena aztertzeko. *RPLPO* kontrol zitoplasmatiko gisa erabili zen, eta *Inc13* kontrol nuklear gisa.

#### 2.4. RNA eta proteinen erauzketa

Gene-adierazpenaren analisisetarako, giza hesteetako biopsietatik, zeluletatik eta zelulazatikietatik NucleoSpin RNA Kit-a (Macherey Nagel, 740984,50) erabiliz erauzi zen RNA.

RNA eta proteinen arteko elkarrekintzak aztertzeko, immunoprezipitatutako RNA proteina A-dun agarosa bolatxoetatik purifikatu zen PureLink RNA (Invitrogen, Carlsbad, AEB, # 12183016) erauzketa-kitaren bidez.

Proteinak apurketa bidez erauzi ziren RIPA bufferrean (150 mM NaCl, %1,0 NP-40, %0,5 Sodio Deoxikolatoa, %0,1 SDS, 50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA).

#### 2.5. Gene-adierazpenaren analisia

Erreakzio bakoitzean, 500-1000 ng RNA atzera transkribatu ziren iScript cDNA Synthesis Kit (BioRad, CA, AEB, 1708890) erabiliz. Adierazpen-mailak RT-qPCR bidez zehaztu ziren, iTaq SYBR Green Supermix (Bio-Rad, # 1725124) eta hasle espezifikoak erabiliz. *RPLPO* kontrol endogeno gisa erabili zen. Erreakzioak BioRad CFX384 makinan burutu ziren eta urtze-kurbak (*melting* kurbak ingelesez) ebaluatu ziren produktu bakar baten anplifikazioa bermatzeko. qPCR neurketa guztiak bikoiztuta egin ziren eta adierazpen-mailak  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoaren bidez aztertu ziren. Erabilitako hasle guztiak 5. Taulan daude.

**5. Taula.** qPCR bidezko gene-adierazpenaren analisisetarako erabilitako hasle espezifikoak.

GENEA	AURRERANZKO HASLEAREN SEKUENTZIA	ALDERANTZIZKO HASLEAREN SEKUENTZIA
<i>ALKBH5</i>	CGGCGAAGGCTACACTTSCG	CCACCAGCTTTTGGATCACCA
<i>CXCL10</i>	GTGGCATTCAAGGAGTACCTC	TGATGGCCTTCGATTCTGGATT
<i>HPRT</i>	ACCAGTCAACAGGGGACATAA	CTTCGTGGGGTCCTTTTCACC
<i>IFNB1</i>	GCTTGGATTCTACAAAGAAGCA	ATAGATGGTCAATGCGGCGTC

<i>IL15</i>	TTGGGAACCATAGATTTGTGCAG	AGAGAAAGCACTTCATTGCTGTT
<i>IL18</i>	TCTTCATTGACCAAGGAAATCGG	TCCGGGGTGCATTATCTCTAC
<i>IRF1</i>	ATGCCCATCACTCGGATGC	CCCTGCTTTGTATCGGCCTG
<i>IRF3</i>	AGAGGCTCGTGATGGTCAAG	AGGTCCACAGTATTCTCCAGG
<i>IRF7</i>	CCCACGCTATACCATCTACCT	GATGTCGTCATAGAGGCTGTTG
<i>IRF7 (m6A motiboak)</i>	CATTCCTGGCACACACACAT	AAGCCCTTCTTGTCCCTCTC
<i>Lnc13</i>	AAGGATCATTGCAGGGTCTC	GTGGCCAAAAGAAGTCTGAGTC
<i>METTL14</i>	GAGTGTGTTTACGAAAATGGGGT	CCGTCTGTGCTACGCTTCA
<i>METTL3</i>	TCGAGAGCGAAATTTTTCAAC	GGAGATAGAGAGCCTTCTGAACC
<i>RPLP0</i>	GCAGCATCTACAACCCTGAAG	CACTGGCAACATTGCGGAC
<i>SOCS1</i>	AGACCCCTTCTCACCTCTTG	AGTTAAGCTGCTACAACAACCAG
<i>STAT1</i>	CGGCTGAATTTTCGGCACCT	CAGTAACGATGAGAGGACCCT
<i>YTHDC1</i>	CTTCTGATGAGCAAGGGAACAA	GGCCTCACTTCGAGTGCATAA
<i>YTHDC2</i>	CTCCGGAACCTTTTGAGAATGCC	TTAAAGCTGGTGGAGGTTCCAGG
<i>YTHDF1</i>	ACCTGTCCAGCTATTACCCG	TGGTGAGGTATGGAATCGGAG
<i>YTHDF2</i>	TGAACCTTACTTGAGTCCACAGG	AAGCCAATGGAGGGACTGTAG

## 2.6. Western Blot

Proteina lisatuei Laemmli buffer 6X (62 mM Tris-HCl, 100 mM DTT, %10 glizerola, %2 SDS, 0,2 mg/ml bromofenol urdina, % 5 2-merkaptotanol) gehitu zitzaion eta proteinak 95 °C-tan desnaturalizatu ziren 10 minutuz. Proteinak %10 edota %8 SDS-PAGE geletan migratu ziren, intereseko proteinaren tamainaren arabera. Elektroforesiaren ondoren, proteinak nitrozelosazko mintzetara transferitu ziren Transblot-Turbo Transfer System (BioRad) bat erabiliz, eta mintza TBSTn (20 mM Tris, 150 mM NaCl eta %0,1 Tween 20) %5era diluitutako gaingabetutako esnetan blokeatu zen giro-temperaturan ordubetez. Mintzak 1:1000era diluitutako antigorputz primarioekin 4 °C-tan inkubatu ziren gau osoan zehar. Erabilitako antigorputz primarioak 6. Taulan agertzen dira.

**6. Taula.** Western Blot bidezko proteinen detekziorako erabilitako antigorputz primarioen informazioa.

PROTEINA	TAMAINA (kDa)	ANIMALIA-ITURRIA	PRODUKTUAREN ERREFERENTZIA
ALKBH5	50	Untxia	Novus Biologicals, #NBP1-82188
GAPDH	37	Sagua	Santa Cruz Biotechnologies, #sc-47724
HSP90	90	Untxia	Cell Signaling, #4874
IRF7	70	Sagua	Santa Cruz Biotechnologies, #sc-74472
METTL3	64	Untxia	Abcam, #195352
TUBULIN	55	Sagua	Sigma-Aldrich, #T9026
YTHDC2	160	Untxia	Proteintech, #27779-1-AP

Hurrengo goizean, mintzak hiru aldiz garbitu ziren TBSTn 10 minutuz. Ondoren, mintzak untxi-jatorridun (Santa Cruz Biotechnologies, #sc-2357) edo sagua-jatorridun (Santa Cruz Biotechnologies, #sc-516102) antigorputz primarioen aurkako errefau peroxidarekin konjugatutako antigorputz sekundarioarekin inkubatu ziren giro-tenperaturan, ordubetez. Antigorputz sekundarioak 1:10000ra diluitu ziren, TBSTn %2,5era diluitutako gaingabetutako esnetan. Gero, mintzak garbitu ziren lehen aipatu bezala. Banda immunoerreaktiboak Clarity Max ECL Substratua (BioRad, # 1705062) erabiliz errebelatu ziren Bio-Rad Molecular Imager ChemiDoc XRS (BioRad) sisteman eta ImageJ (BioRad) softwarea erabiliz kuantifikatu ziren.

## 2.7. RNA immunoprezipitazioa

### 2.7.1. *m6A RNA immunoprecipitation (meRIP)*

RNA zatikatze-bufferrarekin (100 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub>) zatitu zen 95 °C-tan 3 minutuz inkubatuz, eta izotzetan jarri zen berotu eta berehala. %25 vol/vol-ean disolbatutako Proteina A-dun agarosa bolatxoak (GE Healthcare, Chicago, AEB # 17-0780-01) bi aldiz garbitu ziren erreazio bufferrean (150 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, % 0,1 NP-40) aurre-garbitu eta antigorputzen akoplamendua urratsak burutu baino lehen. Aurre-

garbiketarako, bolatxo-suspentsioaren 100 µl erabili ziren lagin bakoitzeko; eta antigorputzak akoplatzeko, bolatxo-suspentsioaren 30 µl lagin bakoitzeko. Behin bolatxoak garbituta, erreakzio-bufferraren berreseki ziren, garbiketa aurreko bolumen berean. Aurre-garbiketa pausurako zatikatutako 6 µg RNA bolatxo-suspentsioaren 100 µl-rekin inkubatu ziren. Antigorputzen akoplamendu pausurako, m6Aren aurkako antigorputza (Abcam, #ab151230) eta kontrol gisa erabilitako antigorputza (IgG, Santa Cruz Biotechnologies, Dallas, AEB, #sc-2025), bakoitzekotik 1 µg, 30 µl Proteina A-dun agarosa bolatxoekin nahastu ziren. Bai RNA-bolatxo, bai bolatxo-antigorputz nahasketak gurpil birakarian inkubatu ziren 4 °C-tan ordubetez. Inkubazioaren ondoren, bolatxoak 1500 bira minutuko (b/m) abiadurara zentrifugatu ziren, minutu batez. Antigorputzei lotutako bolatxoak erreakzio bufferrean garbitu ziren bi aldiz. Bestalde, aurre-garbiketako pausuko bolatxoak baztertu egin ziren eta gainjalkinaren (aurre-garbitutako RNAren) %10a input gisa gorde zen. Gainerako gainjalkina banatu egin zen, eta zati bakoitza (aurre-garbitutako RNA guztiaren %45a) zegokion antigorputz-bolatxo nahastera gehitu zen. Tutuak gurpil birakarian inkubatu ziren 4 °C-tan, 3 orduz. Ondoren, bolatxoak bi aldiz garbitu ziren erreakzio-bufferrean, bi aldiz gatz kontzentrazio gutxiko bufferrean (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl eta %0,1 NP-40) eta bi aldiz gatz kontzentrazio handiko bufferrean (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl eta %0,1 NP-40). Azken garbiketaren ondoren, bolatxoak apurketa bufferrean bersuspenditu ziren eta RNA PureLink RNA erauzketa kita (Invitrogen, Carlsbad, AEB, 12183016) erabiliz erauzi zen.

### 2.7.2. m6A makineriako proteinen RNA immunoprezipitazioa

Zelulak proteinasaren inhibitzaileak (Thermo Scientific, #A32955) RIP bufferrean (150 mM KCl, 25 mM Tris, 0,5 mM DTT, % 0,5 NP-40) apurtu ziren. Lisatuak izotzetan mantendu ziren 10 minutuz eta xiringa bat erabiliz homogeneousatu ziren. Bitartean, lagin bakoitzeko bolatxo magnetikoen suspentsioaren (Proteina G Dynabeads, Invitrogen, #10004D) 10 µl garbitu ziren RIP bufferrarekin bi aldiz, eta 10 µl-tan berreseki ziren.

Aurre-garbiketa burutzeko, lisatuak bolatxo magnetikoekin inkubatu ziren 4 °C-tan ordubetez.

Inkubazioaren ondoren, bolatxoak bereizgailu magnetiko batekin baztertu ziren eta gainjalkin garbia gorde zen. Aurre-garbitutako lisatua honela bereizi zen: %45, intereseko proteinarekin immunoprezipitatzeko erabili zen, beste %45a immunoprezipitazioaren kontrol negatiboarekin lotzeko, eta % 10a *input* gisa gordetzeko. Intereseko proteinak dagokion antigorputzaren (ALKBH5, METTL3 edo YTHDC2, 6. Taulan aipatutakoak) 1 µg-rekin immunoprezipitatu ziren; immunoprezipitazio kontrol negatiborako, berriz, aurre-garbitutako lisatuaren %45a untxi jatorridun IgG-ren aurkako antigorputzaren (Santa Cruzeko Bioteknologiak, #sc-2025) 1 µg-rekin inkubatu zen, gurpil birakarian giro tenperaturan, ordubetez. *Input* zatia izotzetan mantendu edo -80 °C-tan gorde zen erabili arte.

Antigorputzak akoplatzeko inkubazio denboran, 20 µl bolatxo magnetiko garbitu ziren lehen deskribatu bezala. Ordubeteren buruan, garbitutako bolatxo magnetikoak antigorputz-lisatu nahastera gehitu ziren eta laginak gurpil birakarian inkubatu ziren giro tenperaturan, ordu erdiz. Ondoren, antigorputz-proteina konplexuei lotutako bolatxoak bi aldiz garbitu ziren RIP bufferrean, bi aldiz gatz kontzentrazio gutxiko bufferrean (50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, % 0,1 NP-40) eta bi aldiz gatz kontzentrazio altuko bufferrean (500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, % 0,1 NP-40). Garbiketen ondoren, lagin bakoitzaren %70a RNA erauzketa-bufferrean berreseki zen, eta %30a proteinen immunoprezipitazio espezifikoa Western Blot bidez baieztatzeko gorde zen.

## 2.8. ELISA

### 2.8.1. *Reobirusen aurkako antigorputzen detekzioa serum laginetan*

Reobirusaren aurkako serum-erreaktibotasuna Amy Rosenfelden protokoloan oinarritutako ELISA teknikaren bidez neurtu zen (Rosenfeld et al., 2022), hainbat aldaketarekin (12. irudia). Prozedura hondo laua duten mikrotitulazio-plaketan (Nunc

Maxisorp Elisa, Thermo Fisher, #44-2404-21) burutu zen. Putzuak lotura bufferrean (0,1 M bikarbonato/karbonato buffer, pH 9,6) diluitutako Ugaztunen T1L ortoreobirusaren (reobirusaren)  $10^5$  PFU-rekin estali ziren, putzu bakoitzean, eta plaka plataforma kulunkarian inkubatu zen 4 °C-tan, gau osoan zehar. Lotura-buffer soila, birus-partikularik gabekoa, birusik gabeko kontrol gisa erabili zen. Hurrengo goizean, plakara itsatsi gabeko birusak baztertu ziren, eta putzuak PBSTrekin [ur destilatuan eta % 0,1 Tween 20-en diluitutako PBS tabletak (Invitrogen, # 003002)], garbitu ziren hiru aldiz giro tenperaturan (1. urratsa)

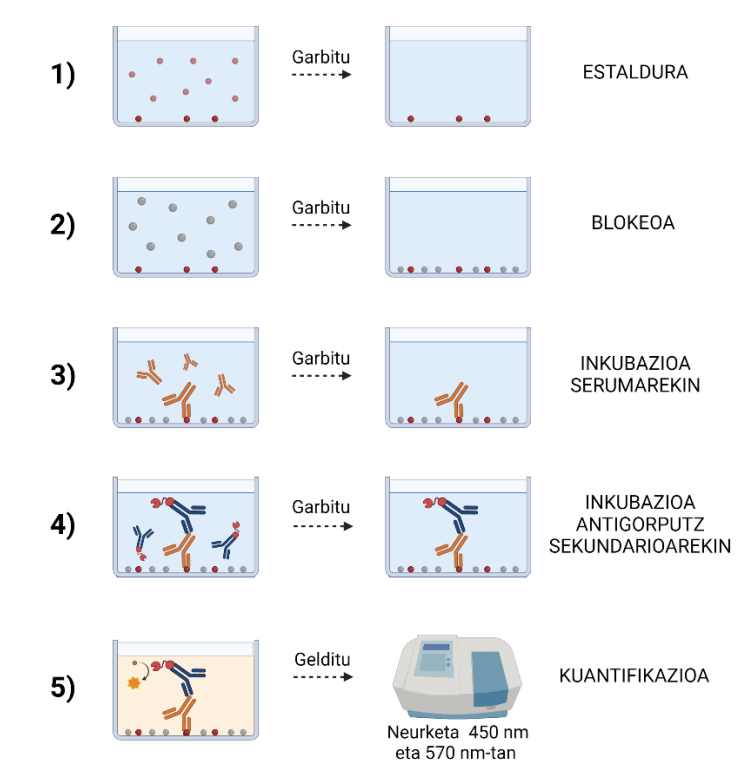
Putzuak PBSTn %50era diluitutako zaldi-serumarekin blokeatu ziren plataforma orbitalean, 10 orduz mugimenduan mantenduta giro tenperaturan. Blokeatu ondoren, putzuak bost aldiz garbitu ziren lehen deskribatu bezala (2. urratsa)

Plaken arteko normalizaziorako, serum estandarraren PBSTn egindako diluzio seriatuak (1:128 eta 1:8192 artekoak) gehitu ziren plaka guztietan. Serum estandarra alde zurretik teknika optimizatzeko erabilitako eta reobirusaren aurkako errektibotasun handia izan zuten hiru GZdun pazienteen serumen batuketa zen. Neurtzeko, serum laginak 1:1024ra diluitu ziren PBSTn. Serum lagin diluituen 100 µl gehitu ziren putzuetara eta plaka plataforma kulunkarian inkubatu zen 4 °C-tan gauean zehar. Hurrengo goizean, seruma baztertu zen eta putzuak PBSTarekin garbitu ziren 5 aldiz plataforma kulunkarian giro-tenperaturan mugimenduan 20 minutuz mantenduz, garbiketa bakoitzeko (3. urratsa).

Gero, PBSTn 1:10000ra diluitutako giza-antigorputzen aurkako peroxidasarekin konjugatutako ahuntz-jatorriko AffiniPure IgG antigorputz sekundarioaren (Jackson Immuno Research, #109-035-088) 100 µl putzuetara gehitu zen, eta plaka plataforma kulunkarian inkubatu zen giro tenperaturan, 90 minutuz. Inkubazioaren ondoren, putzuak berriro garbitu ziren, lehen esan bezala (4. urratsa).

BD Pharmingen TMB Substrate Reagent Set (# 555214) substratu soluzioa antigorputz sekundarioaren seinalea errebelatzeko erabili zen. Bost minutuko esposizio-inkubazioaren ondoren, erreakzioa 2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-rekin eten zen eta absorbantzia 450 nm eta 570 nm-tan irakurri zen (5. urratsa).

Reobirusaren aurkako serum-erreaktibotasun erlatiboa kalkulatzeko, 450 nm-ko absorbantzia-balioei 570 nm-koak kendu zitzaizkien eta plaka bereko lagin estandarraren 1:1024 diluzioaren absorbantzia-balioekin erlatibizatu ziren.



**12. irudia.** Reobirusaren aurkako antigorputzak detektatzeko eta serum-erreaktibotasuna neurtzeko ELISAn oinarritutako prozeduran jarraitutako urratsen irudi eskematikoa. Ezkerreko zenbakiak testuan xehetasunez azaldutako pauso bakoitza adierazten dute. Labur esanda, 1. urratsean birus-partikulak (puntu gorriak) ereiten dira; 2. urratsean, putzuak zaldi-serumarekin blokeatzen dira (puntu gris gisa irudikatuta); 3. urratsean, serum-laginak (antigorputz laranja gisa irudikatuta) birus-partikulekin inkubatzen dira; 4. urratsean, HRP-konjugatuaren aurkako antigorputz sekundarioak (antigorputz urdin gisa irudikatuta) putzuei gehitzen zaizkie; eta 5. urratsean, kolorea agerrarazi eta, gero neurtu egiten da espektrofotometro batean. BioRenderrekin sortutako irudia.

### 2.8.2. CXCL10 kuantifikazioa serum laginetan

Serumeko CXCL10 kontzentrazioa zehazteko, merkatuan eskuragarri dagoen ELISA sandwich kit-a erabili zen (Proteintech, Alemania, #KE00128), fabrikatzailearen jarraibideen arabera. Labur esanda, aldez aurretik CXCL10 antigorputzarekin estalitako plakako putzuetara kit-eko lagin estandarrak eta serumaren laginak, bakoitzetik 100 µl, gehitu ziren eta 37°C-tan inkubatu ziren, 2 orduz. Prozedura hasi aurretik, serum laginak 1:1era diluitu ziren Sample Diluent PT 4-oc bufferrean, fabrikatzailearen gomendioei jarraiki. Ondoren, putzu bakoitzean CXCL10 detekzio-antigorputz soluzioaren 100 µl gehitu ziren eta plaka 37 °C-tan inkubatu zen, ordubetez. Gero, HRP detekzio-antigorputz soluzioaren 100 µl gehitu eta plaka 37 °C-tan inkubatu zen 40 minutuz. Urrats bakoitzaren ostean, putzuak lau aldiz garbitu ziren 1X garbitze bufferrarekin.

TMB substratua HRP seinalea errebelatzeko erabili zen, plaka 37°C-tan ilunpetan inkubatuz, 15 minutuz. Azkenik, putzuei *stop* soluzioa gehitu zitzaien eta absorbantzia berehala neurtu zen 450 nm eta 630 nm-tan. CXCL10 kontzentrazioa kurba estandarra erabiliz kalkulatu zen.

### 2.8.3. m6A totalaren kuantifikazioa

m6A mailak hesteetako biopsia laginetatik eta baldintza ezberdinpean zeuden HCT-15 zeluletatik erauzitako 200 ng RNAn neurtu ziren, merkatuan eskuragarri dagoen ELISA kit-a erabiliz (Epigentek, NY, USA, #P-9005-96).

Lehenik eta behin, interesko RNA laginak eta kontrol positibo zein negatiboak 80 µl-ko lotura-soluzioan diluitu eta zegozkien putzuetan banatu eta gero, 37 °C-tan inkubatu ziren, 90 minutuz. Gero, m6A atzimate-antigorputza gehitu zen eta plaka giro tenperaturan inkubatu zen, ordubetez. Ondoren, detekzio-antigorputza gehitu eta plaka giro-tenperaturan inkubatu zen 30 minutuz. Geroago, putzuak areagotze-soluzioarekin inkubatu ziren giro tenperaturan 30 minutuz. Urrats bakoitzaren artean, putzuak garbitze buffer diluituaren 150 µl-rekin garbitu ziren hiru aldiz. Azken garbiketaren ondoren,



soluzio errebelatzailea gehitu zen, eta putzuak ilunpetan eta giro tenperaturan inkubatu ziren, 10 minutuz. Laginek kolore urdinxka hartzen hastean, m6Aren presentziaren seinale gisa, stop soluzioa gehitu zen eta kolorea horira aldatu zen. Orduan, absorbantzia 450 nm-tan neurtu zen. m6A totalaren ehunekoak kalkulatzeko, kontrol negatiboaren absorbantzia-balioak kendu zitzaizkien RNA laginen eta kontrol positiboaren balioei, eta erabilitako RNA kantitatera normalizatu, eta kontrol positiboarekin erlatibizatu ziren.

## 2.9. Online zerbitzariak

### 2.9.1. *SRAMP*

SRAMP online eta publikoki eskuragarri dagoen m6A iragarpen zerbitzari bat da (Zhou et al., 2016). Sekuentzia genomikoak edo cDNA erabiltzen ditu m6A guneak iragartzeko. Iragarpen hauek sekuentzia bera eta m6A motiboen inguruko bigarren mailako egitura hartzen dituzte kontuan. Parametro horien arabera, zerbitzariak aurreikuspen-puntuazioa kalkulaten du, m6A gune posible bakoitza metilatuta egoteko konfiantza edo probabilitate oso altu, altu, moderatu edo baxu taldeetan sailkatzen duena. Ehun edo zelula desberdinak hautat daitezke, besteak beste, gibela, garuna, birika (A549 zelulak), giltzurruna (HEK293 zelulak), zelula immunologikoak (CD8+ T zelulak), eta aukera generiko bat (lehenetsitakoa edo *default*) ere badago. *IRF7* mRNA molekulako m6A guneak iragartzeko, transkribatu primario zein helduaren sekuentziak erabili ziren, eta aukera generikoa hautatu zen iragarpen-azterketa burutzeko.

### 2.9.2. *RNAfold*

RNAfold web zerbitzaria sekuentzia zehatzen nukleotidoen konbinazioaren energia libre minimoan oinarritutako RNA sekuentzien bigarren mailako egitura aurreikusteko tresna bat da. Vienako RNA web zerbitzuetan eskuragarri dagoen online tresna da (Gruber et al., 2008). 7500 nukleotidorainoko ssRNA edo ssDNA sekuentziak erabil daitezke. *IRF7*ren kasuan, RNA transkribatu helduaren sekuentzia aztertu zen.

### 2.10. Estatistika-analisiak

Datuak gutxienez hiru erreplika biologikoren batezbestekoaren desbideratze estandar (SD) gisa adierazten dira, edo batezbesteko errore estandar (SEM) gisa taldeak sei lagin baino gehiagokoak direnean. Taldeak t-Student edo ANOVA testak erabiliz konparatu ziren elkarren artean. Korrelazioa Pearsonen korrelazio koefizienteak erabiliz aztertu zen. Proba estatistiko guztiak GraphPad Prism 8 softwarea erabiliz kalkulatu ziren. Oro har,  $p < 0,05$  balioak estatistikoki adierazgarritzat hartu ziren,  $p < 0,1$  balioek joera iradokitzen duten bitartean.

***EMAITZAK***

## 1. Reobirus infekzioak eta GZa

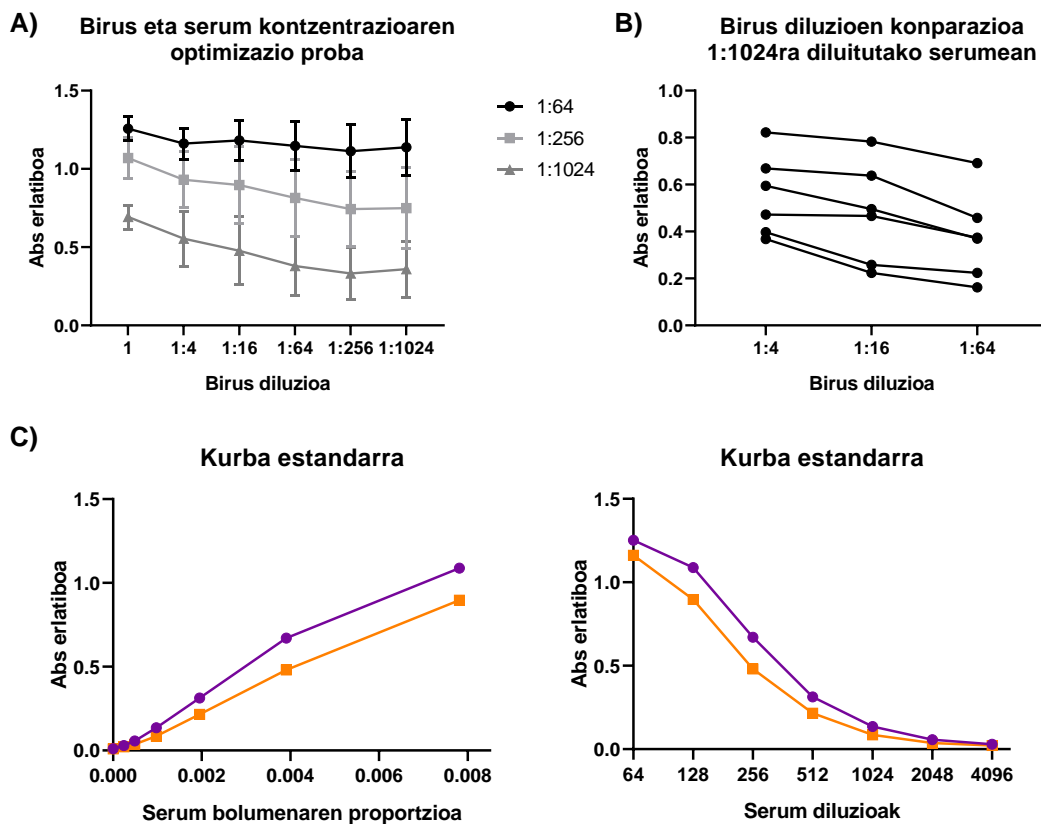
### 1.1. Reobirusen aurkako erreaktibotasuna detektatzeko teknikaren garapena eta optimizazioa

Birus-infekzioak GZ garatzeko ingurumen-faktore eragile gisa proposatu dira, eta, zehazkiago, ugaztunen ortoreobirus (reobirus) infekzioak GZaren suszeptibilitatearekin asoziatu dira (Bouziat et al., 2017).

GZaren eta reobirus infekzioen arteko lotura baieztatzeko, reobirusaren aurkako antigorputz kantitatea neurtu genuen haur zeliako eta ez-zeliakoen serum laginetan. Horretarako, ELISA metodo bat garatu genuen reobirus partikulen aurkako erreaktibotasun immunologikoa kuantifikatzeko. Reobirusak eragindako infekzioak ez dira ia inoiz diagnostikatzen, eta kutsatutako eta kutsatu gabeko pazienteen erregistro zehatzik ez da izaten. Guk dakigula, ez da inoiz ELISAn oinarritutako prozedurarik erabili reobirusaren aurkako erreaktibotasuna detektatzeko. Beraz, proposatutako metodoa aurrera eramateko lehen urratsa teknikaren optimizazioa izan zen.

Lehenik eta behin, serum eta reobirus partikulen kontzentrazio desberdinak probatu genituen, garbitze- eta estaldura-bufferrean disolbatuta, hurrenez hurren. Guztira 6 serum lagin erabili genituen, 3 zeliakoenak eta beste 3 ez-zeliakoenak, eta detektatutako seinalea birus-kargaren eta serum bolumenaren arabera zela ikusi genuen, gure sistemaren zehaztasuna baieztatuz (13A irudia). Serum kontzentrazioarako 1:1024 diluzioa hautatu genuen, lagin guztien absorbantzia balioak saturazio-puntutik behera zeuden diluzio bakarra baitzen (13A irudia). Birus-kargaren kontzentrazio optimo gisa 1:16 diluzioa hautatu zen (13B irudia). Blokatzerako, animalia-jatorri desberdineko serum desberdinak erabiltzea ere ebaluatu genuen. Zaldi-jatorriko seruma, garbitze-bufferrean %50ean disolbatuta, aukera onena zela ohartu ginen. Garbitze-buffer gisa erabiltzeko TBST eta PBST ere probatu ziren, azken hau egokiena izan zelarik.

Jarraian, gure prozeduraren espezifikotasuna ebaluatzeko, serum-lagin bakoitzeko birusik gabeko baldintza edo baldintza hutsa ere gehitzea erabaki genuen. Gainera, kurba estandar bat ere gehitu genuen, esperimuntuen arteko aldagarritasuna zuzentzeko. Orain arte probatutako sei laginetatik absorbantzia-balio altuenak zituzten hiru laginak hautatu eta bateratu egin ziren, eta ondoren kurba estandar bat sortzeko erabili. Lagin estandarraren diluzio sorta zabalean reobirusarekiko serum-erreaktibotasuna neurtzeak haren egokitasuna baieztatu zuen (13C irudia).



**13. irudia. A)** Absorbantzia (Abs) erlatiboaren kuantifikazioa birus eta serum diluzio desberdinak erabiliz. **B)** Lagin individualen absorbantzia erlatiboaren kuantifikazioa 1:1024ko serum diluzioan eta 1:4, 1:16 eta 1:64 birus diluzioen arteko konparazioa. **C)** Estandar gisa erabilitako serumaren kurba estandarra serie bikoitzeko eta 1:128an hasitako sei diluzio erabilita, eta garbitze bufferra zuritzat hartuta. Ezkerrean, serumaren kontzentrazio-balioak serum bolumenaren proportzio gisa adierazten dira, eta eskuinean, berriz, serum diluzio gisa. Puntu eta lerro moreak 1:16 birus diluzioari eta laranja birusik gabeko egoerari dagokie. Absorbantzia erlatiboa 450 nm balioei 570 nm-koan kenduta kalkulatu zen.

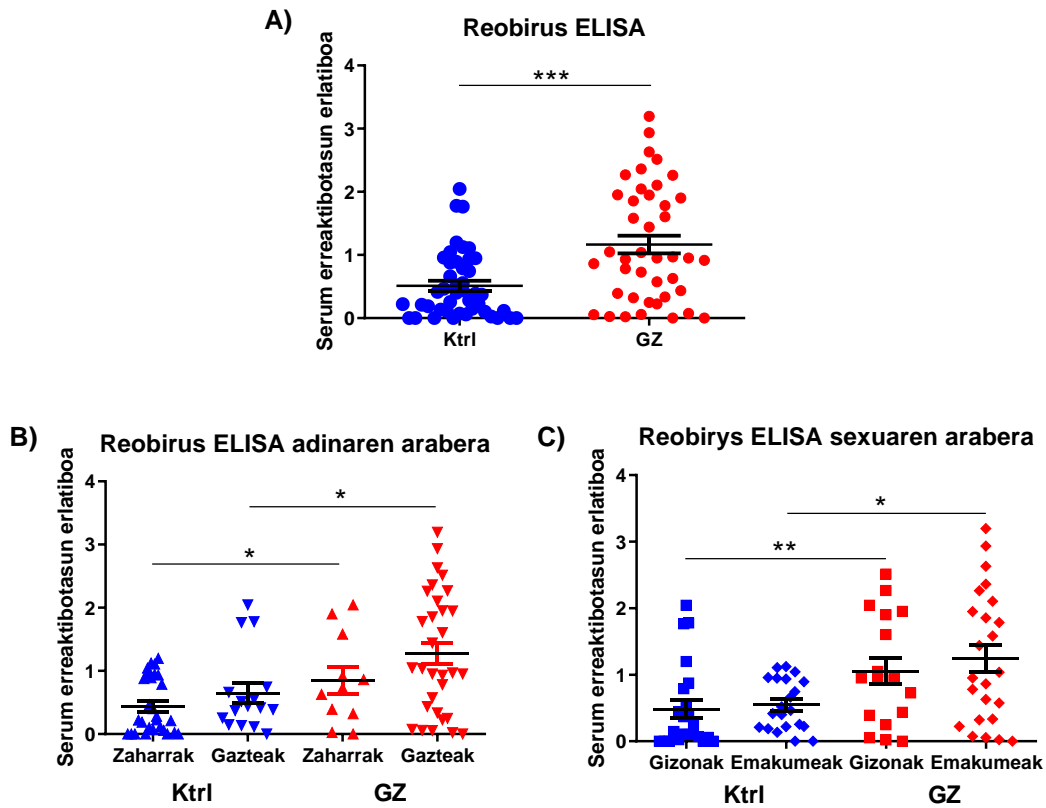
## 1.2. Reobirusaren aurkako serum-erreaktibotasuna GZan

Teknika optimizatu ondoren, reobirus serum-erreaktibotasuna ebaluatu genuen 44 pertsona zeliakotan eta 44 ez-zeliakotan, eta ikusi genuen GZa duten banakoek reobirusarekiko serum-erreaktibotasun handiagoa zutela (14A irudia), maizago infektatu zirela edo birusaren aurkako erantzun immunitarioa sendoagoa zutela iradokiz. Nolanahi ere, emaitza hauek reobirus infekzioen eta GZaren arteko lotura berresten dute, eta birus-infekzio horrek GZa garatzeko arriskuan izan dezakeen inplikazioa indartzen dute.

Reobirus infekzioak haurtzaroan gertatu ohi direnez (Soleimanjahi & Heydarabadi, 2022), adinak reobirusaren aurkako antigorputz-mailan eragina ba ote duen argitu nahi genuen. Hala, paziente gazteagoak eta zaharragoak alderatu genituen, 8 urteko adina erreferentziatzat hartuta. Banako zaharragoek serum-erreaktibotasun baxuagoa zuten, baina desberdintasuna ez zen esanguratsua (14B irudia).

Sexua gure immunitate-sistemari eragiten dion aldagai biologikoa da; izan ere, arrek eta emeek ez diete berdin erantzuten patogeneoi, erantzun immunitario desberdina erakusten dute, batez ere X kromosoman dauden sexu-hormonen eta geneen ondorioz (Klein & Flanagan, 2016; Oertelt-Prigione, 2012). Horregatik, sexuak serum-erreaktibotasunean izan dezakeen eragina ere ebaluatu nahi izan dugu. Oro har, emeek berezko erantzun immunitario sendoagoa izaten dute arrek baino (Klein & Flanagan, 2016). Hala ere, ez dugu alderik aurkitu gizabanako maskulino eta femeninoen artean reobirusarekiko serum-erreaktibotasunari dagokionez (14C irudia).

Beraz, datu hauek erakusten dute ez adinak ez sexuak ez dutela eraginik reobirusaren aurkako serum-erreaktibotasunean. Hala ere, talde bakoitzeko (zaharrak eta gazteak, gizonezkoak eta emakumezkoak) zeliakoen eta ez-zeliakoen arteko aldea esanguratsua da oraindik, zeliakoa izatea edo ez izatea faktore determinatzailea denaren ideia indartuz.



**14. irudia. A)** Reobirusaren aurkako serum errektibotasun erlatiboa paziente zeliako (GZ) eta ez-zeliako (Ktrl) pediatrikoen serum-laginetan. **B)** Reobirusaren aurkako serum errektibotasun erlatiboaren konparasioa gizabanakoen adinari dagokionez. Medianaren balioa 8 urte zen eta hori hartu zen laginak zahar eta gazte taldetan bereizteko erreferentzia baliozat. **C)** Reobirusaren aurkako serum errektibotasun erlatiboaren konparasioa gizabanakoen sexuari dagokionez. Serum errektibotasun erlatiboa, 570 nm-ko absorbantzia balioak 450 nm-ko balioei kenduz, eta kurba estandarraren 1:1024 diluzioren absorbantzia balio erlatiboarekin erlatibizatuz kalkulatu zen. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  t-student analisisen arabera.

## 2. Birusen aurkako immunitatea GZan

Reobirus infekzioetan (Carew et al., 2017; Steele et al., 2011) eta GZaren garapenean (Hagbin et al., 2019; E. Y. Lee, Lee, & Song, 2009) CXCL10en parte-hartzea kontuan hartuta, bi faktore horien arteko lotura ebaluatu nahi izan dugu. Beraz, CXCL10ren kontzentrazioa neurtu genuen ELISA bidez reobirusaren aurkako errektibotasuna kuantifikatzeko erabilitako zeliako eta ez-zeliakoen serum lagin berdinetan. Reobirusarekiko errektibotasunaren emaitzen antzera, GZa duten pertsonen CXCL10 maila nabarmen altuagoak erakutsi zituzten zeliakoak ez diren pertsonen baino (15A irudia). Gainera, ikusi genuen CXCL10 mailak reobirusarekiko serum-errektibotasunarekin korrelazionatzen zuela, bai zeliakoetan, bai ez-zeliakoetan ere (15B irudia). Emaitza hauek agerian uzten dute reobirus infekzioen, CXCL10en eta GZaren arteko erlazioa, eta reobirus infekzioek GZdun pazienteetan ikusitako CXCL10 mailaren igoeran lagundu dezaketela iradokitzen dute.

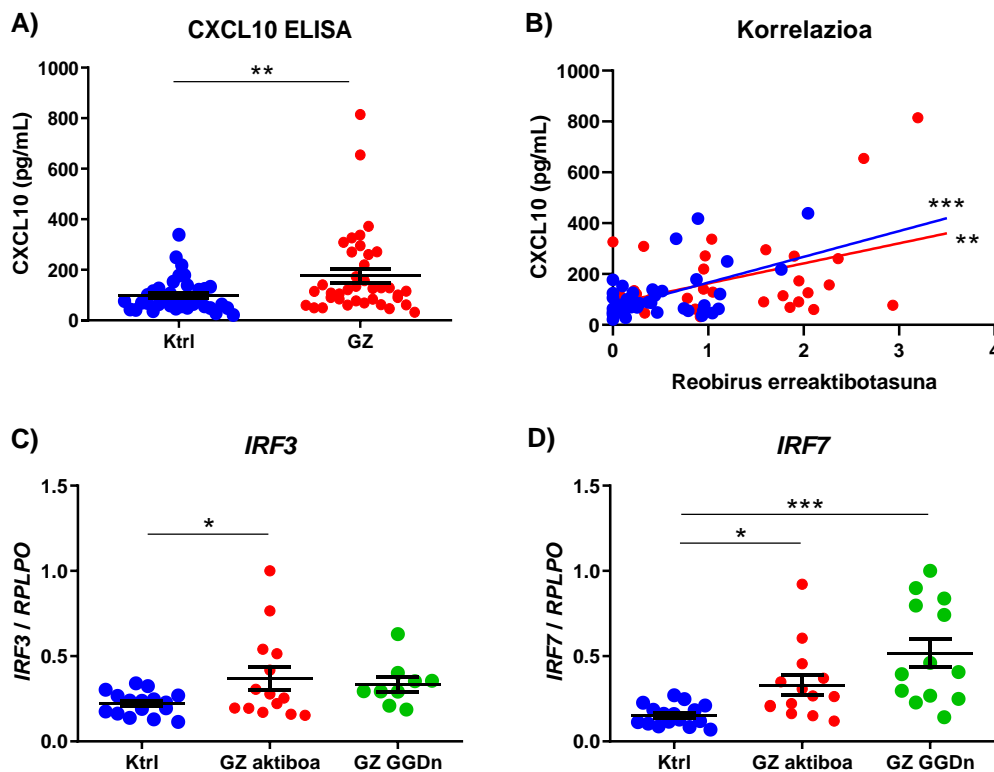
Reobirusa, errotabirusa bezala, *Reoviridae* familiako dsRNA birus bat da, eta IFN-I bidezidorra aktibatzen du RIG-I, MAD5 eta MAVSen bidez (Sherry, 2009). GZdun pazienteek serumean erreobirusaren aurkako errektibotasun areagotua erakutsi zutela kontuan hartuta, GZan birusen aurkako erantzun immunitarioa ere areagotuta dagoen jakin nahi izan genuen.

*IRF3* eta *IRF7* geneek IFN-I bidezidorreko bi erregulatzaile nagusi kodetzen dituzte, *IRF3* eta *IRF7*, eta horien adierazpena RNA birusen infekzioei aurre egiteko areagotzen da (Chiang & Liu, 2019; Ikushima et al., 2013; S. Ning et al., 2011; Santana-de Anda, Gómez-Martín, Díaz-Zamudio, & Alcocer-Varela, 2011; Sin et al., 2020). GZaren testuinguruan RNA birusen infekzioei aurre egiteko erantzun immunitarioa ebaluatzeko, *IRF3* eta *IRF7* geneen adierazpena kuantifikatu genuen GZ aktibodun pazienteen, glutenik gabeko dieta (GGD) jarraitzen duten zeliakoen eta pertsona ez-zeliakoen hesteetako biopsia laginetan. *IRF3*k zein *IRF7*k adierazpen emendatua erakutsi zuten GZ aktibodun



pazienteetan (15C, D irudia). Hala ere, *IRF7* maila altuak GGDpean dauden zeliakoetan ere mantendu ziren (15D irudia).

Emitza hauek birus-infekzioen aurkako erantzun immunitario sendoagoa adierazten dute, zeinak *IRF7* adierazpenaren kasuan maila altuei eusten dien nahiz eta dietatik glutena kentzean GZaren hobekuntza gertatu. Honek, birus-infekzio errepikakorrek pertsonaren ostalariaren immunitate-sisteman oinarrizko hantura-mailak areagotu dezakeen marka bat utz dezaketela iradokitzen du, kutsatu gabeko edo gutxiagotan kutsatutako pertsonekin alderatuz gero.



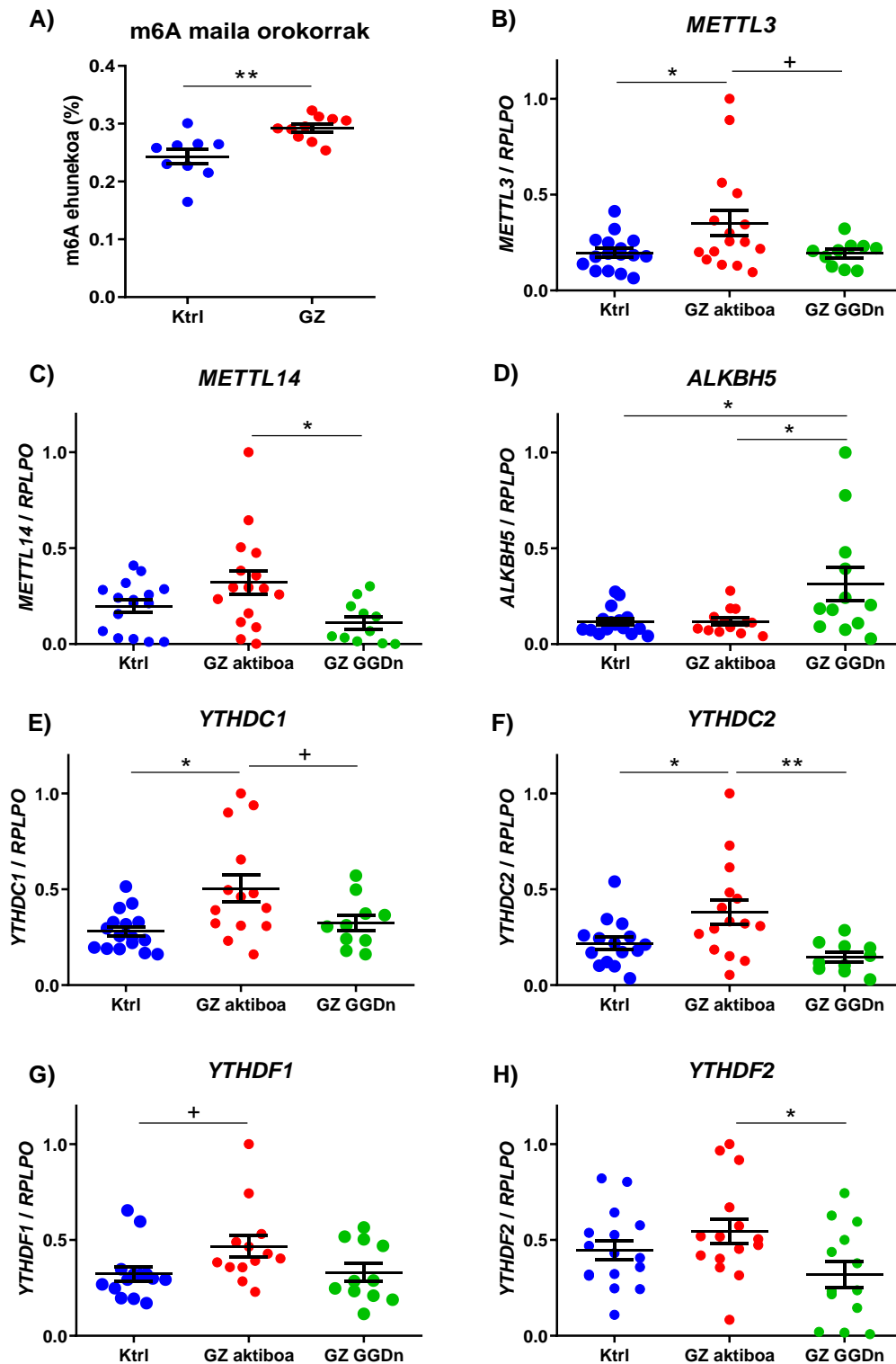
**13. irudia. A)** CXCL10 kontzentrazioa paziente zeliako (GZ) eta ez-zeliako (Ktrl) pediatrikoen serum laginetan, ELISA bide neurtuta. CXCL10 kontzentrazioa kurba estandar bat erabiliz kalkulatu zen. **B)** CXCL10 mailen eta reobirusaren aurkako serum erreaktibotasunaren arteko Pearsonen korrelazioa zeliakoetan (GZ, gorri) eta ez-zeliakoetan (Ktrl, urdinez).  $R^2$  (GZ) = 0,2001 eta  $R^2$  (Ktrl) = 0,2817. **C)** *IRF3* eta **D)** *IRF7* adierazpena hantura duten zeliakoetan (GZ aktiboa), hanturarik gabeko eta glutenik gabeko dieta gutxienez bi urtez jarraitu duten zeliakoetan (GZ GGDn) eta ez-zeliakoetan (Ktrl) hesteetako biopsia laginetan. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. \*\*\* $p < 0,001$ ; \* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  t-student, Pearsonen korrelazioa eta ANOVA analisisien arabera.

### 3. m6A metilazioa GZan

#### 3.1. m6A metilazioa eta m6A makineria GZan

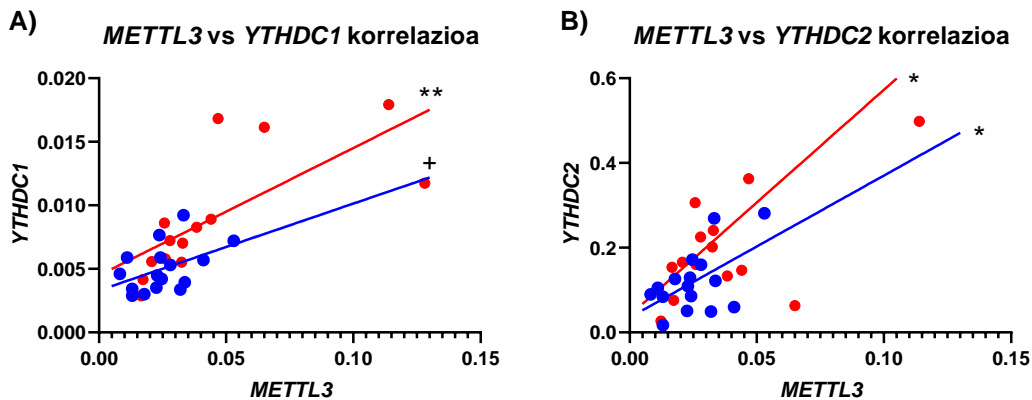
m6A RNA metilazioak sistema immunitarioaren erregulazioan parte hartzen duela egiaztatu da, eta, besteak beste, birus-infekzioetan eta autoimmunitatean inplikatur dago (Bechara & Gaffen, 2021; Brocard et al., 2017; Dang et al., 2019; Maity & Das, 2016; Shulman & Stern-Ginossar, 2020; L. Tang et al., 2021). Beraz, m6A mailak ebaluatu nahi izan genituen GZaren testuinguruan. Heste-biopsietatik erauzitako RNA erabiliz, GZa duten pazienteek, kontrol ez-zeliakoekin alderatuz gero, m6A maila nabarmen altuagoak zituztela ikusi genuen (16A irudia).

GZan m6A mailak aldatzen direla kontuan hartuta, aldaketa hori m6A makineriako kideen adierazpenaren desberdintasunaren ondorio ote den jakin nahi izan genuen. Beraz, haien adierazpena kuantifikatu genuen hesteetako biopsia laginetan (16B-H irudia). Aurrez ikusitako m6A maila altuekin bat etorrita, bi m6A idazleek adierazpen altua azaldu zuten GZ aktibodun pazienteetan. GGDpeko zeliakoen kasuan, berriz, m6A idazleen maila baxuagoa izan zen gaixotasun aktiboarekin alderatuta, kontrol ez-zeliakoen antzekoa izan zelarik. *METTL3k* desberdintasun nabarmena erakutsi zuen GZ aktibodun eta zeliakoak ez diren gizabanakoen artean (16B irudia) eta *METTL14k* GZ aktibodun eta GGDpean dauden zeliakoen artean (16C irudia). *METTL14*ren kontrako adierazpen-eredua azalduz, *ALKBH5* m6A ezabatzaileak, adierazpen handiagoa erakutsi zuen dietatik glutena ezabatzean (16D irudia). m6A irakurleei dagokienez, *YTHDC1*, *YTHDC2* eta *YTHDF1* geneen adierazpenak emendatuta daude GZ aktibodun pertsonetan, eta GGD jarraitzen duten pazienteetan zeliakoak ez diren pertsonetan ikusitako mailetara itzuli ziren (16E-G irudia). *YTHDF2k* ere adierazpen murriztua erakutsi zuen GGDpeko pazienteetan (16H irudia). Emaiza horien arabera, GZan m6A makineriaren erabateko aldaketak gertatzen dira, eta orokorrean GZ aktibodun pertsonetan adierazpen-maila altuagoa da.



**16. irudia.** A) ELISA bidez zeliakoen (GZ) eta ez-zeliakoen (Ktrl) hesteetako biopsietatik erazitako RNAn neurtutako m6A ehunekoen kuantifikazioa, B) *METTL3*, C) *METTL14*, D) *ALKBH5*, E) *YTHDC1*, E) *YTHDC2*, G) *YTHDF1* eta H) *YTHDF2*ren adierazpena hantura duten zeliakoen (GZ aktiboa), hanturarik gabeko eta glutenik gabeko dieta gutxienez bi urtez jarraitu duten zeliakoen (GZ GGDn) eta ez-zeliakoen (Ktrl) hesteetako biopsia laginetan. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; + $p < 0,1$  t-student eta ANOVA analisisien arabera.

Ondoren, m6A kideen arteko erlazioa aztertzeko, desberdin adierazten ziren kideen arteko korrelazioa kalkulatu genuen, eta *METTL3*ren adierazpenak GZdun banakoetan *YTHDC1* narekin (17A irudia) eta *YTHDC2* narekin bi taldeetan (17B irudia) korrelazionatzen duela baieztatu genuen. Gainontzeko konbinazioetan ez zen korrelaziorik atzeman.



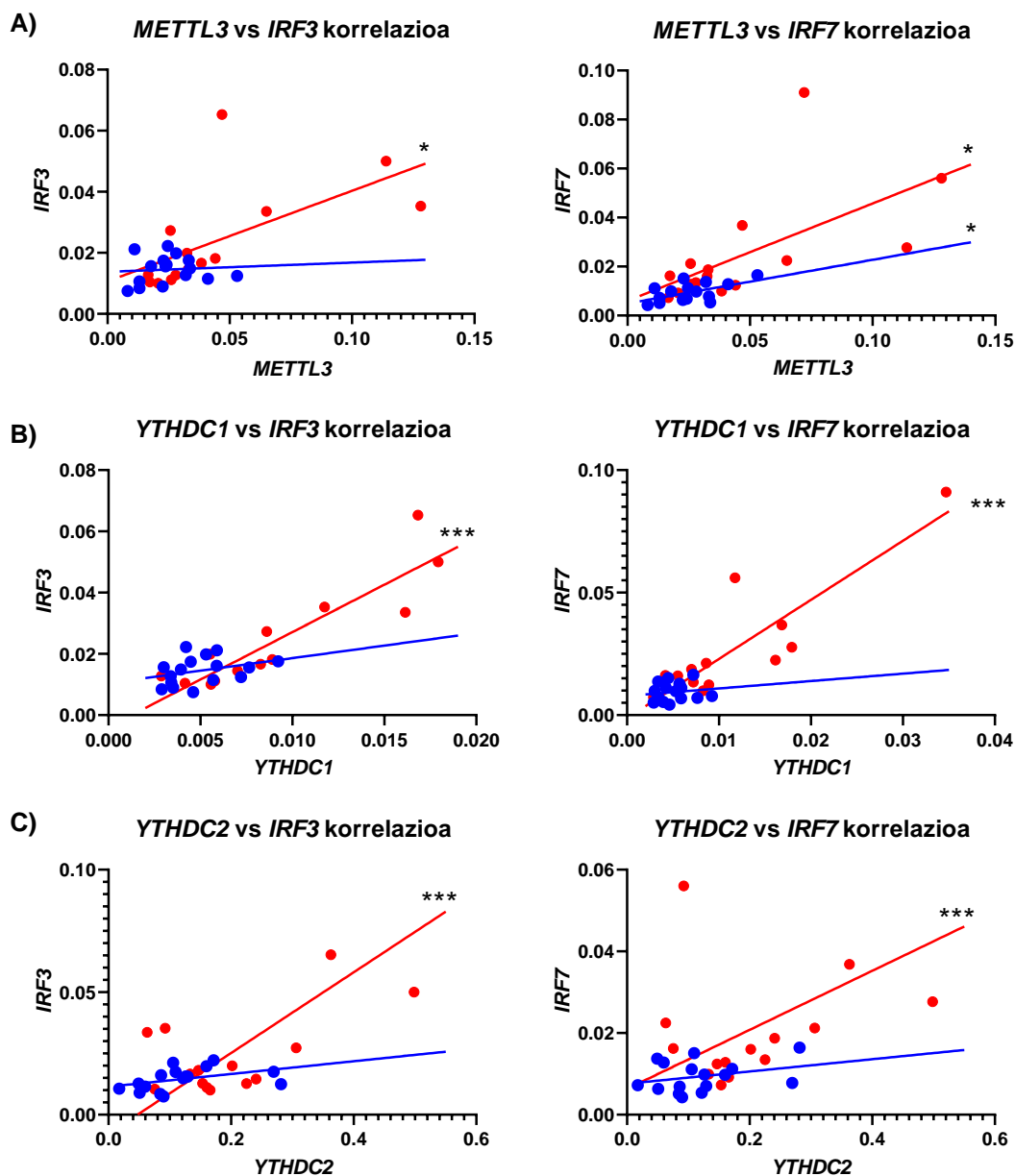
**17. irudia.** Pearson korrelazioren analisisia **A)** *METTL3* eta *YTHDC1*,  $R^2$  (GZ) = 0.5180;  $R^2$  (Ktrl) = 0.1943; eta **B)** *METTL3* eta *YTHDC2*,  $R^2$  (GZ) = 0.3541;  $R^2$  (Ktrl) = 0.2895, adierazpenen artean GZ aktibodun pazienteetan (gorriz) eta paziente ez-zeliakoetan (urdinez). \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; + $p < 0,1$ .

### 3.2. m6A makineriaren eta birusen aurkako erantzunaren arteko lotura GZan

Esan bezala, birusen aurkako erantzun immunitarioa eta m6A makineriako kideen adierazpen mailak altuagoak izan ziren GZa duten pazienteetan. Behatutako gainadierazpen hori nolabait koordinatuta egon ote zitekeen ikertzeko, *IRF3* eta *IRF7* eta *METTL3*, *YTHDC1* eta *YTHDC2* m6A makineriako kideen arteko korrelazioa kalkulatu genuen (18A-C irudia).

*METTL3* eta *IRF3*ren adierazpenen arteko korrelazioa GZ aktibodun pazienteetan bakarrik gertatzen zela egiaztatu zen (16A irudia, ezkerrean), *METTL3* eta *IRF7* geneen adierazpenak, ordea, GZan zein kontrolatan korrelazionatuta zeuden (18A irudia, eskuinean). m6A irakurleei dagokienez, batek ere ez zuen korrelaziorik erakutsi kontrolaldean (18B, C irudia). Hala ere, *YTHDC1*ren adierazpena korrelazionatua zegoen GZdun pazienteetan *IRF3* zein *IRF7*rekin (18B irudia). Gauza bera gertatu zen *YTHDC2*rekin (18C irudia).

Emaizta hauek lotura hirukoitza iradokitzen dute m6A, birusen aurkako erantzunaren aktibazioa eta GZaren patogeneziaren artean. GZan birusen aurkako *IRF3* eta *IRF7* mRNA molekulen eta m6A makineriako zein kideen arteko korrelazioa, eta m6A metilazioak birusen aurako erantzun immunitarioan eta hanturan duen inplikazioa (J. Luo et al., 2021; Winkler et al., 2019) kontuan hartuta, gure datuek m6A makineriako alterazioek GZaren garapenean eragina izan dezaketela adierazten dute, agian IRF7ren modulazioaren bidez.



**16. irudia.** Pearson korrelazioaren analisia **A)** *METTL3* eta *IRF3* (ezkerrean),  $R^2$  (GZ) = 0.3806;  $R^2$  (Ktrl) = 0.0062; eta *IRF7* (eskuinean),  $R^2$  (GZ) = 0.3712;  $R^2$  (Ktrl) = 0.3167; **B)** *YTHDC1* eta *IRF3* (ezkerrean),  $R^2$  (GZ) = 0.8040 ;  $R^2$  (Ktrl) = 0.1097; eta *IRF7* (eskuinean),  $R^2$  (GZ) = 0.7694;  $R^2$  (Ktrl) = 0.218; eta **C)** *YTHDC2* eta *IRF3* (ezkerrean),  $R^2$  (GZ) = 0.8433;  $R^2$  (Ktrl) = 0.1783; eta *IRF7* (eskuinean),  $R^2$  (GZ) = 0.5879;  $R^2$  (Ktrl) = 0.0868, adierazpenen artean. \*\*\* $p$ <0,001; \* $p$ <0,05.

#### 4. Birus-infekzioen eta gluten-kontsumoaren konbinazioaren ebaluazioa hesteetan: PIC+PTG *in vitro* eredua HCT-15 heste-zeluletan

##### 4.1. m6A makineria PIC+PTG *in vitro* eredu

Kontuan izanik glutenaren kontsumoa dela GZaren patogenesisia eragiten duen ingurumen-faktore ezagun nagusia, eta birus-infekzioak gaixotasunaren garapenean ingurumen-faktore gehigarri gisa parte hartu dezaketela proposatu dela, bi faktore horiek GZaren testuinguruan m6A makineriako kideen adierazpenean nola eragin zezaketen jakin nahi genuen. Hala, birus-infekzioen eta glutenaren kontsumoaren eragin bateratua ikertzeko, *in vitro* eredua sortu genuen, heste-zelulak lehendabizi mimetiko biral batekin tratatuz eta ondoren pepsina eta tripsinaz digeritutako gliadinarekin (PTG) estimulatuz. Gliadina glutenaren frakzio immunogenoa da. Azido poliinosi-deoxizidiliko (Poly (I:C) edo PIC) dsRNA molekula sintetiko bat da, zeina birus-mimikotzat hartzen den zeluletan transfektatzean, RIG-I-MAVS bidezidorra aktibatzen duelako (Dauletbaev, Cammisano, Herscovitch, & Lands, 2015), reobirusetik eratorritako RNAren antzera. Beraz, reobirus infekzioen ordezeko egokia da *in vitro* esperimentuetan erabiltzeko.

*In vitro* eredu honen helburu nagusia GZdun pazienteen hesteetan gerta daitekeena islatzea zen. Horretarako, hesteetako HCT-15 zelula lerro epiteliala PIC birus-mimikoarekin tratatu genuen 24 orduz. Medioa aldatu ondoren, zelulak 16 orduz inkubatu, eta gero, PTGrekin estimulatu ziren. Eredu honek glutena kontsumitu aurreko birus-infekzio bat simulatzen du *in vitro*.

Nahiz eta jakin birus-infekzioen ondorioz kutsatutako zeluletan m6A mailak aldatu egiten direla (Dang et al., 2019) eta PTGk hestee-zeluletan duen eragina lehenago deskribatu den (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021), ez dago informaziorik PICak HCT-15 heste-zeluletan m6A metilazioan duen eraginari buruz. Beraz, PICak m6A maila orokorrean duen eragina ebaluatu genuen lehenik, eta ikusi genuen PIC tratamenduak m6A maila altuagoak eragin zituela hesteetako zeluletan (19A irudia). m6A mailen igoera horrek

GZa duten pazienteetan ikusitako maila altuak islatzen dituzenez, gure PIC+PTG erudian m6A makineriako kideen adierazpena analizatu genuen jarraian. Analisi horietan m6A makineriako kide batzuetan adierazpen-aldaketa esanguratsuak behatu genituen PIC edota PIC+PTGz estimulatutako zeluletan (7. taula eta 19B-H irudia).

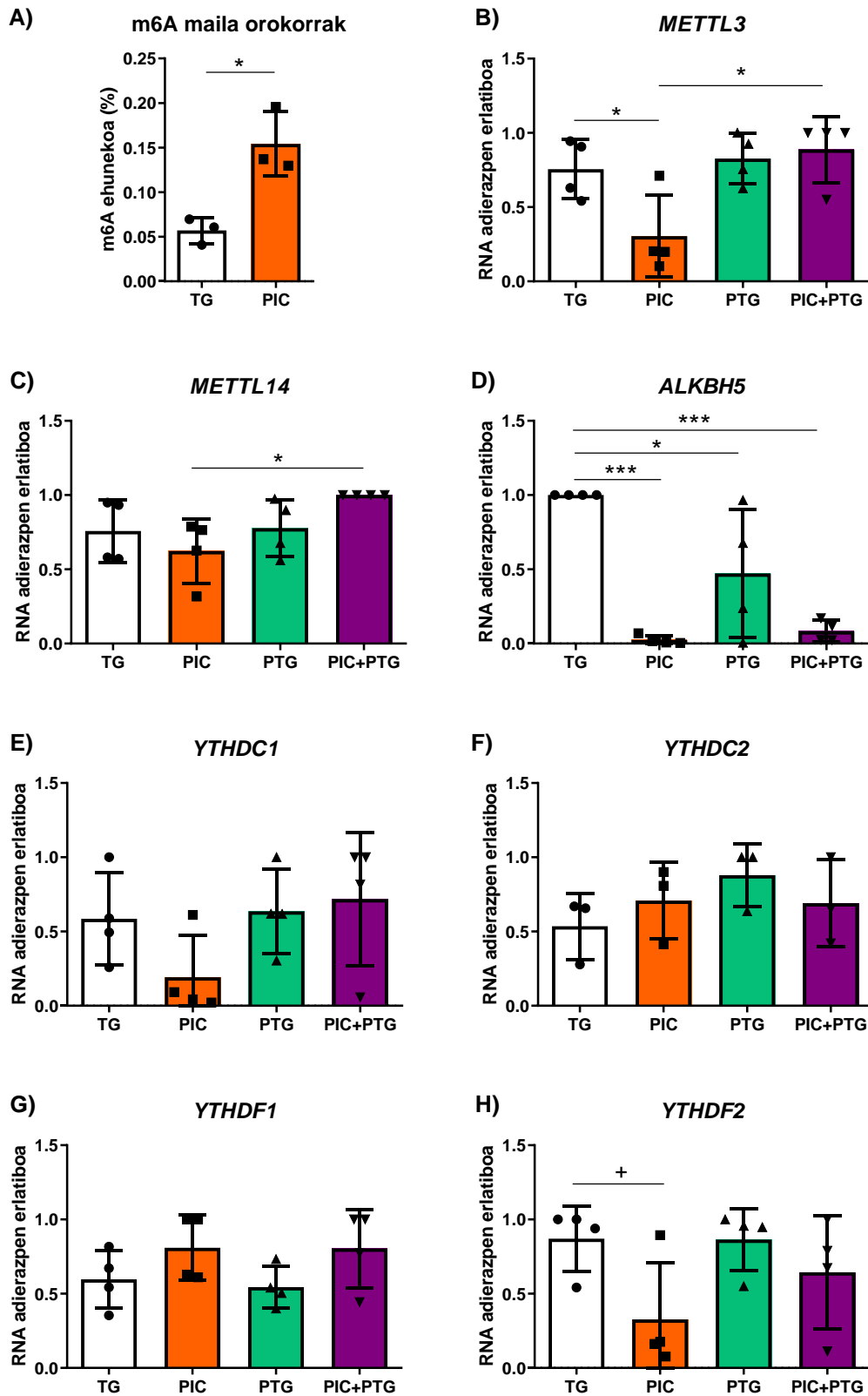
**7. Taula.** m6A makineriako kideen adierazpen desberdintasunak PIC+PTG erudian \*\*\* $p < 0,001$  eta \* $p < 0,05$  ANOVA analisisen arabera.

m6A makineriako kideak	PIC	PTG	PIC+PTG
<i>METTL3</i>	↓ <sup>+</sup>	≈	↑ <sup>*</sup>
<i>METTL14</i>	↓	≈	↑ <sup>*</sup>
<i>ALKBH5</i>	↓ <sup>***</sup>	↓ <sup>*</sup>	↓ <sup>***</sup>
<i>YTHDC1</i>	↓	≈	≈
<i>YTHDC2</i>	↑	↑	≈
<i>YTHDF1</i>	↑	≈	↑
<i>YTHDF2</i>	↓ <sup>+</sup>	≈	↓

PIC tratamendu soilak m6A makineriako kide gehien azpiadierazpenerako joera eragin zuen. *METTL3* m6A idazlearen (19B irudia) eta *YTHDF2* irakurlearen kasuan (19H irudia), desberdintasuna ia esanguratsua izan zen. Soilik *ALKBH5* ezabatzaileak azaldu zuen adierazpenaren murrizketa esanguratsua (19D irudia). Aitzitik, *YTHDC2* (19F irudia) eta *YTHDF1* (19G irudia) m6A irakurleak apur bat gainadierazita zeuden.

PTG estimulazio soilak *ALKBH5* eta *YTHDC2*ren adierazpenean aldaketak eragin zituen, *ALKBH5*en adierazpena murriztua zegoen (19D irudia), hesteetako biopsietan ikusitako adierazpen-ereduarekin bat etorrita. *YTHDC2* mailak igo egin ziren, nahiz eta oso gutxi (19F irudia).

Eredu honetan behatutako aldaketa nabarmenenak PIC eta PTG konbinatu ostekoak izan ziren. *METTL3* (19B irudia) zein *METTL14* (19C irudia) m6A idazleek gainadierazpen esanguratsua erakutsi zuten PICen bakarkako tratamenduarekin alderatuz gero. *ALKBH5*ek oso adierazpen baxua zuen, zelulak PICen tratamendu soilpean zeudenaren antzekoa. m6A irakurleei dagokienez, *YTHDC1* eta *YTHDC2* adierazpenak tratamendurik gabeko (TG) egoeraren antzekoak izan ziren, eta *YTHDF1* eta *YTHDF2*renak, PICen tratamendu soilaren antzekoak (19E-H irudia).



**19. irudia.** **A)** ELISA bidez PIC birus-mimetikoaz 24 orduz tratatutako eta tratamendurik gabeko (TG) HCT-15 zeluletatik erazitako RNA<sup>n</sup> neurtutako m6A ehunekoen kuantifikazioa. **B)** *METTL3*, **C)** *METTL14*, **D)** *ALKBH5*, **E)** *YTHDC1*, **F)** *YTHDC2*, **G)** *YTHDF1* eta **H)** *YTHDF2* adierazpen-mailak PIC tratamenduarekin tratatutako (PIC), gliadinarekin estimulatutako (PTG), PIC eta PTGz tratatutako (PIC+PTG) eta tratamendurik gabeko (TG) HCT-15 zeluletan. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen.\*\*\*p<0,001;\*p<0,05;+p<0,1 t-student eta ANOVA analisisen arabera.



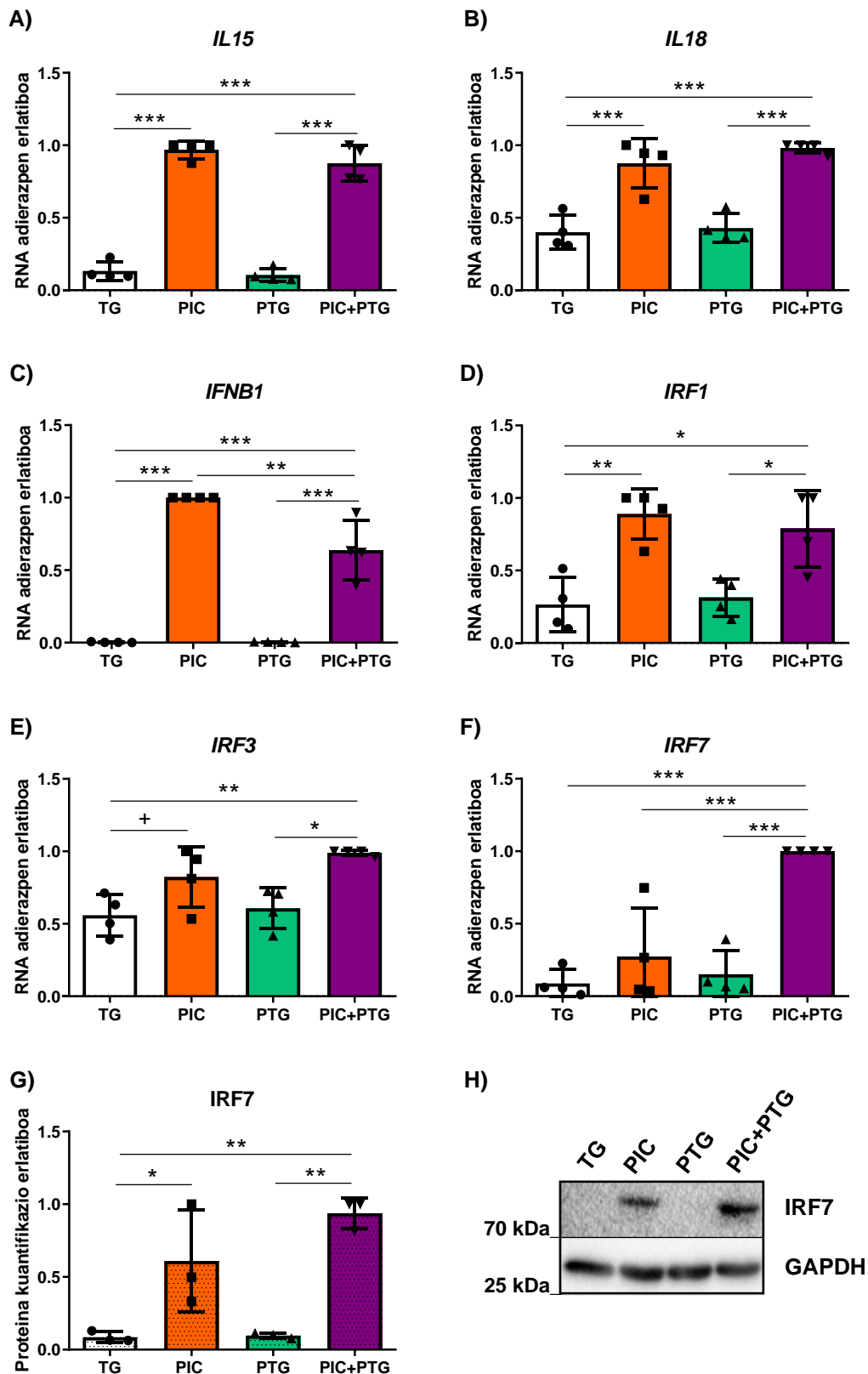
#### 4.2. Hantura-transkribatuak eta birusen aurkako transkribatuak PIC+PTG *in vitro* ereduan

m6A makineriako kideez gain, GZaren patogenesiarekin zerikusia dutela aurretik deskribatu diren hantura-zitokinak kodetzen dituzten geneen adierazpena ere aztertu genuen (Abadie & Jabri, 2014; Abadie et al., 2020; León et al., 2006). Zelulak PICarekin eta PIC+PTGrekin tratatzen zirenean *IL15* eta *IL18* geneen adierazpena emendatu egiten zela ikusi genuen, baina PTGrekin soilik ez (20A, B irudia).

Gainera, RNA birusen infekzioen aurkako erantzun immunitarioan inplikaturik dauden mRNA molekulen adierazpena kuantifikatu genuen (Ikushima et al., 2013; Schoggins & Rice, 2011; Uematsu & Akira, 2007). Espero bezala, PIC tratamenduak areagotu egin zuen *IFNB1*, *IRF1*, *IRF3* eta *IRF7*en transkripzio maila (20C-F irudia). Interesgarria da, *IRF7*ren adierazpena are indartsuagoa izan zela PIC tratamendua eta PTG estimulazioa konbinatu zirenean (20F irudia), PICek ez ezik PTGk ere bere gainadierazpenean eragina duela iradokiz. *IRF7*ren adierazpenaren indukzio sinergiko hau proteinen mailan ere gertatzen da (20G, H irudia). Aztertutako gene horietako bakar batean ere ez zen aldaketarik ikusi zelulak PTGrekin soilik estimulatu zirenean.

##### 4.2.1. *IRF7*ren erregulazioa PIC+PTG *in vitro* ereduan

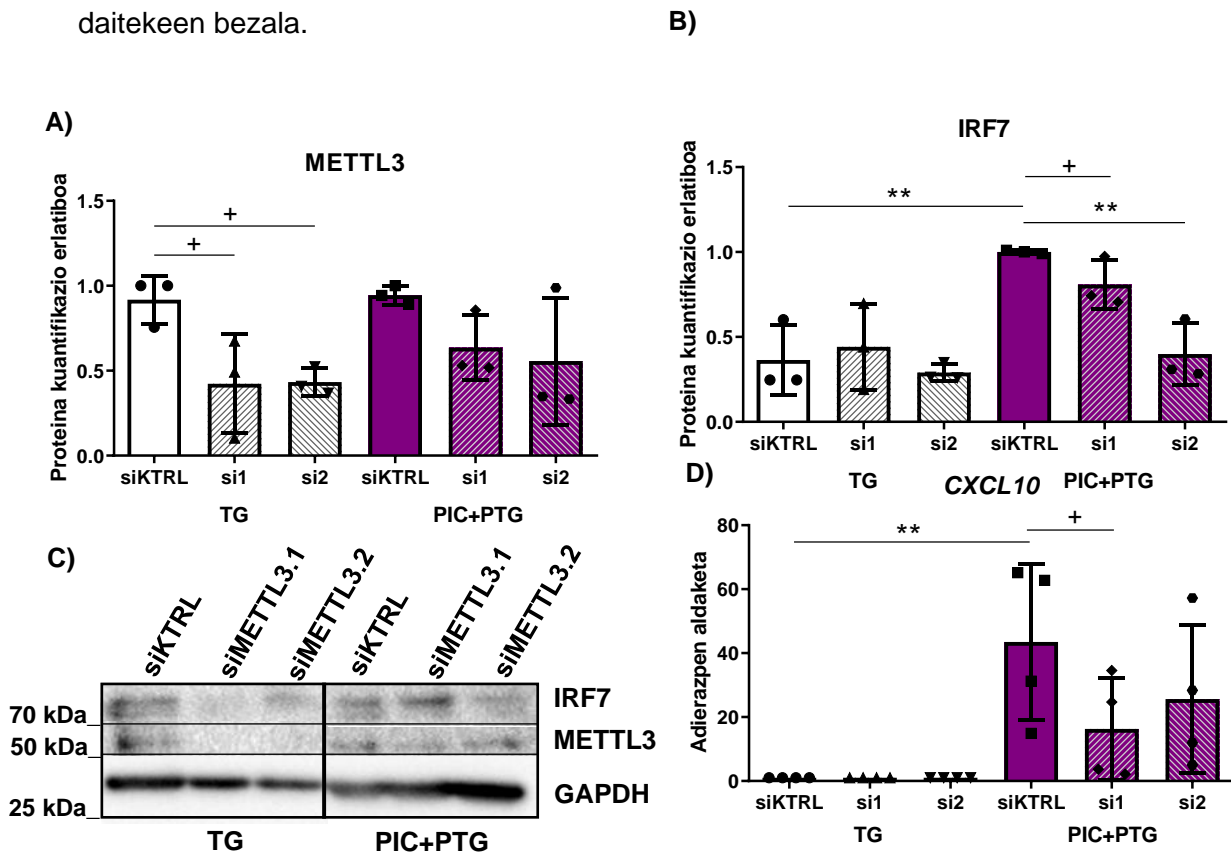
Jarraian, PIC+PTG ereduko *IRF7*aren hazkundea m6A makineriaren alterazioen ondorio izan zitekeen aztertu nahi izan genuen. Horretarako, METTL3 m6A idazlea isilarazi genuen, siRNA espezifiko bidez (21A, C irudia), eta ondoren, PIC tratamendua eta PTG estimulazioa lehen deskribatu bezala aurrera eraman ziren. Horrela, baldintza hauetan ere PIC tratamendua eta PTG estimulazioa konbinatzeak *IRF7* maila handitzea eragin zuela baieztatu genuen. Hala ere, gainadierazpen hau ez zen ikusi METTL3 isilarazi zenean (21B, C irudia).



**20. irudia.** A) *IL15* eta B) *IL18* hantura-zitokinen eta C) *IFNβ1*, D) *IRF1*, E) *IRF3* eta F) *IRF7* birusen aurkako transkribatuen adiezapen analisia; eta G-H) *IRF7* proteina mailak adierazpen-mailak PIC tratamenduarekin tratatutako (PIC), gliadinarekin estimulatutako (PTG), PIC eta PTGz tratatutako (PIC+PTG) eta tratamendurik gabeko (TG) HCT-15 zeluletan. RNA edo proteina laginen grafikoak atzealde lisoan edo puntu-ereduarekin adierazi dira, hurrenez hurren. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. Proteina kuantifikazioa ImageJ software bidez egin zen. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; + $p < 0,1$  ANOVA analisisen arabera.

IRF7ren erregulazioak ibaian beherako birusen aurkako zitokinei eragiten dien ebaluatzeko, *CXCL10* adierazpena aztertu genuen, GZdun paziente pediatrikoen serumean maila altuak daudela kontuan izanda (15. irudia). IRF7rekin ikusitako eragin bera behatu genuen, PIC+PTGk *CXCL10* adierazpenaren igoera orokorra eragiten duela, baina METTL3 isilarazten denean murrizten dela (21D irudia), hain zuzen.

Oro har, emaitza hauek m6A makineriak PIC tratamenduaren eta PTG estimulazioaren ondoriozko IRF7ren indukzioan parte hartzen duela adierazten dute, eta IRF7, neurri batean behintzat, m6A-menpeko mekanismoen bidez erregulatu daitekeela iradokitzen dute. Gainera, IRF7ren m6A bidezko erregulazioaren efektu hori birusaren aurkako ibaian beherako erantzunean ere mantentzen da, *CXCL10*ren adierazpenean ikusi daitekeen bezala.



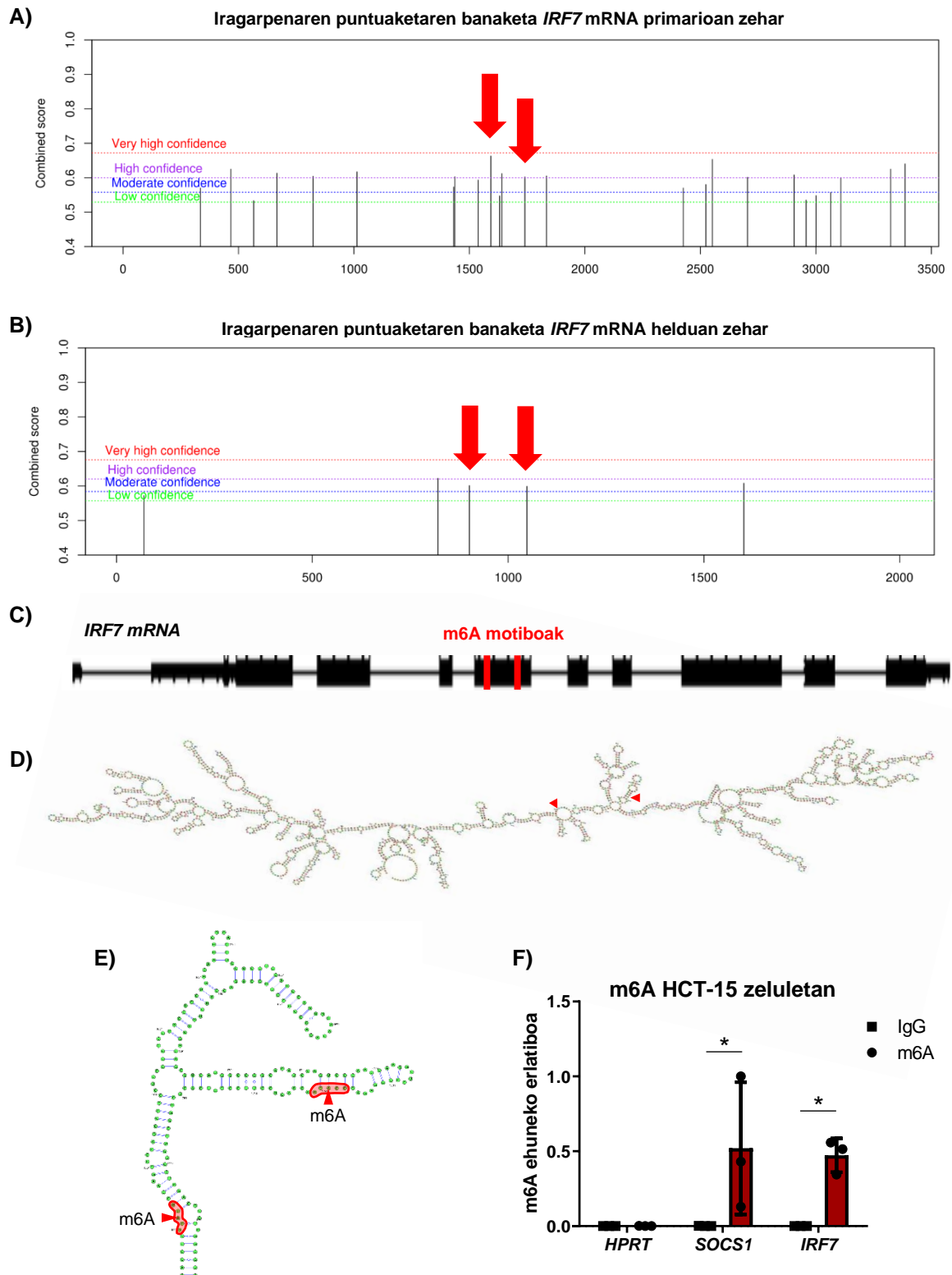
**21. irudia.** A-C) METTL3 eta IRF7 proteina-mailak eta D) *CXCL10*ren adierazpena PIC eta PTGz tratatutako (PIC+PTG) eta tratamendurik gabeko (TG) eta METTL3 isilarazteko (si1 eta si2) eta kontrol gisa erabilirako (siKTRL) siRNA molekula transfektatutako HCT-15 zeluletan. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. Proteina kuantifikazioa ImageJ software bidez egin zen. \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; + $p < 0,1$  ANOVA analisisen arabera.

## 5. m6A bidezko IRF7ren erregulazioa

### 5.1. m6A motiboen iragarpena eta IRF7 mRNAren metilazioa baieztatzea

*IRF7* mRNAk ez du REPIC datu-basean (S. Liu, Zhu, He, & Chen, 2020) erregistratutako m6A motiborik. Hala ere, datu-base honek ez du ehun eta zelula-lerro batzuei buruzko informaziorik, besteak beste HCT-15 hesteetako zelula-lerroarena. Horregatik, SRAMP iragarpen zerbitzaria erabili genuen (Zhou et al., 2016) *IRF7*ren mRNA sekuentzian m6A motibo posibleak aztertzeko. *IRF7* transkribatu primarioa (22A irudia) eta transkribatu heldua (22B irudia) ebaluatu genituen, eta puntuaziorik altuena zuten eta m6A kontsentsu-motibo ohikoenarekin bat zetozen (Dominissini, Moshitch-Moshkovitz, Salmon-Divon, Amariglio, & Rechavi, 2013; Dominissini et al., 2012; Meyer et al., 2012) bi motiboak hautatu genituen m6A metilaziorako gure aztergaitzat. Bi m6A motibo hauek *IRF7*ren seigarren exoian daude (22C irudia) eta elkarrengandik nahiko gertu, mRNA helduaren konformazio bilduaren arabera (22D, E irudia).

*IRF7* mRNA sekuentziako m6A motiboak hautatu ondoren, haien *in vitro* metilazio egoera analizatu nahi izan genuen. Horretarako, aurreikusitako bi m6A motibo horiek dauden eskualdearen albo banatan kokatutako hasle espezifikokoak diseinatu genituen, eta m6A RNA immunoprezipitazioa burutu genuen, qPCR bidezko analisisia baino lehen (meRIP-qPCR). Prozedura hau erabiliz, *IRF7* sekuentzia kodetzailean aurreikusitako bi m6A guneak HCT-15eko heste-zeluletan metilatuta daudela baieztatu genuen (22F irudia), SRAMPek egindako iragarpena baliozkotuz.



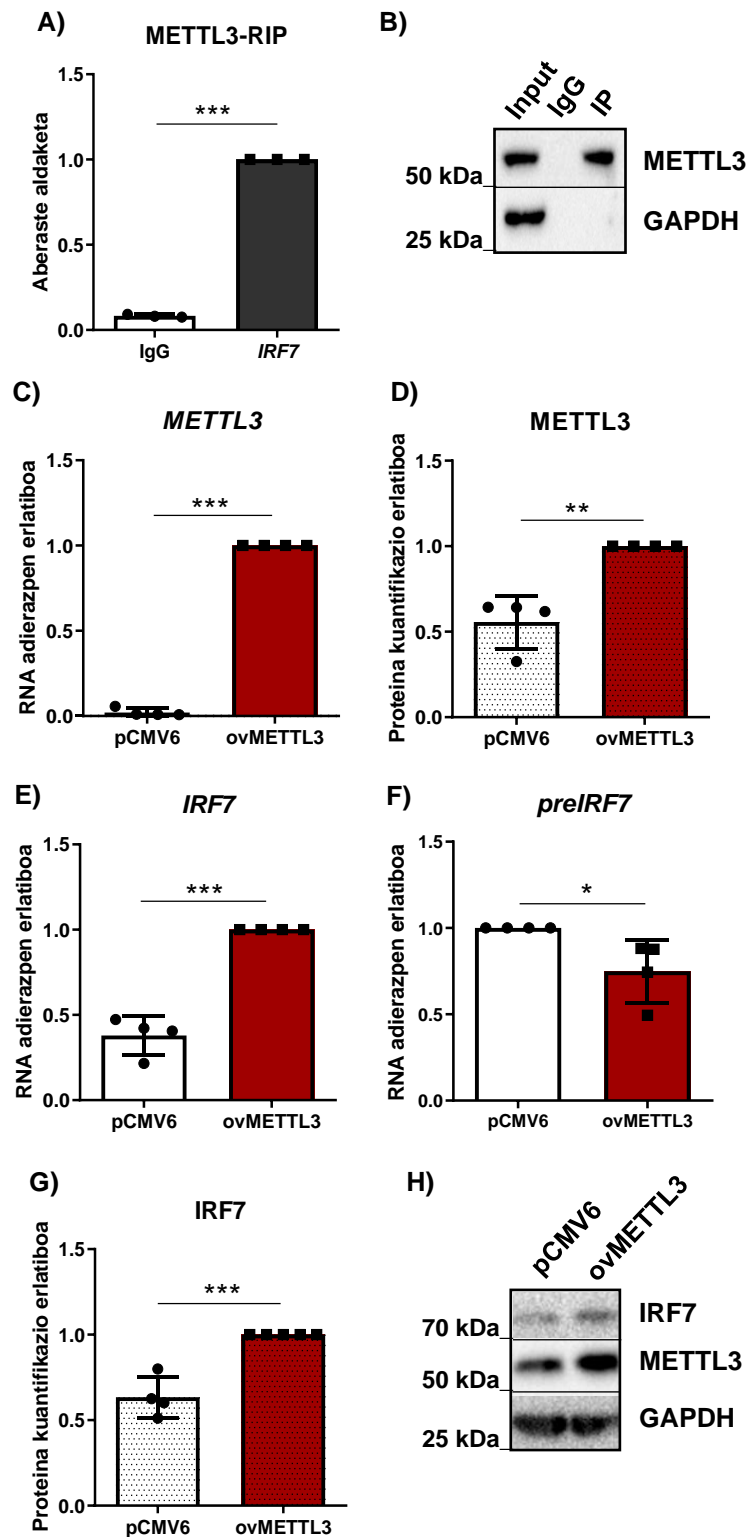
**22. irudia.** SRAMP iragarpen zerbitzariaren bitartez lortutako m6A motiboaren iragarpen balioak **A)** *IRF7* mRNA primarioa eta **B)** *IRF7* mRNA heldua input gisa erabiltzean. Gezi gorriek hautagaitzat hartutako m6A motiboak adierazten dituzte. **C)** *IRF7* mRNA primarioaren irudikapen eskematikoa m6A motibo hautagaien kokapena gorri adieraziz. **D)** *IRF7* mRNA helduaren bigarren egitura RNAfold software bidez. **E)** m6A gune hautagaiak kokatuta dauden zoom bidez gerturatutako eremuaren bigarren egitura, SRAMP iragarpen zerbitzariaren bitartez. **F)** m6A metilazio erlatiboaren konparaketa *IRF7* mRNAren eta *HPRT* eta *SOCS1* mRNA-en artean, kontrol positiboa eta negatiboa, hurrenez hurren. \* $p < 0,05$  ANOVA analisisien arabera.

## 5.2. m6A makineria bidezko IRF7ren erregulazioa

### 5.2.1. *METTL3 m6A idazle bidezko IRF7ren erregulazioa*

METTL3 m6A idazle konplexuaren osagai katalizatzailea da (Xiang Wang et al., 2017; Ying Yang et al., 2018), eta PIC tratamenduaren eta PTG estimulazioaren ondoren bere adierazpena aldatu zela ikusi genuen, eta bere isilarazpenak PIC+PTG eredian gertatutako IRF7ren indukzioari eragin ziola. Beraz, m6A idazle honen eta IRF7 mailaren artean harreman zuzena ote dagoen aztertu nahi izan genuen.

METTL3 proteina *IRF7* mRNArekin lotzen den ebaluatu genuen RIP-qPCR erabiliz. qPCRrako, m6A motiboak dauden eskualdearen alboetako eta alde zentralerik erabilitako hasle berberak erabili genituen, eta METTL3 eta *IRF7* mRNAren arteko lotura zuzena frogatu genuen (23A irudia). METTL3ren immunoprecipitazio espezifikoak WB bidez egiaztatu zen (23B irudia). METTL3k *IRF7*ren adierazpen-mailetan duen eragina aztertzeko, m6A idazlea gainadierazi genuen gainadierazpen plasmido baten bidez (23C, D irudia). *IRF7* transkribatu primario eta helduaren adierazpena kuantifikatu genituen, eta ikusi genuen *IRF7* mRNA helduaren maila altua zen bitartean (23E irudia), *IRF7* mRNA primarioaren maila baxuagoa zela METTL3 gaindierazten zenean (21F irudia). *IRF7* proteina kantitateak ere aztertu ziren bi baldintzetan. *IRF7* mRNA helduaren adierazpen-ereduarekin bat etorriz, *IRF7* proteina-kantitatea handiagoa izan zen METTL3 gaindieraztean (23G, H irudia).



**23. irudia.** **A)** METTL3-*IRF7* mRNA interakzioaren kuantifikazioa METTL3ren RNA immunoprezipitazio ondorengo qPCR bidez (RIP-qPCR). Aberaste aldaketa inputaren ehuneko metodoaren bidez kalkulatu zen. **B)** METTL3 immunoprezipitazio espezifikoaren WB irudi adierazgarria. **C)** *METTL3* adierazpena, **D)** *METTL3* proteina kuantifikazioa, **E)** *IRF7* mRNA heldua eta **F)** *IRF7* mRNA primarioaren adierazpena, eta **G)** *IRF7* proteina-mailak *METTL3* gainadierazitako (ovMETTL3) eta gainadierazpenik gabeko (pCMV6) zeluletan. **H)** *METTL3* gainadierazpenaren eta *IRF7* indukzioaren WB irudi adierazgarria. RNA edo proteina laginen grafikoak atzealde lisoan edo puntu-ereduarekin adierazi dira, hurrenez hurren. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. Proteina kuantifikazioa ImageJ software bidez egin zen. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; + $p < 0,1$  t-student analisien arabera.

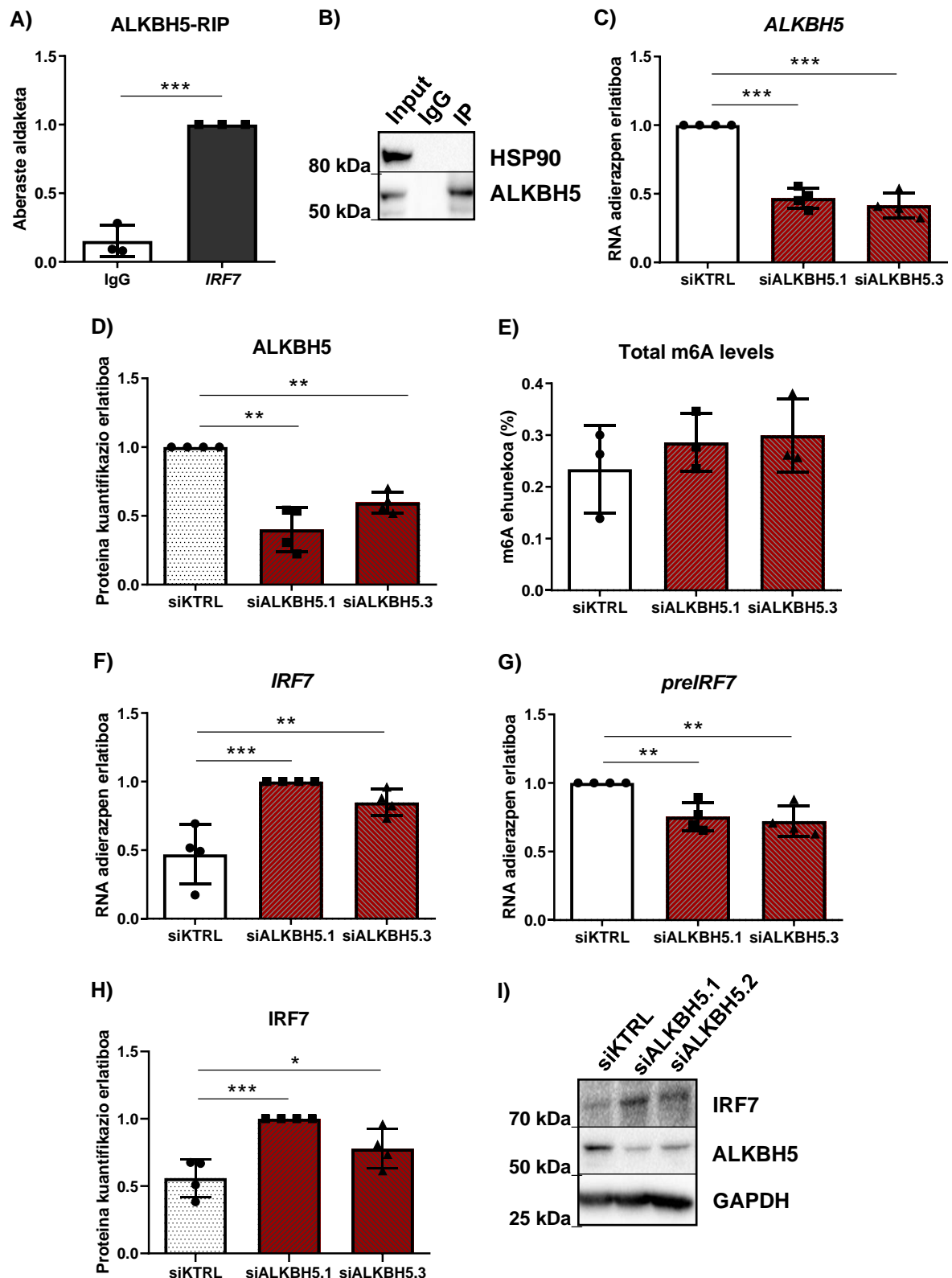
### 5.2.2. *ALKBH5 m6A ezabatzaile bidezko IRF7ren erregulazioa*

ALKBH5 ezagunak diren bi m6A ezabatzaileetako bat da, FTOfekin batera. Hala ere, FTOfen aldean, ALKBH5ek substratuarekiko espezifikotasuna du eta m6A marketara besterik ez da lotzen (Mauer et al., 2017; Zou et al., 2016). Gainera, birus-infekzioen ondoren azpiadierazita dago (Y. Liu et al., 2019; A. Wang et al., 2022), PIC+PTG eremuan ikusi genuen bezala.

METTL3ekin egin bezala, lehendabizi ALKBH5 eta *IRF7* mRNAren arteko interakzioa aztertu genuen RIP-qPCR bidez. ALKBH5 m6A guneak dauden *IRF7*ren sekuentzia kodetzaileraren eskualdera lotzen dela egiaztatu genuen (24A irudia). ALKBH5en immunoprezipitazioa WB bidez konfirmatu zen (22B irudia). Ondoren, ALKBH5 isilarazi genuen siRNA espezifikoeekin (24C, D irudia), m6A-aberatsa zen eszenatoki bat sortuz (24E irudia). m6A maila altuen ildoan eta METTL3 gainadieraztean ikusitako emaitzekin bat etorrita, *IRF7* mRNA helduak adierazpen altua izan zuen ALKBH5 isiltzen denean (24F irudia). Lehen ikusi bezala, *IRF7*ren transkribatu primarioak helduaren kontrako adierazpen-eredua erakutsi zuen (24G irudia). Azkenik, ALKBH5 mailak murrizten direnean IRF7 proteina kantitatea handitzen dela ikusi genuen (24H, I irudia).

Emaitza hauek, oro har, PIC+PTG eredu gure aurreko behaketak sendotzen dituzte, eta m6A metilazioak IRF7ren erregulazioan, bai RNA mailan, bai proteina mailan, eragina duela, eta erregulazio hau METTL3 m6A idazlearen eta ALKBH5 ezabatzailearen bidezkoa dela baieztatzen dute. Gainera, badirudi m6A metilazioak modu positiboan erregulatzen duela IRF7ren adierazpena.





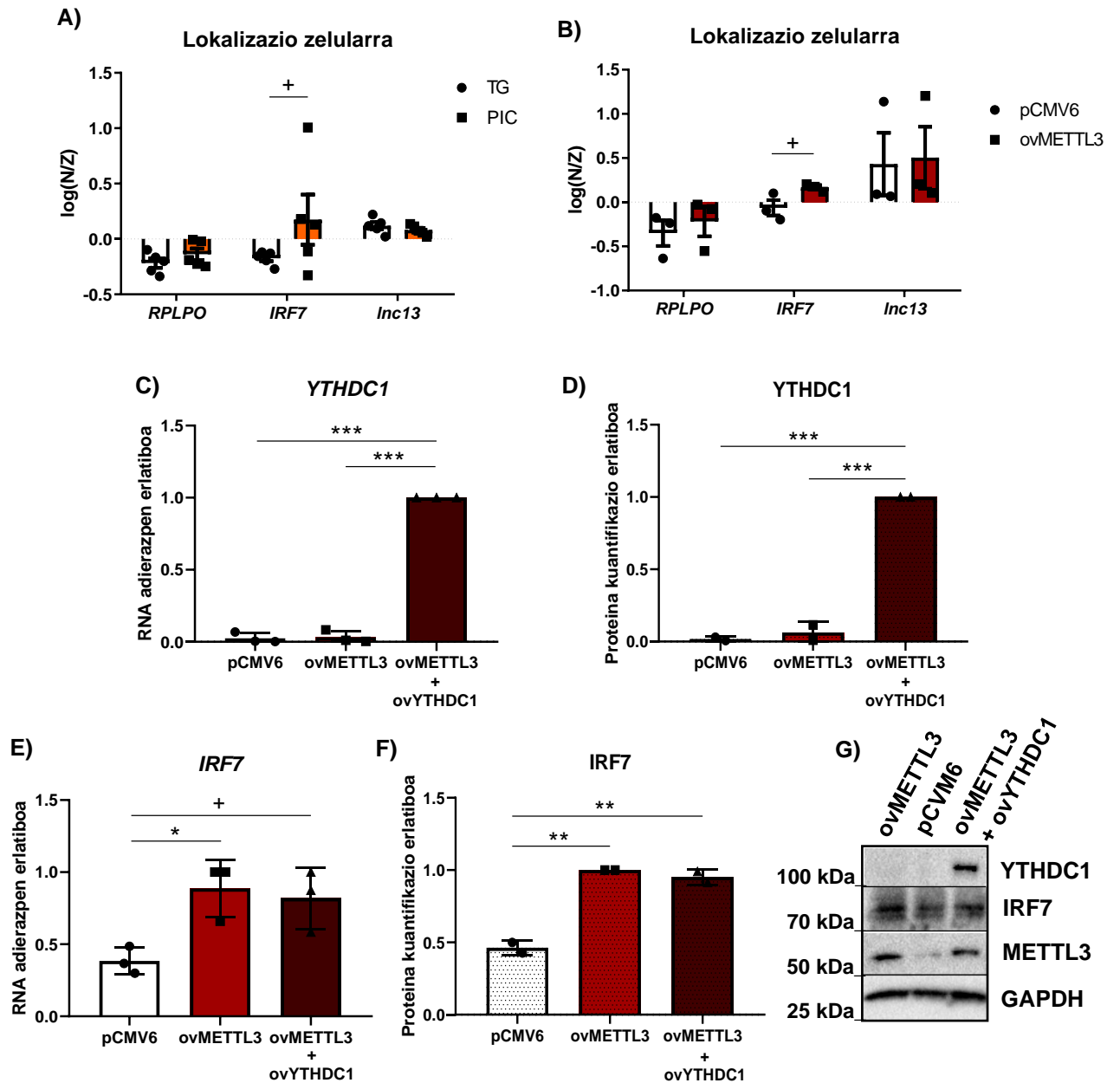
**24. irudia.** **A)** ALKBH5-IRF7 mRNA interakzioa kuantifikazioa ALKBH5 RNA immunoprecipitation ondorengo qPCR bidez (RIP-qPCR). Aberaste aldaketa inputaren ehuneko metodoaren bidez kalkulatu zen. **B)** ALKBH5en immuniprezipitazio espezifikoaren WB irudi adierazgarria. **C)** m6A ehunekoa, **D)** ALKBH5 adierazpena, **E)** ALKBH5 proteina kuantifikazioa, **F)** IRF7 mRNA heldua eta **G)** IRF7 mRNA primarioaren adierazpena, eta **H)** IRF7 proteina-mailak ALKBH5ren aurkako siRNAekin (si1 edo si3) edo kontrol gisa erabilitako (siKTRL) transfektatutako zeluletan. **I)** ALKBH5 isilarazpenaren eta IRF7 indukzioaren WB irudi adierazgarria. RNA edo proteina laginen grafikoak atzealde lisoan edo puntu-ereduarekin adierazi dira, hurrenez hurren. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta RPLPO gene endogeno gisa erabili zen. Proteina kuantifikazioa ImageJ software bidez egin zen. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$  t-student eta ANOVA analisisen arabera.

### 5.3. m6Aren eragina *IRF7* mRNAren metabolismoan

#### 5.3.1. *m6Aren eragina *IRF7* mRNAren lokalizazioan*

m6A markak transkribatu jakin batzuetan esportazio-seinaletzat hartzen dira (Lesbirel & Wilson, 2019), eta birus-infekzioetan, ALKBH5ek hainbat birusen aurkako transkribatu desmetilatzen dituela deskribatu da, hauek nukleoan atxikitzeko eta birusen aurkako berezko erantzun immunitarioa inhibitzeko (Q. Zheng et al., 2017). Hori kontuan hartuta, m6A metilazioak eta birus-infekzioek *IRF7* mRNAren lokalizazioan eragina ote duten jakin nahi izan genuen. Horrela, hesteetako zelulak zatiki nuklear eta zitoplasmatikoetan banatu ziren eta *IRF7* transkribatu maila bietan kuantifikatu zen. PIC birus-mimikoak *IRF7* mRNAren lokalizazioan eraginik duen ebaluatu genuen lehenik, eta ohartu ginen baldintza basaletan zitoplasman zegoela, baina PIC tratamenduaren ondoren, nukleoan ere antzematen zela (25A irudia). METTL3 m6A idazlea gainadieraztean, *IRF7* mRNA molekulak nukleoan ageri ziren nagusiki (25B irudia).

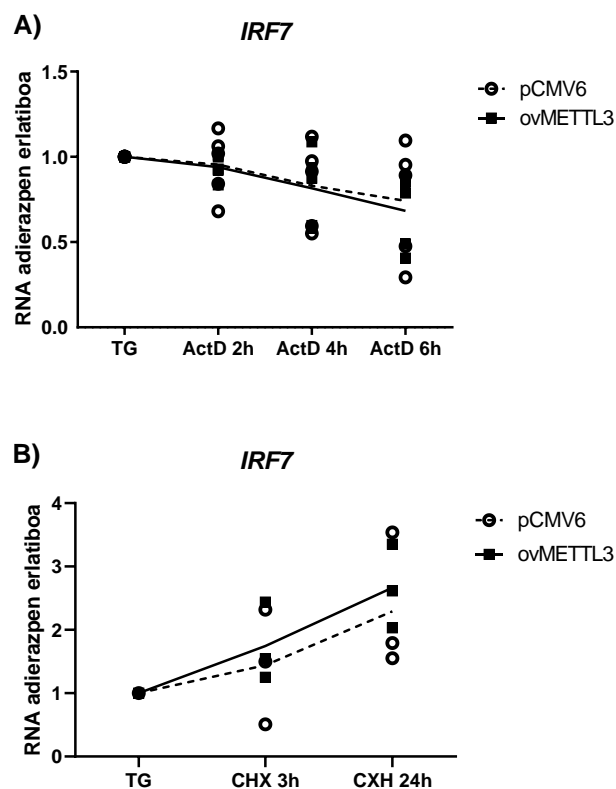
YTHDC1 m6A irakurleak m6A markak ezagutu eta m6Adun mRNA molekulen zitoplasmarako lekualdatzea induzitzen du, SRSF3 eta NFX1 nukleo-esportatzaile faktoreen bitartez (Lesbirel & Wilson, 2019; Roundtree et al., 2017). YTHDC1-ek *IRF7*ren erregulazioan duen inplikazioa sakonago ikertzeko, YTHDC1 gainadierazi genuen METTL3-rekin batera (25C, D irudia), eta *IRF7*ren adierazpena aztertu genuen. YTHDC1ek *IRF7*ren nukleo-esportazioan eragina izanez gero, *IRF7* proteina kantitate handiagoa esperoko genuke. Ordea, ez genuen YTHDC1 gainadierazpenaren ondoriozko desberdintasunik ikusi, ez RNA mailan, ezta proteina mailan ere (25E-G irudia), YTHDC1ek prozesu honetan parte hartzen ez duela iradokiz.



**25. irudia.** *IRF7* mRNAren lokalizazio zelularra **A)** PICekin tratatutako eta tratatu gabeko (TG) zeluletan eta **B)** METTL3 gainadierazitako (ovMETTL3) eta gainadierazpenik gabeko (pCMV6) zeluletan. *RPLPO* eta *Inc13* kontrol zitoplasmiko eta nuklear gisa erabili ziren, hurrenez hurren. **C)** *YTHDC1* adierazpena, **D)** *YTHDC1* proteinaren kuantifikazioa, **E)** *IRF7* adierazpena eta **F)** *IRF7* proteinaren kuantifikazioa METTL3 gainadierazitako (ovMETTL3), METTL3 eta *YTHDC1* (ovMETTL3+ovYTHDC1) gainadierazitako eta gainadierazpenik gabeko (pMV6) zeluletan. **G)** METTL3, *YTHDC1* eta *IRF7* proteina-mailen WB irudi adierazgarria. RNA edo proteina laginen grafikoak atzealde lisoan edo puntu-ereduarekin adierazi dira, hurrenez hurren. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. Proteina kuantifikazioa ImageJ software bidez egin zen. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \* $p < 0,05$ ; + $p < 0,1$  ANOVA analisisen arabera.

### 5.3.2. m6Aren eragina *IRF7* mRNAren egonkortasunean

m6A markek mRNA molekulen egonkortasunean eragina dutela deskribatu da (Mauer et al., 2017; Shi et al., 2017; Xiao Wang et al., 2014). Hala, m6A metilazioak esportazio nuklearrean duen inplikazioa baztertu ondoren, *IRF7* mRNAko m6A markek transkribatuaren egonkortasuna alda dezaketela postulatu genuen. Hipotesi hau frogatzeko, lehenik METTL3 gainadierazi eta *de novo* transkripzioa inhibitu genuen D aktinomizina erabiliz. Ez genuen desberdintasunik ikusi bi baldintza horien artean (26A irudia). Ondoren, METTL3 gainadierazi eta *de novo* proteinaren sintesia inhibitu genuen zikloheximidarekin. *IRF7*ren adierazpena aztertu genuen, eta ez genuen aldaketa esanguratsurik ikusi (26B irudia). Emaizta hauek m6A metilazioak *IRF7* mRNAren egonkortasunean eraginik ez duela ematen dute aditzera.



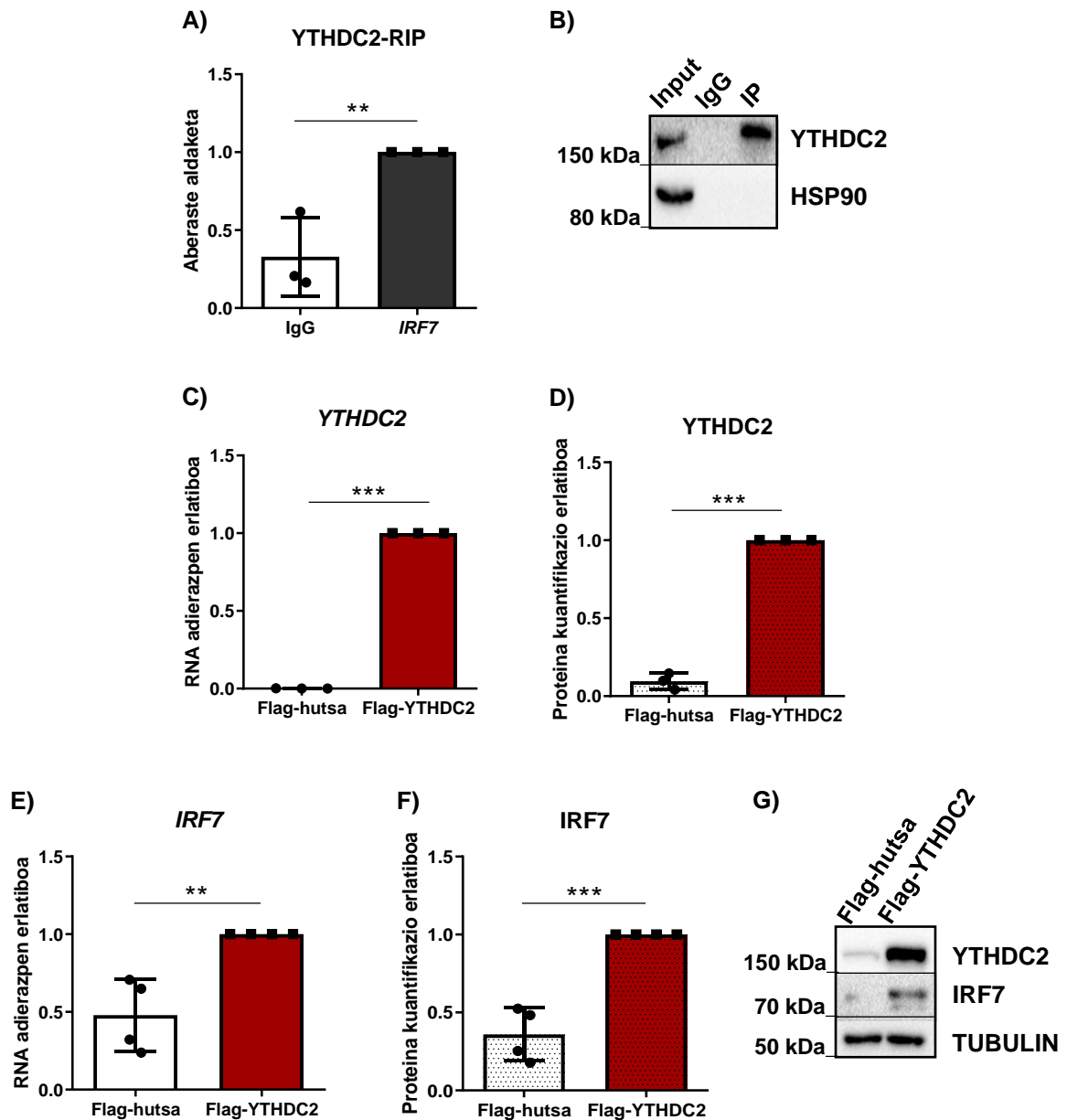
**26. irudia.** *IRF7*ren adierazpen erlatiboa METTL3 gainadierazitako (ovMETTL3) eta gainadierazpenik gabeko (pCMV6) zeluletan **A)** D Aktinomizinarekin (ActD) 2, 4, eta 6 orduz tratatu eta gero, eta **B)** zikloheximidarekin (CHX) 3 eta 24 orduz tratatu eta gero. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen.

### 5.3.3. m6Aren eragina *IRF7* mRNA itzulpenean

m6A aldaketek mRNA itzulpenaren erregulazioan ere parte hartzen dute (Xiao Wang et al., 2015; Yun Yang et al., 2017). Kontuan izanik YTHDC2 sekuentzia kodetzaileetan dauden m6A motiboetara lotzen dela batez ere (Mao et al., 2019) eta *IRF7* mRNAko m6A markak sekuentzia kodetzailean kokatzen direla, YTHDC2n zentratzea erabaki genuen.

YTHDC2 *IRF7* mRNArekin interakzioan egon zitekeela postulatu genuen. Ideia hau frogatzeko, METTL3 eta ALKBH5en arteko elkarrekintza baieztatzeke aukeratutako prozedura bera erabili genuen. Horrela, YTHDC2 proteinaren RNA immunoprezipitazioaren osteko *IRF7* mRNAren RT-qPCR kuantifikazioarekin, YTHDC2 eta *IRF7* mRNAren arteko lotura egiaztatu genuen (27A irudia). YTHDC2ren immunoprezipitazio espezifikoa WB bidez konfirmatu zen (27B irudia). YTHDC2 eta *IRF7* mRNAren arteko elkarrekintza baieztatuta, m6A irakurle honek *IRF7*n duen eragina ebaluatzeko, YTHDC2ren adierazpena areagotu genuen gainadierazpen plasmido baten bidez (27C, D irudia). *IRF7*ren adierazpena aztertu genuen, bai RNA mailan, bai proteina-mailan, eta YTHDC2 gainadierazpenak *IRF7* mRNA (27E irudia) eta proteina-kantitateak (27F, G irudia) indukzioa eragin zuela behatu genuen.

Hala, YTHDC2 m6A irakurleak *IRF7*ren erregulazioan paper garrantzitsua duela baieztatzen dute emaitza hauek. Gainera, datu hauek m6A metilazioak *IRF7* mRNAren itzulpen prozesuan duen inplikazioa ere bermatzen du.



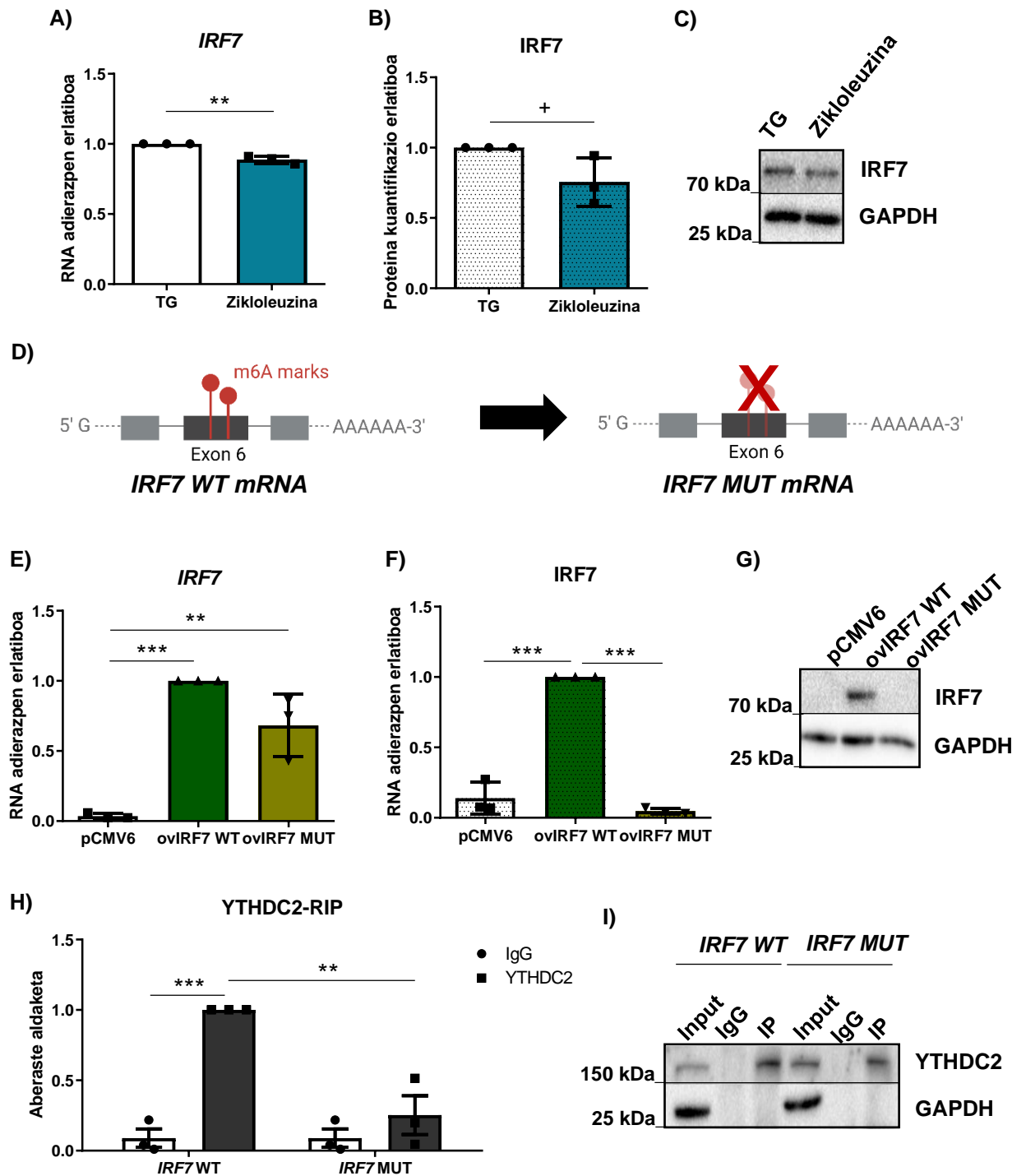
**27. irudia.** **A)** YTHDC2-IRF7 mRNA interakzioaren kuantifikazioa YTHDC2ren RNA immunoprezipitazio ondorengo qPCR bidez (RIP-qPCR). Aberaste aldaketa inputaren ehuneko metodoaren bidez kalkulatu zen. **B)** YTHDC2ren immunoprezipitazio espezifikoaren WB irudi adierazgarria. **C)** YTHDC2 adierazpena, **D)** YTHDC2 proteina kuantifikazioa, **E)** IRF7 adierazpena eta **F)** IRF7 proteina kuantifikazioa YTHDC2 gainadierazitako (Flag-YTHDC2) eta gainadierazpenik gabeko (Flag-hutsa) zeluletan. **G)** YTHDC2 gainadierazpenaren eta IRF7 indukzioaren WB irudi adierazgarria. RNA edo proteina laginen grafikoak atzealde lisoan edo puntu-ereduarekin adierazi dira, hurrenez hurren. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. Proteina kuantifikazioa ImageJ software bidez egin zen.\*\*\*p<0,001;\*\*p<0,01 t-student analisisen arabera.

#### 5.4. m6A metilazioaren ekarpena IRF7 mailen erregulazioan

IRF7ko m6A metilazioaren eragin funtzionala ikertzeko, zelulak m6Aren eraketa prozesuaren inhibitzaile zikloleuzinarekin tratatu genituen, eta *IRF7* mRNA eta proteina kantitateak aztertu genituen. IRF7ren adierazpenaren aldeak oso txikiak badira ere zikloleuzina tratamenduarekin eta tratatu gabeko egoeraren artean, IRF7ren adierazpena %10 murrizten da m6A inhibitzean (28A irudia). Proteina kantitatea ere txikiagoa da (28B irudia).

Hala eta guztiz ere, zikloleuzinak m6A metilazioaren maila orokorrean eragiten die. Beraz, *IRF7* sekuentzia kodetzaileko m6A metilazioaren funtzio espezifikoak aztertzeko, m6A markarik gabeko *IRF7* adierazpen plasmido bat sortu genuen (MUT), baieztatutako m6A motiboen adenina nukleotidoa zitosina batekin ordezkatzuz (28C irudia). Mutazioak puntualak ziren, aminoazidoen sekuentzia aldatzen ez zutenak. m6Arik gabeko (MUT) eta m6Adun (WT) *IRF7* konparatzeko, bi plasmidoen kopuru bera transfektatu zen HCT-15 heste-zeluletara, eta RNA eta proteina mailak aztertu ziren. RNA mailako *IRF7* adierazpena antzekoa izan zen WT zein MUT baldintzetan (28D irudia). Ordea, IRF7ren proteina-kantitatea nabarmen txikiagoa zela ohartu ginen m6A motiboak ezabatu zirenean (28E, F irudia), m6A motiborik ez izateak IRF7 proteina-sintesia eragozten duela adieraziz.

Emaitza hauek kontuan hartuta, eta YTHDC2k m6A menpeko itzulpena sustatzen duela eta IRF7 mRNArekin lotzen dela buruan izanik, m6A motiborik ez dagoenean ikusitako proteinen sintesiaren gabezia YTHDC2 eta IRF7 mRNAren arteko interakzio gutxituagatik izan ote zitekeen jakin nahi izan genuen. Horregatik, WT edo MUT IRF7 gainadierazten ziren baldintzak alderatuz YTHDC2-RIPa burutu genuen, eta RT-qPCR bidez *IRF7* kuantifikatu. Prozedura hau erabiliz, YTHDC2 m6A irakurlearen eta *IRF7* mRNA arteko elkarrekintza m6A markarik ezean desagertua zegoela baieztatu genuen (28G irudia). Oro har, emaitza hauek m6A metilazioa eta YTHDC2-*IRF7* mRNA lotura IRF7 proteina-sintesisirako beharrezkoak direla erakutsi zuten.



**28. irudia.** **A)** *IRF7* adierazpena eta **B)** *IRF7* proteina kopurua zikloleuzinarekin tratatutako zeluletan eta tratatu gabeko (TG) zeluletan. **C)** *IRF7* proteina-mailen WB irudi adierazgarria. **D)** A→C mutazioa puntual isilaren bidezko m6A motiboen deuseztatzearen irudi eskematikoa. BioRenderrekin sortutako irudia. **E)** *IRF7* adierazpena eta **F)** *IRF7* proteinen kuantifikazioa, m6A adun (WT) eta m6Arik gabeko (MUT) *IRF7* gainadierazitako eta gainadierazpenik gabeko (pCMV6) zeluletan. **G)** *IRF7* proteina-mailen WB irudi adierazgarria. **H)** YTHDC2-*IRF7* mRNA interakzioaren kuantifikazioa YTHDC2 RNA immunoprecipitation ondorengo qPCR bidez (RIP-qPCR) zelulak WT edo MUT *IRF7* gainadierazpen plasmidoarekin transfektatzean. Aberaste aldaketa inputaren ehuneko metodoaren bidez kalkulatu zen. **I)** YTHDC2ren immunoprezipitazioa espezifikoaren WB irudia. RNA edo proteina laginen grafikoak atzealde lisoan edo puntu-ereduarekin adierazi dira, hurrenez hurren. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. Proteina kuantifikazioa ImageJ software bidez egin zen. \*\*\* $p < 0,001$ ; \*\* $p < 0,01$ ; + $p < 0,1$  t-student eta ANOVA analisisien arabera.



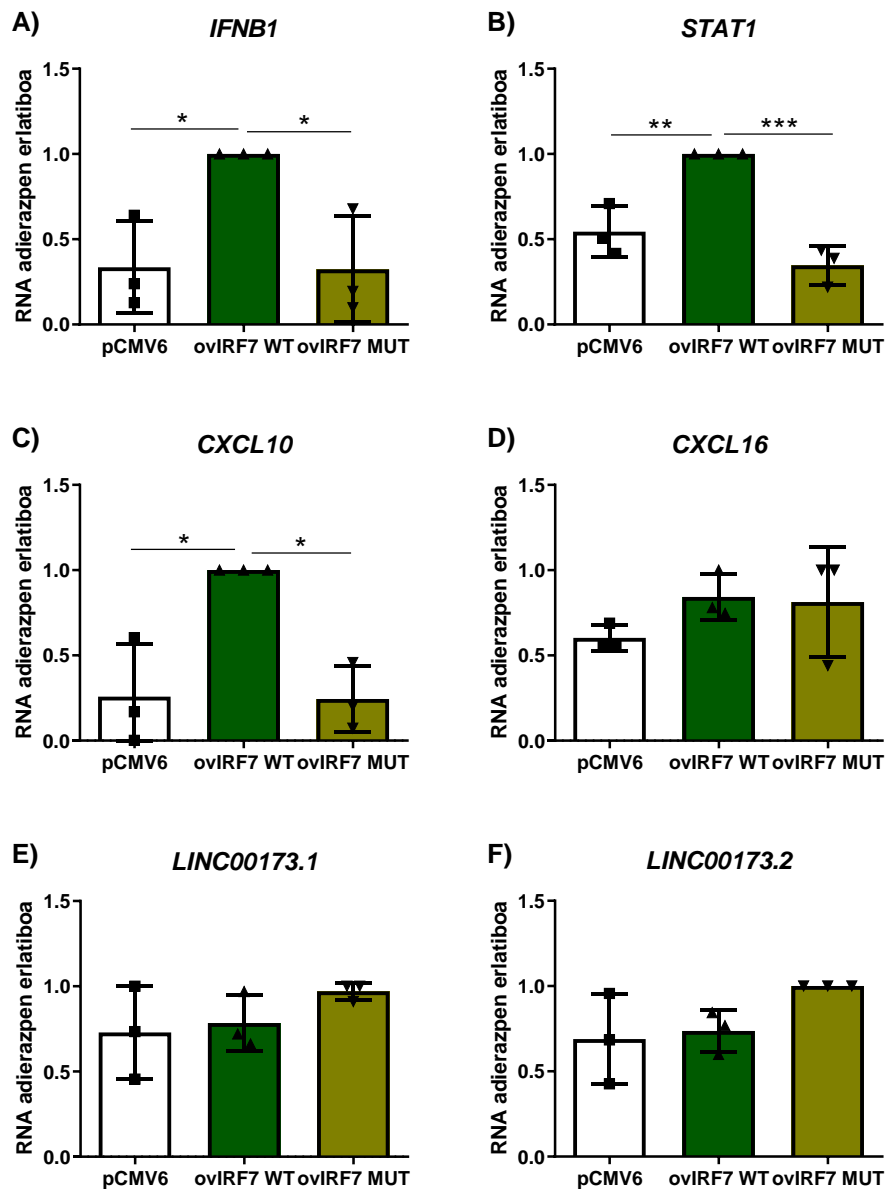
## 6. m6Aren eragina IRF7ren ibaian beheko jardueran

IRF7k funtsezko papera jokatzen du IFN-I erantzunaren eta birusaren aurkako erantzun immunitarioaren mantentzean (Honda K et al., 2005; Schmid et al., 2010). Hau kontuan izanda, IRF7ren sekuentzia kodetzaileko m6A metilazio faltak bere ibaian beheko jardueran ere eragina izan ote zezakeen jakin nahi izan genuen. Horregatik, IFN-I eta JAK-STAT bidezidorretako zenbait generen adierazpena aztertu genuen, WT eta MUT IRF7 gainadierazpen baldintzak konparatuz. WT *IRF7* gainadieraztean, *IFBN1* (29A irudia) eta *STAT1* (29B irudia) mailak igo zirela konturatu ginen, baina haien adierazpena antzekoa izan zen *IRF7*ren sekuentzia kodetzailetik m6A motiboak kentzean eta gainadierazpenik gabeko kontrol-egoeran, IRF7ren aurretik ikusitako murrizketarekin bat etorrita (29E, F irudia). Emaiza hauek m6A metilazio marken beharra berresten dute, ez bakarrik IRF7 erregulaziorako, baita bere ibaian beheko funtzioetarako ere.

IRF7 ISGren eta beste gene batzuen promotoreetako ISREekin lotzen da haien adierazpena bultzatzeko (Schmid et al., 2010). Horregatik, *CXCL10* eta *CXCL16* zitokinen adierazpena analizatu genuen. Biek dute IRF7 lotzeko motiboa Gene Set Enrichment Analysis and Molecular Signature Database (Liberzon et al., 2015; Subramanian et al., 2005) datu basearen arabera. Hala ere, *CXCL10*ek bakarrik erakutsi zituen IRF7 proteina kantitatearen menpeko adierazpen aldaketak (29C irudia), *IFNB1* eta *STAT1*en antzeko adierazpen eredia aurkeztuz. WT eta MUT baldintzen artean ez zen aldaketarik hauteman *CXCL16* adierazpenari dagokionez (29D irudia).

ISGetaz aparteko m6Aren eragina aztertzeko, *LINC00173*ren adierazpena ere kuantifikatu genuen. *LINC00173* birus-infekzioetan hainbat zitokinen transkripzioaren erregulazioan inplikaturik dagoen lncRNA da (Postler et al., 2017), eta promotorean IRF7ren ISRE bat ere duena. Dena dela, *LINC00173*ren aldaerretako ezta batek ere (29E, F irudia) ez zuen adierazpen desberdintasunik erakutsi WT edo MUT IRF7 gainadieraztean, nahiz eta IRF7k m6A motiboak falta dituenean pixka bat altuagoa izan.

Emaizta hauen arabera, *CXCL10*ren adierazpena IRF7ren menpekoa den arren, ez dirudi *CXCL16* eta *LINC00173*ren adierazpen mailak IRF7k erregulatu dituenik, gutxienez modu zuzenean, euren promotoretako IRF7 lotzeko ISREak funtzionalak izan ez daitezkeela edota adierazpenaren erregulazioan IRF7z gain beste transkripzio-faktore batzuk parte hartu eta IRF7ren murrizketa estali edota konpentsatu dezaketela iradokiz.



29. irudia. A) *IFNB1*, B) *STAT1*, C) *CXCL10*, D) *CXCL16*, E) *LINC00173.1* aldaera eta F) *LINC00173.2* aldaeraren adierazpen-mailak m6Adun (WT) eta m6Arik gabeko (MUT) IRF7 gainadierazitako eta gainadierazpenik gabeko (pCMV6) zeluletan. Adierazpen erlatiboa  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  metodoarekin kalkulatu zen, eta *RPLPO* gene endogeno gisa erabili zen. \*\*\*p<0,001;\*\*p<0,01;\*p<0,05 ANOVA analisisen arabera.

***EZTABAIDA***

Birus-infekzioak gaixotasun autoimmune batzuen ingurumen-faktore eragile gisa proposatu dira. (Bjornevik et al., 2022; Hussein & Rahal, 2019; Oikarinen et al., 2021; Smatti et al., 2019). Hain zuzen, hesteetako RNA birusen, hala nola reobirus eta errotavirusaren, eta GZaren garapenaren arteko asoziazioaren berri eman dute hainbat ikerketek (Bouziat et al., 2017; Brigleb et al., 2022; Kempainen et al., 2017; Lars C Stene et al., 2006). Izan ere, Bouziat *et al* reobirusaz kutsatutako saguetan glutenarekiko tolerantziaren galera gertatzen zela ohartu ziren lehendabizi (Bouziat et al., 2017). Lotura hau Brigleb *et al*-ek berretsi zuten geroago (Brigleb et al., 2022), reobirus-infekzioak GZaren garapenean inplikaturako eragile biral abiarazle gisa proposatuz.

Zehazki, zeliakoek, paziente ez-zeliakoek baino anti-reobirus antigorputz gehiago izateko joera dutela erakutsi zuten Bouziat et al-ek (Bouziat et al., 2017). Ikerketa-lan horretan, plaka-erredukzioaren neutralizazio entsegua (*plaque-reduction neutralization assay* ingelesez) erabili zuten giza serumean reobirusen aurkako antigorputzak detektatzeko. Lan honetan ELISA metodoan oinarritutako teknika garatu dugu reobirus partikulen detekzioarako. Prozedura hau erabiliz, reobirus aurkako serum-erreaktibotasuna modu eraginkorragoan kuantifikatu ahal izan genuen. Gainera, gureak birusaren neutralizazioan oinarritutako probak baino neurketa zuzenagoa eskaintzen du. ELISAn oinarritutako probaren bidez, GZdun paziente pediatrikoek reobirusarekiko serum-erreaktibotasun nabarmen handiagoa dutela ikusi genuen, eta beraz, Bouziat et al-ek aurrez egindako behaketa baieztatu genuen, reobirus infekzioen eta GZaren arteko loturari indarra emanez.

Birus-infekzioak gertatzean, CXCL10 ehun desberdinetan adierazten dela frogatu da, zitokina honek birusaren aurkako erantzunean funtsezko zeregina duela iradokiz, zelula immunologikoen azpimultzo jakin batzuk (NK zelulak, adibidez) aktibatzen, errekrutatzen eta hauen migrazioan parte hartzen duelarik (Trifilo et al., 2004). Gainera, zenbait ikerketek jakinarazi dute CXCL10ren ekoizpena handitu egiten dela reobirus infekzioaren ondoren (Carew et al., 2017; Douville et al., 2008), eta adierazpen emendatze

horrek NK zelulak infekzio-gunetara errekrutatzea eragiten duela (Prestwich et al., 2009) . Hori dela eta, serum laginetako CXCL10 hantura-zitokinaren kontzentrazioa ere neurtu dugu azterketa honetan, eta reobirusarekiko serum-erreaktibotasunarekin bat etorriz, GZdun pazienteek ere CXCL10 maila handiagoak izan zituzten. Hain zuzen ere, bi parametro horien arteko korrelazioa baieztatu ahal izan genuen, birus-infekzioak, neurri batean, CXCL10 maila altuago horien erantzuleak izan daitezkeela iradokiz.

IRF3 eta IRF7 dsRNA birusen aurkako erantzunaren faktore erregulatzailer nagusiak dira, eta IFN-I ekoizpenaren eta berezko sistema immunearen aktibaziorako giltzarriak (Ning et al., 2011; Yanai et al., 2018). TLR3, RIG-I edota MDA5 hartzaileek dsRNA molekulak ezagutzen dituzte, IRF3 eta IRF7ren fosforilazioa eragiten duen seinaleztapen ur-jauzia abiaraziz, eta fosforilazioak, aldi berean, hauen aktibazioa eta nukleorako lekualdaketa eragiten duelarik (Ikushima et al., 2013; Matsumoto & Seya, 2008; Ning et al., 2011; Yanai et al., 2018). IRF3 etengabe adierazten da zelulan, eta batez ere birusaren aurkako erantzunaren lehen faseetan parte hartzen du (Yanai et al., 2018). Bestalde, IRF7 maila baxuetan adierazten da baldintza basaletan eta birusen aurkako erantzunaren ondorengo faseetan aktibatzen da. IRF7 erregulazio-begizta positibo baten bidezko IFN-I bidezidorraren mantentzean inplikatur dago (Erickson & Gale, 2008; Litvak et al., 2012; Wu et al., 2020).

Serumean ikusitako reobirusaren aurkako erreaktibotasun handiagorekin eta CXCL10 maila altuagoekin bat etorriz, GZdun pazienteen hestean birusen aurkako erantzun immunitarioa areagotu egiten dela behatu genuen. Izan ere, IRF3 eta IRF7 gainadierazita zeuden GZ aktibodun pazienteen hesteetako biopsietan, eta IRF7ren adierazpenak emendatur mantendu zen glutenik gabeko dieta jarraitzen duten zeliakoetan ere. Talde honetan, IRF3 maila ez-zeliakoetan baino pixka bat altuagoa zen, baina GZ aktiboko pazienteetan baino baxuagoa. IRF7ren funtzioa zein den kontuan izanda, emaitza hauek honakoa iradokitzen dute: nahiz eta dietako glutena kendu, birusen aurkako erantzun immunitarioak aktibatuta jarraitzen duela GZan. Zeliakoen

hesteetan hautemandako IRF7aren gainadierazpen iraunkorra aurretiazko birus-infekzio errepikatuen ondorio izan daiteke, hala nola, reobirusarenak, gaixotasunaren garapenaren aurretik ere gerta daitekeen hesteetako hantura-egoera basala areagotuz.

Kontuan hartuta bai birus-infekzioen eta m6A aldaketaren arteko erlazioa (Dang et al., 2019; Tsai & Cullen, 2020; Williams et al., 2019) eta bai m6A metilazioak GZan duen inplikazioari buruz egin berri dugun aurkikuntza (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021), gure buruari galdetu genion ea loturarik ote dagoen zeliako hesteetan behatutako modu iraunkorrean areagotutako birusen aurkako erantzun immunitarioaren eta m6A-maila desberdintasunen artean. Duela gutxi aditzera eman genuen gliadinak m6A maila orokorrak areagotzen dituela, hesteetako zeluletako zenbait m6A makineriako kideen adierazpen emendatuarekin batera (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021). Gure emaitzek GZdun pazienteetan aurretiaz ere ikusitako m6A-maila igoera berretsi zuten. Horrez gain, m6A makineriako kideen adierazpena ere azertu nahi izan genuen, eta GZan m6A makineriako geneen adierazpen-eredua orokorki aldatuta zegoela jabetu ginen. Alde batetik, *METTL3* eta *METTL14* m6A idazleek adierazpen-maila altuagoak zituzten GZ aktibodun pazienteetan, pertsona ez-zeliako eta GGDn dauden zeliakoekin alderatuz gero. Era berean, lan honetan azertu ditugun *YTHDC1*, *YTHCD2*, *YTHDF1* eta *YTHDF2* m6A irakurleek GZ aktibodun pazienteengan ere adierazpen areagotua erakutsi dute, baina ez GFD jarraitzen duten pazienteengan. Bestalde, *ALKBH5* m6A ezabatzailearen adierazpena nahiko baxua izan zen pertsona ez-zeliakoetan eta GZ aktibodun pazienteetan, GGDpeko pazienteekin konparatuz gero, dietako glutena erregulazio horren arrazoia izan zitekeela iradokiz. Oro har, emaitza horiek gliadinarekin tratatutako zeluletan aurrez atzemandako m6A maila altuagoekin (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021) bat datoz, eta berretsi egiten dute m6A makineriaren inplikazioa GZaren garapenean. Gainera, m6A makineriako zenbait kideren adierazpenek IRF3 eta IRF7 adierazpenekin korrelazionatzen dutela ohartu ginen paziente zeliako eta ez-zeliakoetan, birusen

aurkako erregulatzailer hauen eta m6A makineriako kideen arteko erlazioa, eta hauek GZaren sorreran izan dezaketen inplikazioa iradokiz.

Birus-infekzioak zein gliadina inplikatur dauden GZaren *in vitro* eszenatoki bat sortzeko, zelula-kultiborako baldintza-eredua garatu genuen, zeinean zelulak lehendabizi PICarekin, dsRNA molekulen analogo sintetikoa, tratatzen genituen, eta ondoren, PTGrekin estimulatu genituen. Gure helburua alde aurreko birus-infekzio egoeraren ondorengo glutenarekiko esposizioa antzeratzea zen, balizko GZdun pazienteen hesteetan gerta daitekeena islatuz. Bestalde, aurretik hesteetako laginetan analizatu genituen m6A makineriako kideen adierazpena ere aztertu nahi izan genuen, eta agente hauek izan dezaketen efektua ebaluatu.

PIC zeluletan transfektatu denean, RIG-I hartzaileak ezagutzen du, bere dsRNA analogo naturalarekin gertatzen den bezala. Ezagutza honek IFN-I ekoizpenaren indukzioa daraman seinaleztapen ur-jauziari hasiera ematen dio (Dauletbaev et al., 2015). Frogatuta dago *IFNB1* mRNA molekularen egonkortasuna m6A metilazioak baldintzatzen duela *METTL3*ren menpeko moduan (Winkler et al., 2019), eta, beraz, *METTL3* murrizketa birusen aurkako erantzun immunitarioaren indukzio-mekanismoztat har daiteke. Era berean, gure eremuan, *METTL3* m6A idazlea azpiadierazita zegoen zelulak PICarekin tratatzen zirenean. Epe luzeko gliadinarekiko esposizioaren ondoren *METTL3* gainadierazita dagoela jakinarazi da ere (Olazagoitia-Garmendia et al., 2021). Guk ez genuen eragin bera ikusi 4 orduko estimulazioaren ondoren, seguruenik esposizio-denbora laburragoaren ondorioz. Hala ere, gliadina-estimulazio soilak *METTL3* adierazpena aldatzen ez bazuen ere, *METTL3*ren emendioa eragin zuen gliadinak, zelulak PIC tratamendupean zeudenean. Adierazpen igoera hau aztertutako beste m6A idazlean, *METTL14*en, ikusten da ere. *ALKBH5* m6A ezabatzailearen adierazpena oso desberdina zen gure eremuan, eta baldintza guztietan azpiadierazpena ikusten zen tratamendurik gabeko baldintzarekin alderatuz gero. Aurretik deskribatu da birus-infekzioen ondoriozko *ALKBH5* urritasuna (Liu et al., 2019), eta hala baieztatu zuten ere

gure PIC tratamenduko emaitzek. *ALKBH5*-mailak ere murriztuta zeuden ere gliadina-estimulazioaren ondoren, hesteetako biopsietan ikusitakoaren antzera. Guk dakigula, lehen aldia da *ALKBH5* m6A demetilasaren adierazpenaren aldaketan eta gliadina esposizioaren arteko lotura atzematen dela. Oro har, gure emaitzek birus-infekzio mimetiko baten eta gliadina-estimulazioaren konbinazioaren bidez m6A makineriako kideen adierazpena aldatzen dela erakutsi zuten, horrek m6A-mailen igoera orokorra ekar dezakeelarik. Hala eta guztiz ere, erregulazio honen oinarri diren mekanismoak ezezagunak dira, eta azterketa gehiago beharko dira horiek argitu eta ulertzeko. Hala, m6A eraldaketek hainbat prozesu patologikoetan duten garrantzia kontuan izanda, m6A makineriako kideak estimulu eta baldintza desberdinen aurrean nola erregulatzen diren ezagutarazteak interes handia du, eta ikuspegi terapeutiko berriak garatzeko atea ireki dezake.

*IRF7* transkripzio-faktore giltzarria da, birusen aurkako erantzun immunitarioan parte hartzen duena. Ikerketa askok deskribatu dute nola erregulatzen den *IRF7* proteina mailan (Ning et al., 2011) errebisioan daude bilduta). Gure *in vitro* eredu erabiliz, ikusi dugu gliadina-estimulazioak areagotu egiten duela PIC tratamenduan dagoeneko gertatzen zen *IRF7*ren gainadierazpena, bai RNA mailan, baita proteina mailan ere. Gainera, adierazpenaren igoera hori, neurri batean behintzat, m6A makineriaren alterazioen ondorio izan zela baieztatu genuen, izan ere, *METTL3* murrizteak PIC eta gliadina bidezko indukzioa gutxitzea eragin baitzuen. Horrela, gure emaitzek iradokitzen dute m6A makineriak zeliakoetan behatutako *IRF7*ren gainadierazpen iraunkorren parte har dezakeela, eta hori reobirus infekzioaren eta glutenarekiko esposizioaren konbinazioaren emaitza izan daitekeela.

Orain arte, ez zegoen m6A motiboen berririk *IRF7* mRNA sekuentzian. Online eskuragarri dagoen SRAMP tresnaren bidez (Zhou et al., 2016), hainbat m6A motibo aurreikusi genituen *IRF7* sekuentzia kodetzailean. Gainera, HCT-15 heste-zeluletan motibo horiek metilatuta daudela egiaztatu genuen. Honetaz gain, *IRF7* mRNA molekula



METTL3 m6A idazlearekin, eta ALKBH5 ezabatzailearekin elkartzen dela baieztatu genuen, eta RNA eta proteina mailak aldatu egiten direla METTL3 eta ALKBH5 manipulatzeko direnean. Datu hauek IRF7ren erregulazioa m6Aren menpekoa dela ematen dute aditzera, non m6A-maila altuagoek IRF7 proteina sintesia eragiten duten. Halaber aipatzekoa da *IRF7* mRNA primarioaren maila ere aldatu egin zela, baina mRNA helduaren kontrako adierazpen-eredua erakutsiz, m6A metilazioak RNA prozesamenduan ere eragina izan dezakeela iradokiz.

Premisa horretatik abiatuta, m6A metilazioak IRF7ren RNA metabolismoan nola eragiten duen ebaluatu genuen. Birus-infekzioetan ALKBH5ek DDX46 helikasa errekrutatzen du, birusen aurkako RNA transkribatu batzuen demetilazioa eraginez. Ondorioz, mRNA molekula horiek nukleoan atxikitzen dira, eta horrek proteinara itzultzea eta birusen aurkako erantzun immunitario eraginkorra galarazten dute (Zheng et al., 2017). IRF7 mRNAren kasuan, zelulako kokapenean aldaketak ikusi ziren bai PIC tratamenduaren ondoren baita METTL3 gainadierazpenari erantzunez ere, transkripzioaren proportzio nuklearra handituz. YTHDC1 m6A irakurleak m6A markadun mRNA molekulen nukleoko esportazioan parte hartzen du (Lesbirel & Wilson, 2019; Roundtree et al., 2017), proteina kantitatearen emendioa gerta daitekeelarik. Hala ere, ez genituen esperotako IRF7ren proteina maila altuagoak behatu, YTHDC1 METTL3rekin batera gainadierazi zenean *IRF7* mRNAren kokapena aldatu ez zela eta YTHDC1ek *IRF7*ren esportazio/atxikipen nuklearraren prozesuan parte hartzen ez duela iradokiz. Horregatik, PIC tratamenduaren eta METTL3 gainadierazpenaren ondoren ikusitako IRF7 mRNA lokalizazio-aldaketa transkripzio-maila emendatuaren ondorio izan daiteke, transkribatuaren atxikipen nuklearraren ondorio baino.

YTHDC1ek RNAren moztitsasketan ere parte hartzen du, m6Aren menpeko mekanismoaren bidez (C. Tang et al., 2017; Xiao et al., 2016). m6A metilazioak *IRF7* mRNA prozesamenduan eragina zuela zirudien arren, ez genuen IRF7ren adierazpenean aldaketarik ikusi YTHDC1 eta METTL3 gainadierazpenen ondoren, beraz, pentsa

genezake m6A eta, zehatzago, YTHDC1 ez dagoela IRF7 moztitsazketa prozesuan inplikaturik. Hala eta guztiz ere, RNA molekula helduen sintesirako beste prozesu batzuk ere funtsezkoak dira, hala nola 5' kapela eta poli-A isatsa eranstea. Beraz, m6A bidezko IRF7ren mRNA primarioaren aldaketan inguruko ikerketa gehiago behar da m6A metilazioak prozesu honetan duen benetako eragina argitzeko.

m6A metilazioak mRNA molekulen egonkortasunean eragina duela ere deskribatu da, m6A markak izateak mRNA molekulen bizitza laburragoaren arrazoi bat izanik (Boo & Kim, 2020; Shi et al., 2017; Tang et al., 2017; Wang et al., 2014). Dena dela, ez genuen aldaketarik ikusi *IRF7* mRNAren egonkortasunean METTL3 gainadieraztean, eta D aktinomizina eta zikloheximida bidez transkripzio eta itzulpen prozesuak inhibititu ondoren, hurrenez hurren. Aitzitik, ez dugu *IRF7* mRNAren egonkortasuna ebaluatu m6A maila murriztuko egoera batean. Horregatik, *IRF7* mRNA m6A ez egoteak izan ditzakeen ondorioak ezezagunak dira oraindik, eta bere egonkortasunean eragin lezake.

m6A aldaketek mRNA itzulpenaren erregulazioan ere eragina dute (Wang et al., 2015; Yang et al., 2017). Besteak beste, YTHDF1, YTHDF3 eta YTHDC2-k m6A duten mRNA molekulen itzulpena sustatzen dute (Hsu et al., 2017; Li et al., 2017; Zong et al., 2021). Hala eta guztiz ere, m6A irakurle horiek lotura-ezaugarri desberdinak dituzte, eta YTHDF1 eta YTHDF3 ez bezala, zeinak mRNA molekulen UTRtara lotzen diren bereziki, YTHDC2 CDSetako m6A guneetara lotzen da batez ere (Mao et al., 2019). m6A motiboak ezagutzeaz eta horietara lotzeaz gain, YTHDC2k bere helikasa jardueraren bidez RNA molekulak zabaltzeko gaitasuna ere badu (Hsu et al., 2017; Wojtas et al., 2017). Izan ere, YTHDC2 da jarduera hau duen m6A irakurle ezagun bakarra. m6A motiboak hein handi batean mRNA molekulen 3'UTRtan kokatzen dira, eta neurri txikiagoan 5'UTRtan (Meyer et al., 2012). Hala ere, m6A guneak CDSetan ere identifikatu dira, eta transkribatu horien itzulpena m6A markarik gabeko mRNA molekulena baino eraginkorragoa ez dela jakinarazi den arren, m6Adun transkribatuen m6A marken deuseztatzeak haien

itzulpena kaltetu dezake (Mao et al., 2019). Hala, m6A metilazioak paper bikoitza izan dezake itzulpenean: batetik, m6A markek erribosomen pausatzea eragiten dute A nukleotido metilatatuaren geldiaraziz, itzulpena motelduz eta eraginkortasuna murriztuz; eta, bestetik, m6A markek YTHDC2 mRNA molekuletara lotzea ahalbidetzen dute, RNAREN bigarren mailako egitura zabaltzeko eta RNA metilatuaren itzulpen orokorra sustatzeko (Mao et al., 2019). Gainera, YTHDC2k kanonikoa, kapelarekiko independentea eta IRES bidezko itzulpen ez-kanonikoa ere sustatzen duela deskribatu da (Kim & Siddiqui, 2021). Lan honetan, IRF7 YTHDC2 bidez erregulatzen dela berretsi genuen, bere adierazpena YTHDC2ren gainadierapenarekin batera emendatzen baita.

Lehen esan bezala, IRF7ren ekoizpena METTL3 eta ALKBH5ek erregulatzen dutela behatu genuen, eta beraz, m6A-dependentea dela ondorioztatu genuen. m6A metilazioa zikloleuzinaz inhibitzean, *IRF7*ren adierazpena eta proteinen ekoizpena baxuagoak zirela ikusi genuen m6Aren menpeko IRF7ren erregulazio hori berretsiz. *IRF7*ren sekuentzia kodetzaileko m6A metilazioaren funtzionaltasuna ebaluatzeko, *IRF7* mRNA mutaturatu eratu genuen, baieztatutako m6A motiboak kenduz. Sortutako mutazioak isilak ziren eta ez zuten eraginik izan IRF7ren aminoazidoen sekuentzian. Horrela, jatorrizko edo mutaziorik gabeko (*wild-type* edo WT ingelesez) plasmidoaren gainadierazpenak proteina maila altuak eragin zituela ikusi genuen, baina IRF7 mutaturatu gainadieraztean ez zen igoerarik ikusi IRF7 proteina mailetan, nahiz eta RNA mailak antzekoak izan bi egoeretan. Emaiza horiek honakoa adierazten dute: m6A metilazio markek ez diotela RNA mailako IRF7 adierazpenari zuzenean eragiten, baina funtsezkoak direla IRF7 proteina sintesirako. Gainera, YTHDC2-*IRF7* mRNA interakzioa modu m6A-menpeko eta m6A-espezifikoan besterik ez da gertatzen, m6A markak ezabatzen direnean lotura hori ez baita gertatzen. Oro har, emaitza hauek m6A metilazioak *IRF7* mRNAren itzulpenean duen inplikazioa agerian uzten dute, eta YTHDC2 IRF7 proteina-sintesiaren erregulatzaile berri gisa identifikatu.

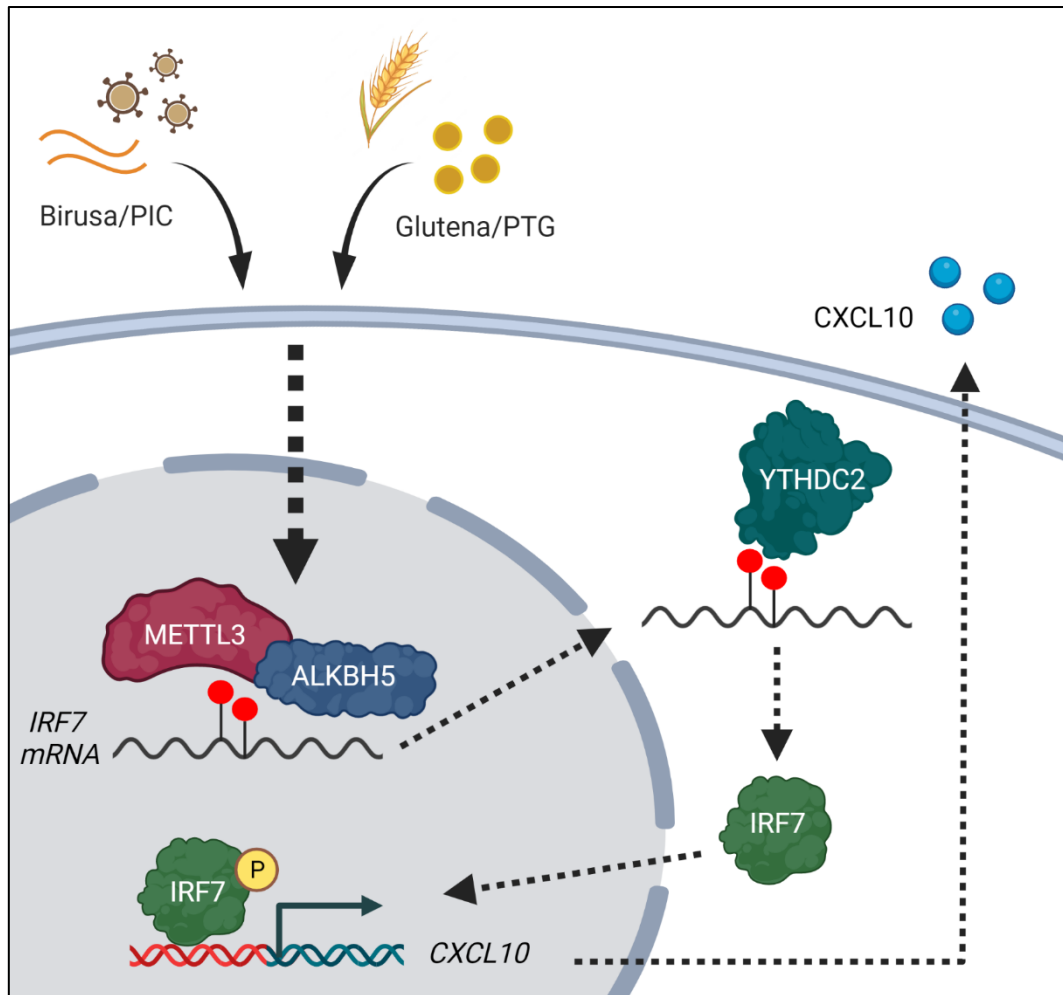
IRF7 IFN-I erantzunaren erregulatzaile nagusia da (Honda K et al., 2005). Berezko erantzun immunitarioa aktibatuta mantentzen duen atzeraelikatze positibo batek erregulatu du, eta transkripzio-faktore giltzarri bat da birusaren aurkako jardura mantentzeko (Erickson & Gale, 2008; Litvak et al., 2012; Ning et al., 2005; Schmid et al., 2010). Birus-infekzioei erantzuteko IRF7 fosforilazio bidez aktibatu eta nukleora lekualdatzen da, non hainbat generen promotoreetan dauden ISRE sekuentziekin lotzen den. Ondorioz, IFN-I eta beste ISG batzuen adierazpena areagotzen da IRF7 aktibatu ondoren. IFN-I, STAT1 eta CXCL10 erantzun immunitarioaren fase desberdinetan inplikaturik daude eta GZaren bereizgarri den hesteetako hanturan parte hartzen dutela deskribatu da (Bondar et al., 2014; Mazarella et al., 2003; Monteleone et al., 2004), eta guztien adierazpena IRF7k indutzen du (Samarajiwa et al., 2009). Lan honetan frogatu genuen m6A metilazioak IRF7ren ibaian behera dauden *IFNB1*, *STAT1* eta *CXCL10* geneen adierazpenari zeharka eragin diezaiokela, IRF7 proteina kantitatearen erregulazioaren bidez.

IFN-I familiako kideek birus-infekzioetan paper garrantzitsua jokatzen dute, eta CXCL10 ezaguna da zenbait zelula immunitarioen, NK zelulak kasu, kimiotaxian duen funtzioagatik (Bondar et al., 2014; Elemam et al., 2022; Trifilo et al., 2004). Brigleb et al-ek reobirus infekzioek eragindako antígeno dietetikoekiko tolerantzia galeran NK zelulek parte hartzen dutela frogatu zuten (Brigleb et al., 2022). Honetaz gain, NK zelulen aktibazioa eta erreklutamendua IFN-I-en menpekoa dela eta IFN-IIren ekoizpena sustatzen dutela deskribatu zuten. Azken hau eta gure azterketan lortutako emaitzak kontuan hartuta, reobirus infekzioetan gertatzen den NK zelulen aktibazioak eragindako erantzun immunitario proinflamatorioaren erantzulea, neurri batean behintzat eta GZaren testuinguruan, m6A makineria bidezko IRF7ren indukzioa izan daitekeela postulatu dugu. Presuntzio hori lau puntutan oinarritzen da: 1) zeliakoek CXCL10 maila altuagoak erakutsi zituzten serumean, reobirusaren aurkako serum-erreaktibotasunarekin korrelazionatzen direnak; 2) IRF7 IFN-I bidezidorrean inplikaturik

dago, eta gainadierazita dago GZan, gaixotasunaren egoera edozein dela ere; 3) m6A metilazioa eta m6A makineriako kideen adierazpena emendatuta dago GZdun pazienteetan, eta METTL3 eta YTHDC2ren adierazpenek IRF7ren adierazpenarekin korrelazionatzen dute, hesteetan nolabaiteko loturaren berri aditzera emanez; eta 4) m6A metilazioa funtsezkoa da IRF7 bidezko proteinen sintesirako, YTHDC2 m6A irakurlearen bitartez, eta *CXCL10*engan eragiten du zeharka. Hipotesi hau erabat frogatu behar bada ere, GZaren garapenean reobirus infekzioak duen inplikazioa hobeto ulertzeko ikerketa-lerro berriei atea irekitzen die. Gainera, erantzun immunitarioa hasieratik kontrolatzeko m6A hautagai potentzial gisa proposatzen dugu.

Laburbilduz, ikerketa honek eraldaketa epitranskriptomikoen bidezko birus-infekzioen eta GZaren arteko lotura berri bat aurkezten du. Lan honetan, reobirus infekzioaren eta GZaren arteko erlazioa egiaztatu dugu eta reobirusa GZaren garapenearen birus-eragile gisa baieztatu dugu. Honetaz gain, IRF7 erregulazioaren m6A menpeko mekanismo berri bat aurkeztu dugu, non METTL3 m6A idazlea, ALKBH5 ezabatzailea eta YTHDC2 irakurleak parte hartzen duten (30. irudia).

Gainera, oraindik ikerketa gehiago behar diren arren, gure emaitzek GZaren testuinguruan reobirus infekzioen osteko NK zelulen aktibazioaren inguruan gure ulermenean dagoen hutsunea betetzeko informazio lagungarria ematen dute. Azkenik, gure datuek argi uzten dute berezko sistema immunitarioak eta birusen aurkako erantzun immunitarioak GZan duen garrantzia, eta IRF7 etorkizuneko ikerketetarako hautagai interesgarria izan daitekeela iradokitzen dute. Emaitza hauek, oro har, GZaren agerpenaren konplexutasuna argitzeko bidean laguntzen dute, eta etorkizuneko prebentzio-planteamenduei atea irekitzen dizkiete, hala nola reobirusaren aurkako txertoei, edota m6A menpeko gene-erregulazioan oinarritutako helburu terapeutiko berrien garapenari.



**30. irudia** m6A bidezko IRF7ren erregulazioa. Birus-infekzioek (PIC tratamendua) eta glutenaren kontsumoak (gliadinaren estimulazioa) *METTL3* m6A idazlea eta *ALKBH5* ezabatzailearen adierazpena aldatzen du, eta horrek IRF7ren m6A menpeko emendioa eragiten du. YTHDC2 m6A irakurlea *IRF7* mRNA metilatuari lotzen zaio, eta haren itzulpena eta IRF7 proteinaren sintesia indartzen ditu, ibaian beherako geneen adierazpenean eraginez, *CXCL10* hantura-zitokinaren genean esaterako. BioRenderrekin sortutako irudia.

***ONDORIOAK***

1. Lan honek reobirusa GZa garatzeko birus-eragile abiarazle gisa berresten du.
  - a. Serumean birusen aurkako antigorputzak detektatzeko eta kuantifikatzeko ELISA teknika erreza optimizatu dugu.
  - b. Reobirus infekzioen eta GZaren artean harremana dago, eta zeliako pediatrikoek reobirusaren aurkako erantzun immunitario areagotua dute, reobirus partikulekiko serum-erreaktibotasun nabarmen handiagoa dutelarik.
  
2. Birusen aurkako erantzun immunitarioak GZaren patogenesia parte hartzen du.
  - a. GZa duten pazienteek CXCL10 kontzentrazio altuagoa dute serumean, reobirusaren aurkako serum-erreaktibotasunarekin korrelazionatzen duena.
  - b. Birus-infekzioen aurkako berezko immunitatearen bi transkripzio-faktore nagusiak, IRF3 eta IRF7, gainadierazita daude GZ aktibodun gizabanakoetan.
  
3. m6A makineria asaldatuta dago GZan.
  - a. m6A maila totala emendatuta dago GZan.
  - b. GZ aktiboan, *METTL3* m6A idazlearen eta *YTHDC1* eta *YTHDC2* m6A irakurleen adierazpena altuagoa da, eta *IRF3* eta *IRF7* birusen aurkako transkribatuen adierazpenarekin korrelazionatuta dago. Honetaz gain, glutena kontsumitzeak *ALKBH5* m6A ezabatzailearen adierazpenean eragina duela dirudi, eta gainadierazi egiten da dietatik glutena kentzen denean.



4. Gizabanako zeliakoen gaixotasuna garatu aurreko balizko egoeraren antza duen *in vitro* heste-zelulen eredua garatu dugu.
  - a. Eredu konbinatu honetan, m6A makineria aldatu egiten da eta METTL3ren menpeko IRF7ren adierazpenaren emendio handia gertatzen da.
  - b. METTL3 m6A idazlea, ALKBH5 ezabatzailea eta YTHDC2 irakurleak parte hartzen duten m6A-bitarteko mekanismoren baten bidez erregulatuta dago IRF7, eta bere sekuentzia kodetzaileko m6A metilazio-markak ezinbestekoak dira IRF7ren proteina sintesirako eta ibaian beherako seinaleztapen egokirako, *CXCL10* hantura-zitokinaren adierazpena barne.

# ***BIBLIOGRAFIA***

- Abadie, V., & Jabri, B. (2014). IL-15: A central regulator of celiac disease immunopathology. *Immunological Reviews*, 260(1), 221–234. <https://doi.org/10.1111/imr.12191>
- 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>
- Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R., & Flavell, R. A. (2001). Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- $\kappa$ B by Toll-like receptor 3. *Nature*, 413(6857), 732–738. <https://doi.org/10.1038/35099560>
- Allegretti, Y. L., Bondar, C., Guzman, L., Cueto Rua, E., Chopita, N., Fuertes, M., Zwirner, N. W., & Chirido, F. G. (2013). Broad MICA/B Expression in the Small Bowel Mucosa: A Link between Cellular Stress and Celiac Disease. *PLoS ONE*, 8(9), e73658. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073658>
- Arango, D., Sturgill, D., Alhusaini, N., Dillman, A. A., Sweet, T. J., Hanson, G., Hosogane, M., Sinclair, W. R., Nanan, K. K., Mandler, M. D., Fox, S. D., Zengeya, T. T., Andresson, T., Meier, J. L., Coller, J., & Oberdoerffer, S. (2018). Acetylation of Cytidine in mRNA Promotes Translation Efficiency. *Cell*, 175(7), 1872–1886. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.10.030>
- Balkhi, M. Y., Fitzgerald, K. A., & Pitha, P. M. (2010). IKK $\alpha$  negatively regulates IRF-5 function in a MyD88–TRAF6 pathway. *Cellular Signalling*, 22(1), 117–127. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.09.021>
- Banchereau, J., & Pascual, V. (2006). Type I Interferon in Systemic Lupus Erythematosus and Other Autoimmune Diseases. *Immunity*, 25(3), 383–392. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2006.08.010>
- 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. *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), 20518–20537. <https://doi.org/10.3390/ijms151120518>
- Bartosovic, M., Molares, H. C., Gregorova, P., Hrossova, D., Kudla, G., & Vanacova, S. (2017). N6-methyladenosine demethylase FTO targets pre-mRNAs and regulates alternative splicing and 3'-end processing. *Nucleic Acids Research*, 45(19), 11356–11370. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx778>
- Bechara, R., & Gaffen, S. L. (2021). '(m6)A' stands for 'autoimmunity': reading, writing, and erasing RNA modifications during inflammation. *Trends in Immunology*, 42(12), 1073–1076. <https://doi.org/10.1016/j.it.2021.10.002>
- Bergstrøm, B., Aune, M. H., Awuh, J. A., Kojen, J. F., Blix, K. J., Ryan, L., Flo, T. H., Mollnes, T. E., Espevik, T., & Stenvik, J. (2015). TLR8 Senses Staphylococcus aureus RNA in Human Primary Monocytes and Macrophages and Induces IFN- $\beta$  Production via a TAK1-IKK $\beta$ -IRF5 Signaling Pathway. *The Journal of Immunology*, 195(3), 1100–1111. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1403176>

- Bjornevik, K., Cortese, M., Healy, B. C., Kuhle, J., Mina, M. J., Leng, Y., Elledge, S. J., Niebuhr, D. W., Scher, A. I., Munger, K. L., & Ascherio, A. (2022). Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science*, *375*(6578), 296–301. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.ABJ8222>
- Bondar, C., Araya, R. E., Guzman, L., Rua, E. C., & Chopita, N. (2014). Role of CXCR3/CXCL10 Axis in Immune Cell Recruitment into the Small Intestine in Celiac Disease. *PLoS ONE*, *9*(2), 89068. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0089068>
- Boo, S. H., & Kim, Y. K. (2020). The emerging role of RNA modifications in the regulation of mRNA stability. *Experimental and Molecular Medicine*, *52*(3), 400–408. <https://doi.org/10.1038/s12276-020-0407-z>
- Bouziat, R., Hinterleitner, R., Brown, J. J., Stencel-Baerenwald, J. E., Ikizler, M., Mayassi, T., Meisel, M., Kim, S. M., Discepolo, V., Pruijssers, A. J., Ernest, J. D., Iskarpatyoti, J. A., Costes, L. M. M., Lawrence, I., Palanski, B. A., Varma, M., Zurenski, M. A., Khomandiak, S., McAllister, N., ... Jabri, B. (2017). Reovirus infection triggers inflammatory responses to dietary antigens and development of celiac disease. *Science*, *356*(6333), 44–50. <https://doi.org/10.1126/science.aah5298>
- Briani, C., Samaroo, D., & Alaedini, A. (2008). Celiac disease: From gluten to autoimmunity. *Autoimmunity Reviews*, *7*(8), 644–650. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.05.006>
- Brigleb, P. H., Kouame, E., Fiske, K. L., Taylor, G. M., Urbanek, K., Medina Sanchez, L., Hinterleitner, R., Jabri, B., & Dermody, T. S. (2022). NK cells contribute to reovirus-induced IFN responses and loss of tolerance to dietary antigen. *JCI Insight*, *7*(16), e159823. <https://doi.org/10.1172/jci>
- Brocard, M., Ruggieri, A., & Locker, N. (2017). m6A RNA methylation, a new hallmark in virus-host interactions. *Journal of General Virology*, *98*(9), 2207–2214. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000910>
- Cai, X., Chiu, Y.-H., & Chen, Z. J. (2014). The cGAS-cGAMP-STING Pathway of Cytosolic DNA Sensing and Signaling. *Molecular Cell*, *54*(2), 289–296. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.03.040>
- Caillaud, A., Prakash, A., Smith, E., Masumi, A., Hovanessian, A. G., Levy, D. E., & Marié, I. (2002). Acetylation of Interferon Regulatory Factor-7 by p300/CREB-binding Protein (CBP)-associated Factor (PCAF) Impairs its DNA Binding. *Journal of Biological Chemistry*, *277*(51), 49417–49421. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207484200>
- 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>
- Cao, Z., Sugimura, N., Burgermeister, E., Ebert, M. P., Zuo, T., & Lan, P. (2022). The gut virome: A new microbiome component in health and disease. *EBioMedicine*, *81*, 104113. <https://doi.org/10.1016/j>
- Carew, J. S., Espitia, C. M., Zhao, W., Mita, M. M., Mita, A. C., & Nawrocki, S. T. (2017). Oncolytic reovirus inhibits angiogenesis through induction of CXCL10/IP-10 and abrogation of HIF activity in soft tissue sarcomas. *Oncotarget*, *8*(49), 86769. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.21423>

- Castellanos-Rubio, A., 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, A., 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), 69–73. <https://doi.org/10.1080/08916930802350789>
- Cecilio, L. A., & Bonatto, M. W. (2015). THE PREVALENCE OF HLA DQ2 AND DQ8 IN PATIENTS WITH CELIAC DISEASE, IN FAMILY AND IN GENERAL POPULATION. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva : ABCD = Brazilian Archives of Digestive Surgery*, *28*(3), 183. <https://doi.org/10.1590/S0102-67202015000300009>
- Chan, M. P., Onji, M., Fukui, R., Kawane, K., Shibata, T., Saitoh, S., Ohto, U., Shimizu, T., Barber, G. N., & Miyake, K. (2015). DNase II-dependent DNA digestion is required for DNA sensing by TLR9. *Nature Communications*, *6*(1), 5853. <https://doi.org/10.1038/ncomms6853>
- Chen, T., Hao, Y.-J., Zhang, Y., Li, M.-M., Wang, M., Han, W., Wu, Y., Lv, Y., Hao, J., Wang, L., Li, A., Yang, Y., Jin, K.-X., Zhao, X., Li, Y., Ping, X.-L., Lai, W.-Y., Wu, L.-G., Jiang, G., Wang, H.-L., Sang, L., Wang, X.-J., Yang, Y.-G., & Zhou, Q. (2015). m6A RNA Methylation Is Regulated by MicroRNAs and Promotes Reprogramming to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, *16*(3), 289–301. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.016>
- Chen, W., & Royer, W. E. (2010). Structural insights into interferon regulatory factor activation. *Cellular Signalling*, *22*(6), 883–887. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2009.12.005>
- Chiang, H. Sen, & Liu, H. M. (2019). The molecular basis of viral inhibition of IRF- and STAT-dependent immune responses. *Frontiers in Immunology*, *9*, 3086. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.03086>
- Choi, J., Jeong, K.-W., Demirci, H., Chen, J., Petrov, A., Prabhakar, A., O’Leary, S. E., Dominissini, D., Rechavi, G., Soltis, S. M., Ehrenberg, M., & Puglisi, J. D. (2016). N(6)-methyladenosine in mRNA disrupts tRNA selection and translation-elongation dynamics. *Nature Structural & Molecular Biology*, *23*(2), 110–115. <https://doi.org/10.1038/nsmb.3148>
- Cicarelli, G., della Rocca, G., Amboni, M., Ciacci, C., Mazzacca, G., Filla, A., & Barone, P. (2003). Clinical and neurological abnormalities in adult celiac disease. *Neurological Sciences*, *24*(5), 311–317. <https://doi.org/10.1007/s10072-003-0181-4>
- Ciccocioppo, R., di Sabatino, A., & Corazza, G. R. (2005). The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clinical and Experimental Immunology*, *140*(3), 408–416. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2005.02783.x>
- Colina, R., Costa-Mattioli, M., Dowling, R. J. O., Jaramillo, M., Tai, L.-H., Breitbach, C. J., Martineau, Y., Larsson, O., Rong, L., Svitkin, Y. V., Makrigiannis, A. P., Bell, J. C., & Sonenberg, N. (2008). Translational control of the innate immune response through IRF-7. *Nature*, *452*(7185), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature06730>
- Csumita, M., Csermely, A., Horvath, A., Nagy, G., Monori, F., Göczi, L., Orbea, H.-A., Reith, W., & Széles, L. (2019). Specific enhancer selection by IRF3, IRF5 and IRF9 is determined by ISRE half-sites, 5 and 3 flanking bases, collaborating transcription factors and the chromatin

- environment in a combinatorial fashion. *Nucleic Acids Research*, 48(2), 589–604.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkz1112>
- Daffis, S., Samuel, M. A., Suthar, M. S., Keller, B. C., Gale, M., & Diamond, M. S. (2008). Interferon Regulatory Factor IRF-7 Induces the Antiviral Alpha Interferon Response and Protects against Lethal West Nile Virus Infection. *Journal of Virology*, 82(17), 8465–8475.  
<https://doi.org/10.1128/JVI.00918-08>
- Dang, W., Xie, Y., Cao, P., Xin, S., Wang, J., Li, S., Li, Y., & Lu, J. (2019). N6-methyladenosine and viral infection. *Frontiers in Microbiology*, 10, 417.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00417>
- Dauletbaev, N., Cammisano, M., Herscovitch, K., & Lands, L. C. (2015). Stimulation of the RIG-I/MAVS Pathway by Polyinosinic:Polycytidylic Acid Upregulates IFN- $\beta$  in Airway Epithelial Cells with Minimal Costimulation of IL-8. *The Journal of Immunology*, 195(6), 2829–2841.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1400840>
- de Oliveira Mann, C. C., & Hornung, V. (2021). Molecular mechanisms of nonself nucleic acid recognition by the innate immune system. *European Journal of Immunology*, 51(8), 1897–1910. <https://doi.org/10.1002/eji.202049116>
- 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), 3971.  
<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>
- Dominissini, D., Moshitch-Moshkovitz, S., Salmon-Divon, M., Amariglio, N., & Rechavi, G. (2013). Transcriptome-wide mapping of N6-methyladenosine by m6A-seq based on immunocapturing and massively parallel sequencing. *Nature Protocols*, 8(1), 176–189.  
<https://doi.org/10.1038/nprot.2012.148>
- 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), 201–206. <https://doi.org/10.1038/nature11112>
- Dominissini, D., Nachtergaele, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Peer, E., Kol, N., Shay Ben-Haim, M., 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), 441–446. <https://doi.org/10.1038/nature16998>
- Douville, R. N., Su, R.-C., Coombs, K. M., Simons, F. E. R., & HayGlass, K. T. (2008). Reovirus Serotypes Elicit Distinctive Patterns of Recall Immunity in Humans. *Journal of Virology*, 82(15), 7515–7523. <https://doi.org/10.1128/JVI.00464-08/ASSET/80B43AC5-19B2-4C8F-8808-BCB195807935/ASSETS/GRAPHIC/ZJV0150808420006.JPEG>

- Du, H., Zhao, Y., He, J., Zhang, Y., Xi, H., Liu, M., Ma, J., & Wu, L. (2016). YTHDF2 destabilizes m6A-containing RNA through direct recruitment of the CCR4–NOT deadenylase complex. *Nature Communications*, 7(1), 12626. <https://doi.org/10.1038/ncomms12626>
- 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., Fialal, S., Grandone, E., ... van Heel, D. A. (2010). Multiple common variants for celiac disease influencing immune gene expression. *Nature Genetics*, 42(4), 295. <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), e00833-16. <https://doi.org/10.1128/MBIO.00833-16>
- Elemam, N. M., Talaat, I. M., & Maghazachi, A. A. (2022). CXCL10 Chemokine: A Critical Player in RNA and DNA Viral Infections. *Viruses*, 14(11), 2445. <https://doi.org/10.3390/v14112445>
- Erickson, A. K., & Gale, M. (2008). Regulation of interferon production and innate antiviral immunity through translational control of IRF-7. *Cell Research*, 18(4), 433–435. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.46>
- Feighery, C. (1999). Fortnightly review: Coeliac disease. *BMJ*, 319(7204), 236–239. <https://doi.org/10.1136/bmj.319.7204.236>
- Filippi, C. M., & Von Herrath, M. G. (2008). Viral trigger for type 1 diabetes: pros and cons. *Diabetes*, 57(11), 2863–2871. <https://doi.org/10.2337/DB07-1023>
- Finkbeiner, S. R., Allred, A. F., Tarr, P. I., Klein, E. J., & Kirkwood, C. D. (2008). Metagenomic Analysis of Human Diarrhea: Viral Detection and Discovery. *PLoS Pathog*, 4(2), 1000011. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000011>
- Fitzgerald, K. A., McWhirter, S. M., Faia, K. L., Rowe, D. C., Latz, E., Golenbock, D. T., Coyle, A. J., Liao, S.-M., & Maniatis, T. (2003). IKKε and TBK1 are essential components of the IRF3 signaling pathway. *Nature Immunology*, 4(5), 491–496. <https://doi.org/10.1038/ni921>
- Fulci, V., Stronati, L., Cucchiara, S., Laudadio, I., & Carissimi, C. (2021). Molecular Sciences Emerging Roles of Gut Virome in Pediatric Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8), 4127. <https://doi.org/10.3390/ijms22084127>
- Furuichi, Y., & Sekiya, T. (2015). Review Discovery of m7G-cap in eukaryotic mRNAs. *Proceedings of the Japan Academy, Series B*, 91(8), 394–409. <https://doi.org/10.2183/pjab.91.394>
- Fustin, J.-M., Doi, M., Yamaguchi, Y., Hida, H., Nishimura, S., Yoshida, M., Isagawa, T., Morioka, M. S., Kakeya, H., Manabe, I., & Okamura, H. (2013). RNA-Methylation-Dependent RNA Processing Controls the Speed of the Circadian Clock. *Cell*, 155(4), 793–806. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.10.026>
- Geula, S., Moshitch-Moshkovitz, S., Dominissini, D., Mansour, A. A., 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., Zerbib, M., Maza, I., Rechavi, Y., Massarwa, R., Hanna, S., Amit, I., Levanon, E. Y., Amariglio, N., Stern-Ginossar,

- N., Novershtern, N., Rechavi, G., & 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., A Lundin, K. E., 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>
- Gokhale, N. S., McIntyre, A. B. R., McFadden, M. J., Roder, A. E., Kennedy, E. M., Gandara, J. A., Hopcraft, S. E., Quicke, K. M., Vazquez, C., Willer, J., Ilkayeva, O. R., Law, B. A., Holley, C. L., Garcia-Blanco, M. A., Evans, M. J., Suthar, M. S., Bradrick, S. S., Mason, C. E., & Horner, S. M. (2016). N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host & Microbe*, *20*(5), 654–665. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2016.09.015>
- Graindorge, A., Pinheiro, I., Nawrocka, A., Mallory, A. C., Tsvetkov, P., Gil, N., Carolis, C., Buchholz, F., Ulitsky, I., Heard, E., Taipale, M., & Shkumatava, A. (2019). In-cell identification and measurement of RNA-protein interactions. *Nature Communications*, *10*(1), 5317. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13235-w>
- Green, P. H. R. (2005). The many faces of celiac disease: Clinical presentation of celiac disease in the adult population. *Gastroenterology*, *128*, S74–S78. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2005.02.016>
- Green, P. H. R., Stavropoulos, S. N., Panagi, S. G., Goldstein, S. L., McMahon, D. J., Absan, H., & Neugut, A. I. (2001). Characteristics of Adult Celiac Disease in the USA: Results of a National Survey. *The American Journal of Gastroenterology*, *96*(1), 126–131.
- Gregory, A. C., Zablocki, O., Zayed, A. A., Howell, A., Bolduc, B., & Sullivan, M. B. (2020). The Gut Virome Database Reveals Age-Dependent Patterns of Virome Diversity in the Human Gut. *Cell Host and Microbe*, *28*(5), 724–740. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2020.08.003>
- Gruber, A. R., Lorenz, R., Bernhart, S. H., Ck, R. N., & Hofacker, I. L. (2008). The Vienna RNA Websuite. *Nucleic Acids Research*, *36*, W70–W74. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn188>
- Haghighi, M., Rostami-Nejad, M., Forouzesh, F., Sadeghi, A., Rostami, K., Aghamohammadi, E., Asadzadeh-Aghdaei, H., Masotti, A., & Zali, M. R. (2019). The role of CXCR3 and its ligands CXCL10 and CXCL11 in the pathogenesis of celiac disease. *Medicine*, *98*(25), e15949. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000015949>
- Hao, H., Hao, S., Chen, H., Chen, Z., Zhang, Y., Wang, J., Wang, H., Zhang, B., Qiu, J., Deng, F., & Guan, W. (2019). N 6-methyladenosine modification and METTL3 modulate enterovirus 71 replication. *Nucleic Acids Research*, *47*(1), 362–374. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1007>
- Harper, J. E., Miceli, S. M., Roberts, R. J., & Manley, J. L. (1990). Sequence specificity of the human mRNA N6-adenosine methylase *in vitro*. *Nucleic Acids Research*, *18*(19), 5735–5741. <https://doi.org/10.1093/nar/18.19.5735>
- Hemmi, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yamamoto, M., Kaisho, T., Sanjo, H., Kawai, T., Hoshino, K., Takeda, K., & Akira, S. (2004). The Roles of Two I $\kappa$ B Kinase-related Kinases in Lipopolysaccharide and Double Stranded RNA Signaling and Viral Infection. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(12), 1641–1650. <https://doi.org/10.1084/jem.20040520>



- Higgs, R., Lazzari, E., Wynne, C., Ní Gabhann, J., Espinosa, A., Wahren-Herlenius, M., & Jefferies, C. A. (2010). Self Protection from Anti-Viral Responses – Ro52 Promotes Degradation of the Transcription Factor IRF7 Downstream of the Viral Toll-Like Receptors. *PLoS ONE*, *5*(7), e11776. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011776>
- Hiscott, J. (2007). Convergence of the NF- $\kappa$ B and IRF pathways in the regulation of the innate antiviral response. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, *18*(5–6), 483–490. <https://doi.org/10.1016/j.cytogfr.2007.06.002>
- Honda, K., & Taniguchi, T. (2006). IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature Reviews. Immunology*, *6*(9), 644–658. <https://doi.org/10.1038/NRI1900>
- Honda K, Yanai H, Negishi H, Asagiri M, Sato M, Mizutani T, Ohba Y, Takaoka A, Yoshida N, & Taniguchi T. (2005). IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses. *Nature*, *434*(7034), 772–777. <https://doi.org/10.1038/nature03419>
- 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), 1115–1127. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.99>
- Hü, S., Mention, J.-J., Monteiro, R. C., Zhang, S., Cellier, C., Schmitz, J., Bahram, S., & Cerf-Bensussan, N. (2004). A Direct Role for NKG2D/MICA Interaction in Villous Atrophy during Celiac Disease intestine by a T cell “cocktail” composed mainly of acti-Virginie Verkarre, 2 Nassima Fodil, 6 vated CD4 T cells in the lamina propria and CD8 T cells contains a consensus YxxM tyrosine-based motif in its. *Immunity*, *21*, 367–377.
- 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 N 6 -methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. *Nature Cell Biology*, *20*(3), 285–295. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0045-z>
- Husby, S., Koletzko, S., Korponay-Szabó, I. R., Mearin, M. L., Phillips, A., Shamir, R., Tronccone, R., Giersiepen, K., Branski, D., Catassi, C., Lelgeman, M., Mäki, M., Ribes-Koninckx, C., Ventura, A., & Zimmer, K. P. (2012). European society for pediatric gastroenterology, hepatology, and nutrition guidelines for the diagnosis of coeliac disease. *Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition*, *54*(1), 136–160. <https://doi.org/10.1097/MPG.0b013e31821a23d0>
- Hussain, S., Aleksic, J., Blanco, S., Dietmann, S., & Frye, M. (2013). Characterizing 5-methylcytosine in the mammalian epitranscriptome. *Genome Biology*, *14*(11), 1–10. <http://genomebiology.com/2013/14/11/215>
- Hussein, H. M., & Rahal, E. A. (2019). The role of viral infections in the development of autoimmune diseases. *Critical Reviews in Microbiology*, *45*(4), 394–412. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2019.1614904>
- Hyöty, H., & Taylor, K. (2002). The role of viruses in human diabetes. *Diabetologia*, *45*(10), 1353–1361. <https://doi.org/10.1007/s00125-002-0852-3>

- Ikushima, H., Negishi, H., & Taniguchi, T. (2013). The IRF family transcription factors at the interface of innate and adaptive immune responses. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 78(1), 105–116. <https://doi.org/10.1101/sqb.2013.78.020321>
- Ishikawa, H., Ma, Z., & Barber, G. N. (2009). STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 461(7265), 788–793. <https://doi.org/10.1038/nature08476>
- Ivashkiv, L. B., & Donlin, L. T. (2014). Regulation of type I interferon responses. *Nature Reviews Immunology*, 14(1), 36–49. <https://doi.org/10.1038/nri3581>
- Iwamura, T., Yoneyama, M., Yamaguchi, K., Suhara, W., Mori, W., Shiota, K., Okabe, Y., Namiki, H., & Fujita, T. (2001). Induction of IRF-3/-7 kinase and NF- $\kappa$ B in response to double-stranded RNA and virus infection: common and unique pathways. *Genes to Cells*, 6(4), 375–388. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2001.00426.x>
- Iwanaszko, M., & Kimmel, M. (2015). NF- $\kappa$ B and IRF pathways: cross-regulation on target genes promoter level. *BMC Genomics*, 16(1), 307. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1511-7>
- 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>
- Julio-Pieper, M., López-Aguilera, A., Eyzaguirre-Velásquez, J., Olavarría-Ramírez, L., Ibacache-Quiroga, C., Bravo, J. A., & Cruz, G. (2021). Molecular Sciences Gut Susceptibility to Viral Invasion: Contributing Roles of Diet, Microbiota and Enteric Nervous System to Mucosal Barrier Preservation. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(9), 4734. <https://doi.org/10.3390/ijms22094734>
- Kaján, G. L., Doszpoly, A., Tarján, Z. L., Vidovszky, M. Z., & Papp, T. (2020). Virus–Host Coevolution with a Focus on Animal and Human DNA Viruses. *Journal of Molecular Evolution*, 88(1), 41–56. <https://doi.org/10.1007/S00239-019-09913-4/FIGURES/1>
- 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), 165–175. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2005.06.008>
- Kato, H., Takeuchi, O., Sato, S., Yoneyama, M., Yamamoto, M., Matsui, K., Uematsu, S., Jung, A., Kawai, T., Ishii, K. J., Yamaguchi, O., Otsu, K., Tsujimura, T., Koh, C.-S., Reis e Sousa, C., Matsuura, Y., Fujita, T., & Akira, S. (2006). Differential roles of MDA5 and RIG-I helicases in the recognition of RNA viruses. *Nature*, 441(7089), 101–105. <https://doi.org/10.1038/nature04734>

- Kawai, T., & Akira, S. (2005). Toll-like receptor downstream signaling. *Arthritis Research & Therapy*, 7(1), 12. <https://doi.org/10.1186/ar1469>
- Kawai, T., & Akira, S. (2006a). Innate immune recognition of viral infection. *Nature Immunology*, 7(2), 131–137. <https://doi.org/10.1038/ni1303>
- Kawai, T., & Akira, S. (2006b). TLR signaling. *Cell Death and Differentiation*, 13(5), 816–825. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401850>
- Kawai, T., Sato, S., Ishii, K. J., Coban, C., Hemmi, H., Yamamoto, M., Terai, K., Matsuda, M., Inoue, J. I., Uematsu, S., Takeuchi, O., & Akira, S. (2004). Interferon- $\alpha$  induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6. *Nature Immunology*, 5(10), 1061–1068. <https://doi.org/10.1038/ni1118>
- Kemppainen, K. M., Lynch, K. F., Liu, E., Lönnrot, M., Simell, V., Briese, T., Koletzko, S., Hagopian, W., Rewers, M., She, J. X., Simell, O., Toppari, J., Ziegler, A. G., Akolkar, B., Krischer, J. P., Lernmark, Å., Hyöty, H., Triplett, E. W., & Agardh, D. (2017). Factors That Increase Risk of Celiac Disease Autoimmunity After a Gastrointestinal Infection in Early Life. *Clinical Gastroenterology and Hepatology*, 15(5), 694–702. <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2016.10.033>
- Kennedy, E. M., Courtney, D. G., Tsai, K., & Cullen, B. R. (2017). Viral Epitranscriptomics. *Journal of Virology*, 91(9), e02263-16. <https://doi.org/10.1128/jvi.02263-16>
- Kim, G.-W., & Siddiqui, A. (2021). N6-methyladenosine modification of HCV RNA genome regulates cap-independent IRES-mediated translation via YTHDC2 recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 118(10), e2022024118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2022024118/-/DCSupplemental>
- Kim, S. M., & Jabri, B. (2015). Innate immunity: Actuating the gears of celiac disease pathogenesis HHS Public Access. *Best Pract Res Clin Gastroenterol*, 29(3), 425–435. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.05.001>
- Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 16(10), 626–638. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>
- Knuckles, P., Lence, T., Haussmann, I. U., Jacob, D., Kreim, N., Carl, S. H., Masiello, I., Hares, T., Villaseñor, R., Hess, D., Andrade-Navarro, M. A., Biggiogera, M., Helm, M., Soller, M., Bühler, M., & Roignant, J.-Y. (2018). Zc3h13/Flacc is required for adenosine methylation by bridging the mRNA-binding factor Rbm15/Spenito to the m6A machinery component Wtap/Fl(2)d. *Genes & Development*, 32(5–6), 415–429. <https://doi.org/10.1101/gad.309146.117>
- Kobayashi, M., Ohsugi, M., Sasako, T., Awazawa, M., Umehara, T., Iwane, A., Kobayashi, N., Okazaki, Y., Kubota, N., Suzuki, R., Waki, H., Horiuchi, K., Hamakubo, T., Kodama, T., Aoe, S., Tobe, K., Kadowaki, T., & Ueki, K. (2018). The RNA Methyltransferase Complex of WTAP, METTL3, and METTL14 Regulates Mitotic Clonal Expansion in Adipogenesis. *Molecular and Cellular Biology*, 38(16), e00116-18. <https://doi.org/10.1128/mcb.00116-18>
- Krishnamurthy, S. R., Janowski, A. B., Zhao, G., Barouch, D., & Wang, D. (2016). Hyperexpansion of RNA Bacteriophage Diversity. *PLoS Biol*, 14(3), 1002409. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002409>

- Kubota, T., Matsuoka, M., Chang, T.-H., Taylor, P., Sasaki, T., Tashiro, M., Kato, A., & Ozato, K. (2008). Virus Infection Triggers SUMOylation of IRF3 and IRF7, Leading to the Negative Regulation of Type I Interferon Gene Expression. *Journal of Biological Chemistry*, *283*(37), 25660–25670. <https://doi.org/10.1074/jbc.M804479200>
- Kumar, H., Kawai, T., Kato, H., Sato, S., Takahashi, K., Coban, C., Yamamoto, M., Uematsu, S., Ishii, K. J., Takeuchi, O., & Akira, S. (2006). Essential role of IPS-1 in innate immune responses against RNA viruses. *Journal of Experimental Medicine*, *203*(7), 1795–1803. <https://doi.org/10.1084/jem.20060792>
- Kumar, S., & Mohapatra, T. (2021). Deciphering Epitranscriptome: Modification of mRNA Bases Provides a New Perspective for Post-transcriptional Regulation of Gene Expression. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *9*, 628415. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.628415>
- Lars C Stene, Margo C Honeyman, Edward J Hoffenberg, Joel E Haas, Ronald J Sokol, Lisa Emery, Iman Taki, Jill M Norris, Henry A Erlich, George S Eisenbarth, & Marian Rewers. (2006). Rotavirus infection frequency and risk of celiac disease autoimmunity in early childhood: a longitudinal study. *American Journal of Gastroenterology*, *101*(10), 2333–2340. <https://doi.org/10.1111/j.1572-0241.2006.00741.x>
- Lee, E. Y., Lee, Z. H., & Song, Y. W. (2009). CXCL10 and autoimmune diseases. *Autoimmunity Reviews*, *8*(5), 379–383. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2008.12.002>
- Lee, M. S., Kim, B., Oh, G. T., & Kim, Y. J. (2013). OASL1 inhibits translation of the type I interferon-regulating transcription factor IRF7. *Nature Immunology*, *14*(4), 346–355. <https://doi.org/10.1038/ni.2535>
- Lejeune, T., Meyer, C., & Abadie, V. (2021). B Lymphocytes Contribute to Celiac Disease Pathogenesis. *Gastroenterology*, *160*(7), 2608–2610. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2021.02.063>
- León, A. J., Garrote, J. A., Blanco-Quirós, A., Calvo, C., Fernández-Salazar, L., del Villar, A., Barrera, A., & Arranz, E. (2006). Interleukin 18 maintains a long-standing inflammation in coeliac disease patients. *Clinical and Experimental Immunology*, *146*(3), 479–485. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2006.03239.x>
- Leonard, M. M., Valitutti, F., Karathia, H., Pujolassos, M., Kenyon, V., Fanelli, B., Troisi, J., Subramanian, P., Camhi, S., Colucci, A., Serena, G., Cucchiara, S., Maria Trovato, C., Malamisura, B., Francavilla, R., Elli, L., Hasan, N. A., Zomorodi, A. R., Colwell, R., Fasano, A., The CD-GEMM Team, Sherman, P. M., Tarr, P. I., & Verdu, E. F. (2021). Microbiome signatures of progression toward celiac disease onset in at-risk children in a longitudinal prospective cohort study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, *118*(29), e2020322118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2020322118/-/DCSupplemental>
- Lerner, A. (2014). Serological diagnosis of celiac disease -moving beyond the tip of the iceberg. *International Journal of Celiac Disease*, *2*(2), 64–66. <https://doi.org/10.12691/ijcd-2-2-8>
- Lerner, A., Arleevskaya, M., Schmiedl, A., & Matthias, T. (2017). Microbes and viruses are bugging the gut in celiac disease. Are they friends or foes? *Frontiers in Microbiology*, *8*, 1392. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01392>

- Lerner, A., & Matthias, T. (2015). Rheumatoid arthritis–celiac disease relationship: Joints get that gut feeling. *Autoimmunity Reviews*, *14*(11), 1038–1047. <https://doi.org/10.1016/j.AUTREV.2015.07.007>
- Lesbirel, S., & Wilson, S. A. (2019). The m<sup>6</sup>A-methylase complex and mRNA export. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, *1862*(3), 319–328. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2018.09.008>
- Li, A., Chen, Y. S., Ping, X. L., Yang, X., Xiao, W., Yang, Y., Sun, H. Y., Zhu, Q., Baidya, P., Wang, X., Bhattarai, D. P., Zhao, Y. L., Sun, B. F., & Yang, Y. G. (2017). Cytoplasmic m<sup>6</sup>A reader YTHDF3 promotes mRNA translation. *Cell Research*, *27*(3), 444–447. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.10>
- 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<sup>6</sup>A mRNA methylation controls T cell homeostasis by targeting the IL-7/STAT5/SOCS pathways. *Nature*, *548*(7667), 338–342. <https://doi.org/10.1038/nature23450>
- Liang, G., & Bushman, F. D. (2021). The human virome: assembly, composition and host interactions. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(8), 514–527. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00536-5>
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Systems*, *1*(6), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>
- Lin, S., Choe, J., Du, P., Triboulet, R., & Gregory, R. I. (2016). The m<sup>6</sup>A Methyltransferase METTL3 Promotes Translation in Human Cancer Cells. *Molecular Cell*, *62*(3), 335–345. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.03.021>
- Linder, B., Grozhik, A. v., Olarerin-George, A. O., Meydan, C., Mason, C. E., & Jaffrey, S. R. (2015). Single-nucleotide resolution mapping of m<sup>6</sup>A and m<sup>6</sup>Am throughout the transcriptome. *Nature Methods*, *12*(8), 767–772. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3453>
- Lindfors, K., Lin, J., Lee, H. S., Hyöty, H., Nykter, M., Kurppa, K., Liu, E., Koletzko, S., Rewers, M., Hagopian, W., Toppari, J., Ziegler, A. G., Akolkar, B., Krischer, J. P., Petrosino, J. F., Lloyd, R. E., & Agardh, D. (2020). Metagenomics of the faecal virome indicate a cumulative effect of enterovirus and gluten amount on the risk of coeliac disease autoimmunity in genetically at risk children: The TEDDY study. *Gut*, *69*(8), 1416–1422. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-319809>
- Ling, T., Weng, G. X., Lia, J., Li, C., Wang, W., Cao, L., Rao, H., Ju, C., & Xu, L. G. (2019). TARBP2 inhibits IRF7 activation by suppressing TRAF6-mediated K63-linked ubiquitination of IRF7. *Molecular Immunology*, *109*, 116–125. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2019.02.019>
- Lionetti, E., Gatti, S., Pulvirenti, A., & Catassi, C. (2015). Celiac disease from a global perspective. *Best Practice and Research: Clinical Gastroenterology*, *29*(3), 365–379. <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2015.05.004>
- Litvak, V., Ratushny, A. v., Lampano, A. E., Schmitz, F., Huang, A. C., Raman, A., Rust, A. G., Bergthaler, A., Aitchison, J. D., & Aderem, A. (2012). A FOXO3-IRF7 gene regulatory circuit

- limits inflammatory sequelae of antiviral responses. *Nature*, 490(7420), 421–425. <https://doi.org/10.1038/nature11428>
- 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), 6051–6063. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx141>
- Liu, S., Zhu, A., He, C., & Chen, M. (2020). REPIC: A database for exploring the N 6-methyladenosine methylome. *Genome Biology*, 21(1), 100. <https://doi.org/10.1186/s13059-020-02012-4>
- Liu, Y., You, Y., Lu, Z., Yang, J., Li, P., Liu, L., Xu, H., Niu, Y., & Cao, X. (2019). N6-methyladenosine RNA modification–mediated cellular metabolism rewiring inhibits viral replication. *Science*, 365(6458), 1171–1176. <https://doi.org/10.1126/science.aax4468>
- Lou, X., Wang, J. J., Wei, Y. Q., & Sun, J. J. (2021). Emerging role of RNA modification N6-methyladenosine in immune evasion. *Cell Death and Disease*, 12(4), 300. <https://doi.org/10.1038/s41419-021-03585-z>
- Lu, M., Zhang, Z., Xue, M., Zhao, B. S., Harder, O., Li, A., Liang, X., Gao, T. Z., Xu, Y., Zhou, J., Feng, Z., Niewiesk, S., Peeples, M. E., He, C., & Li, J. (2020). N 6-methyladenosine modification enables viral RNA to escape recognition by RNA sensor RIG-I. *Nature Microbiology*, 5(4), 584–598. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0653-9>
- Lu, R., Au, W.-C., Yeow, W.-S., Hageman, N., & Pitha, P. M. (2000). Regulation of the Promoter Activity of Interferon Regulatory Factor-7 Gene. *Journal of Biological Chemistry*, 275(41), 31805–31812. <https://doi.org/10.1074/jbc.M005288200>
- Lu, Y.-C., Yeh, W.-C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145–151. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2008.01.006>
- Luang Xu, X., Liu, X., Sheng, N., Soe Oo, K., Liang, J., Hian Chionh, Y., Xu, J., Ye, F., Gao, Y.-G., Dedon, P. C., & Fu, X.-Y. (2017). Three distinct 3-methylcytidine (m<sup>3</sup>C) methyltransferases modify tRNA and mRNA in mice and humans. *Journal of Biological Chemistry*, 292(35), 14695–14703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.798298>
- Luo, H., Liu, W., Zhang, Y., Yang, Y., Jiang, X., Wu, S., & Shao, L. (2021). METTL3-mediated m<sup>6</sup>A modification regulates cell cycle progression of dental pulp stem cells. *Stem Cell Research & Therapy*, 12(1), 159. <https://doi.org/10.1186/s13287-021-02223-x>
- Luo, J., Xu, T., & Sun, K. (2021). N6-Methyladenosine RNA Modification in Inflammation: Roles, Mechanisms, and Applications. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 670711. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.670711>
- 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, D262–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gks1007>
- Maelfait, J., Bridgeman, A., Benlahrech, A., Cursi, C., & Rehwinkel, J. (2016). Restriction by SAMHD1 Limits cGAS/STING-Dependent Innate and Adaptive Immune Responses to HIV-1. *Cell Reports*, 16(6), 1492–1501. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.07.002>

- Maity, A., & Das, B. (2016). N6-methyladenosine modification in mRNA: Machinery, function and implications for health and diseases. *FEBS Journal*, 283(9), 1607–1630. <https://doi.org/10.1111/febs.13614>
- Mancino, A., & Natoli, G. (2016). Specificity and Function of IRF Family Transcription Factors: Insights from Genomics. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 36(7), 462–469. <https://doi.org/10.1089/JIR.2016.0004>
- Mao, Y., Dong, L., Liu, X. M., Guo, J., Ma, H., Shen, B., & Qian, S. B. (2019). m6A in mRNA coding regions promotes translation via the RNA helicase-containing YTHDC2. *Nature Communications*, 10(1), 5332. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13317-9>
- Marie, I., Durbin, J.E., & Levy, D.E. (1998). Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *The EMBO Journal*, 17(22), 6660–6669. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6660>
- Mathlin, J., le Pera, L., & Colombo, T. (2020). A Census and Categorization Method of Epitranscriptomic Marks. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(13), 4684. <https://doi.org/10.3390/ijms21134684>
- Matsumoto, M., & Seya, T. (2008). TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews*, 60(7), 805–812. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.11.005>
- 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 m6 Am in the 5' cap controls mRNA stability. *Nature*, 541(7637), 371–375. <https://doi.org/10.1038/nature21022>
- Mazzarella, G., MacDonald, T. T., Salvati, V. M., Mulligan, P., Pasquale, L., Stefanile, R., Lionetti, P., Auricchio, S., Pallone, F., Troncone, R., Monteleone, G., ed Endoscopia Digestiva, G., Ospedaliera, A., & Giuseppe Moscati, S. (2003). Constitutive Activation of the Signal Transducer and Activator of Transcription Pathway in Celiac Disease Lesions. *The American Journal of Pathology* 162(6), 1845-55. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)64319-2](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)64319-2)
- McFadden, M. J., McIntyre, A. B. R., Mourelatos, H., Abell, N. S., Gokhale, N. S., Ipas, H., Xhemalçe, B., Mason, C. E., & Horner, S. M. (2021). Post-transcriptional regulation of antiviral gene expression by N6-methyladenosine. *Cell Reports*, 34(9), 108798 <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.108798>
- Medzhitov, R. (2001). Toll-like receptors and innate immunity. *Nature Reviews Immunology*, 1(2), 135–145. <https://doi.org/10.1038/35100529>
- Medzhitov, R., & Janeway, C. (2000). Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunological Reviews*, 173(1), 89–97. <https://doi.org/10.1034/J.1600-065X.2000.917309.X>
- Megiorni, F., & Pizzuti, A. (2012). HLA-DQA1 and HLA-DQB1 in Celiac disease predisposition: Practical implications of the HLA molecular typing. *Journal of Biomedical Science*, 19(1), 88. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-88>

- Mendoza-Gomez, L. M., Sebastian-delaCruz, M., Olazagoitia-Garmendia, A., González-Moro, I., Rojas-Márquez, H., Mentxaka, J., Santin, I., & Castellanos-Rubio, A. (2022). Preparation of pepsin trypsin digested gliadin for stimulation experiments. *Methods in Cell Biology*. <https://doi.org/10.1016/BS.MCB.2022.11.005>
- Meresse, B., Ripoche, J., Heyman, H., & Cerf-Bensussan, N. (2009). Celiac disease: from oral tolerance to intestinal inflammation, autoimmunity and lymphomagenesis. *Mucosal Immunology*, 2(1), 8–23. <https://doi.org/10.1038/mi.2008.75>
- 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), 1635–1646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.003>
- Molberg O, Mcadam SN, Körner R, Quarsten H, Kristiansen C, Madsen L, Fugger L, Scott H, Norén O, Roepstorff P, Lundin KE, Sjöström H, & Sollid LM. (1998). Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived T cells in celiac disease. *Nature Medicine*, 4(6), 713–717. <https://doi.org/10.1038/nm0698-713>
- Monteleone, I., Monteleone, G., del Vecchio Blanco, G., Vavassori, P., Cucchiara, S., MacDonald, T. T., & Pallone, F. (2004). Regulation of the T helper cell type 1 transcription factor T-bet in coeliac disease mucosa. *Gut*, 53(8), 1090–1095. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.030551>
- Morales, D. J., & Lenschow, D. J. (2013). The Antiviral Activities of ISG15. *Journal of Molecular Biology*, 425(24), 4995–5008. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.09.041>
- Müller, U., Steinhoff, U., Reis, L. F. L., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R. M., & Aguet, M. (1994). Functional Role of Type I and Type II Interferons in Antiviral Defense. *Science*, 264(5167), 1918–1921. <https://doi.org/10.1126/science.8009221>
- Murray, J. A., Watson, T., Clearman, B., & Mitros, F. (2004). Effect of a gluten-free diet on gastrointestinal symptoms in celiac disease 1-3. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 79(4), 669–673. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.4.669>
- Negishi, H., Fujita, Y., Yanai, H., Sakaguchi, S., Ouyang, X., Shinohara, M., Takayanagi, H., Ohba, Y., Taniguchi, T., & Honda, K. (2006). Evidence for licensing of IFN-induced IFN regulatory factor 1 transcription factor by MyD88 in Toll-like receptor-dependent gene induction program. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 103(41), 15136–15141. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607181103>
- Negishi, H., Taniguchi, T., & Yanai, H. (2018). The Interferon (IFN) Class of Cytokines and the IFN Regulatory Factor (IRF) Transcription Factor Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 10(11), a028423. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a028423>
- Negishi, H., Yanai, H., Nakajima, A., Koshiba, R., Atarashi, K., Matsuda, A., Matsuki, K., Miki, S., Doi, T., Aderem, A., Nishio, J., Smale, S. T., Honda, K., & Taniguchi, T. (2012). Cross-interference of RLR and TLR signaling pathways modulates antibacterial T cell responses. *Nature Immunology*, 13(7), 659–666. <https://doi.org/10.1038/ni.2307>



- Nehyba, J., Hrdličková, R., & Bose, H. R. (2009). Dynamic Evolution of Immune System Regulators: The History of the Interferon Regulatory Factor Family. *Molecular Biology and Evolution*, *26*(11), 2539–2550. <https://doi.org/10.1093/molbev/msp167>
- Nica, A. C., & Dermitzakis, E. T. (2013). Expression quantitative trait loci: Present and future. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *368*(1620), 20120362. <https://doi.org/10.1098/rstb.2012.0362>
- Ning, S., Campos, A. D., Darnay, B. G., Bentz, G. L., & Pagano, J. S. (2008). TRAF6 and the Three C-Terminal Lysine Sites on IRF7 Are Required for Its Ubiquitination-Mediated Activation by the Tumor Necrosis Factor Receptor Family Member Latent Membrane Protein 1. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(20), 6536–6546. <https://doi.org/10.1128/MCB.00785-08>
- Ning, S., Huye, L. E., & Pagano, J. S. (2005). Regulation of the transcriptional activity of the IRF7 promoter by a pathway independent of interferon signaling. *Journal of Biological Chemistry*, *280*(13), 12262–12270. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404260200>
- Ning, S., Pagano, J. S., & Barber, G. N. (2011). IRF7: Activation, regulation, modification and function. *Genes and Immunity*, *12*(6), 399–414. <https://doi.org/10.1038/gene.2011.21>
- Oertelt-Prigione, S. (2012). The influence of sex and gender on the immune response. In *Autoimmunity Reviews*, *11*(2012), A479–A485. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.11.022>
- Oikarinen, M., Puustinen, L., Lehtonen, J., Hakola, L., Simell, S., Toppari, J., Ilonen, J., Veijola, R., Virtanen, S. M., Knip, M., & Hyöty, H. (2021). Enterovirus Infections Are Associated With the Development of Celiac Disease in a Birth Cohort Study. *Frontiers in Immunology*, *11*, 604529. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.604529>
- Olazagoitia-Garmendia, A., Zhang, L., Mera, P., Godbout, J. K., Sebastian-Delacruz, M., Garcia, I., Mendoza, L. M., Huerta, A., Irastorza, I., Bhagat, G., Green, P. H., Herrero, L., Serra, D., Rodriguez, J. A., Verdu, E. F., He, C., Bilbao, J. R., & Castellanos-Rubio, A. (2021). Gluten-induced RNA methylation changes regulate intestinal inflammation via allele-specific XPO1 translation in epithelial cells. *Gut*, *71*(1), 68–77. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322566>
- Palová-Jelínková, L., Dáňová, K., Drašarová, H., Dvořá, M., Funda, D. P., Fundová, P., Kotrbová - Kozak, A., Černá, M., Kamanová, J., Martin, S. F., Freudenberg, M., & Tučková, L. (2013). Pepsin Digest of Wheat Gliadin Fraction Increases Production of IL-1b via TLR4/MyD88/TRIF/MAPK/NF-kB Signaling Pathway and an NLRP3 Inflammasome Activation. *Plos One*, *8*(4), e62426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0062426>
- 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), 369–373. <https://doi.org/10.1038/nature19342>
- Paun, A., & Pitha, P. M. (2007). The IRF family, revisited. *Biochimie*, *89*(6–7), 744–753. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2007.01.014>
- Pecora, F., Persico, F., Gismondi, P., Fornaroli, F., Iuliano, S., de'Angelis, G. L., & Esposito, S. (2020). Gut Microbiota in Celiac Disease: Is There Any Role for Probiotics? *Frontiers in Immunology*, *11*, 957. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00957>

- Perry, A. K., Chow, E. K., Goodnough, J. B., Yeh, W.-C., & Cheng, G. (2004). Differential Requirement for TANK-binding Kinase-1 in Type I Interferon Responses to Toll-like Receptor Activation and Viral Infection. *Journal of Experimental Medicine*, *199*(12), 1651–1658. <https://doi.org/10.1084/jem.20040528>
- Pestka, S., Krause, C. D., & Walter, M. R. (2004). Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunological Reviews*, *202*(1), 8–32. <https://doi.org/10.1111/j.0105-2896.2004.00204.x>
- 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), 177–189. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.3>
- Platanias, L. C. (2005). Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology*, *5*(5), 375–386. <https://doi.org/10.1038/nri1604>
- Postler, T. S., Pantry, S. N., Desrosiers, R. C., & Ghosh, S. (2017). Identification and characterization of a long non-coding RNA up-regulated during HIV-1 infection. *Virology*, *511*, 30–39. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.08.006>
- Prestwich, R. J., Errington, F., Steele, L. P., Ilett, E. J., Morgan, R. S. M., Harrington, K. J., Pandha, H. S., Selby, P. J., Vile, R. G., & Melcher, A. A. (2009). Reciprocal Human Dendritic Cell–Natural Killer Cell Interactions Induce Antitumor Activity Following Tumor Cell Infection by Oncolytic Reovirus. *The Journal of Immunology*, *183*(7), 4312–4321. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0901074>
- Qin, B. Y., Liu, C., Lam, S. S., Srinath, H., Delston, R., Correia, J. J., Derynck, R., & Lin, K. (2003). Crystal structure of IRF-3 reveals mechanism of autoinhibition and virus-induced phosphoactivation. *Nature Structural & Molecular Biology*, *10*(11), 913–921. <https://doi.org/10.1038/nsb1002>
- Rodrigo, L. (2016). Neurogluten. *Gastroenterology & Hepatology International Journal*, *1*(2), 1–2. <https://doi.org/10.23880/ghij-16000110>
- Rosenfeld, A. B., Qian, E., Shen, L., Melendez, M., Mishra, N., Lipkin, W. I., & Racaniello, V. R. (2022). Cross-Reactive Antibody Responses against Nonpoliovirus Enteroviruses. *MBio*, *13*(1), e03660-21. <https://journals.asm.org/journal/mbio>
- 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*, e31311. <https://doi.org/10.7554/eLife.31311.001>
- Rubio-Tapia, A., & Murray, J. A. (2010). Classification and management of refractory coeliac disease. *Gut*, *59*(4), 547–557. <https://doi.org/10.1136/GUT.2009.195131>
- Samarajiwa, S. A., Forster, S., Auchettl, K., & Hertzog, P. J. (2009). INTERFEROME: The database of interferon regulated genes. *Nucleic Acids Research*, *37*, D852–D857. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn732>

- Samasca, G., Sur, G., Lupan, I., & Deleanu, D. (2014). Gluten-free diet and quality of life in celiac disease. *Gastroenterology and Hepatology From Bed to Bench*, 7(3), 139–143.
- Santana-de Anda, K., Gómez-Martín, D., Díaz-Zamudio, M., & Alcocer-Varela, J. (2011). Interferon regulatory factors: Beyond the antiviral response and their link to the development of autoimmune pathology. *Autoimmunity Reviews*, 11(2), 98–103. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.08.006>
- Sato, M., Hata, N., Asagiri, M., Nakaya, T., Taniguchi, T., & Tanaka, N. (1998). Positive feedback regulation of type I *IFN* genes by the IFN-inducible transcription factor IRF-7. *FEBS Letters*, 441(1), 106–110. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)01514-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)01514-2)
- Schmid, S., Mordstein, M., Kochs, G., García-Sastre, A., & TenOever, B. R. (2010). Transcription factor redundancy ensures induction of the antiviral state. *Journal of Biological Chemistry*, 285(53), 42013–42022. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.165936>
- Schneider, W. M., Chevillotte, M. D., & Rice, C. M. (2014). Interferon-Stimulated Genes: A Complex Web of Host Defenses. *Annual Review of Immunology*, 32(1), 513–545. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120231>
- Schoggins, J. W., & Rice, C. M. (2011). Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions. *Current Opinion in Virology*, 1(6), 519–525. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2011.10.008>
- Schulzke, J. D., Bentzel, C. J., Schulzke, I., Riecken, E. O., & Fromm, M. (1998). Epithelial tight junction structure in the jejunum of children with acute and treated celiac sprue. *Pediatric Research*, 43(4 I), 435–441. <https://doi.org/10.1203/00006450-199804000-00001>
- Schwartz, S. (2016). Cracking the epitranscriptome. *RNA*, 22(2), 169–174. <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.>
- Schwartz, S., Mumbach, M. R., Jovanovic, M., Wang, T., Maciag, K., Bushkin, G. G., Mertins, P., Ter-Ovanesyan, D., Habib, N., Cacchiarelli, D., Sanjana, N. E., Freinkman, E., Pacold, M. E., Satija, R., Mikkelsen, T. S., Hacohen, N., Zhang, F., Carr, S. A., Lander, E. S., & Regev, A. (2014). Perturbation of m6A Writers Reveals Two Distinct Classes of mRNA Methylation at Internal and 5' Sites. *Cell Reports*, 8(1), 284–296. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2014.05.048>
- Sciurti, M., Fornaroli, F., Gaiani, F., Bonaguri, C., Leandro, G., di Mario, F., & De'angelis, G. L. (2018). Genetic susceptibility and celiac disease: What role do HLA haplotypes play? *Acta Biomedica*, 89(9), 17–21. <https://doi.org/10.23750/abm.v89i9-S.7953>
- Sharma, S., tenOever, B. R., Grandvaux, N., Zhou, G.-P., Lin, R., & Hiscott, J. (2003). Triggering the Interferon Antiviral Response Through an IKK-Related Pathway. *Science*, 300(5622), 1148–1151. <https://doi.org/10.1126/science.1081315>
- Sherry, B. (2009). Rotavirus and reovirus modulation of the interferon Response. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 29(9), 559–567. <https://doi.org/10.1089/jir.2009.0072>
- 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), 315–328. <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), 1489–1498. <https://doi.org/10.2174/092986709787909613>
- Simen Zhao, B., & He, C. (2015). Pseudouridine in a new era of RNA modifications. *Cell Research*, *25*(2), 153–154. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.143>
- Sin, W. X., Yeong, J. P. S., Lim, T. J. F., Su, I. H., Connolly, J. E., & Chin, K. C. (2020). IRF-7 Mediates Type I IFN Responses in Endotoxin-Challenged Mice. *Frontiers in Immunology*, *11*, 640. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00640>
- Slotkin, W., & Nishikura, K. (2013). Adenosine-to-inosine RNA editing and human disease. *Genome Medicine*, *5*(11), 1–13. <http://genomemedicine.com/content/5/11/105>
- Smatti, M. K., Cyprian, F. S., Nasrallah, G. K., al Thani, A. A., Almishal, R. O., & Yassine, H. M. (2019). Viruses and autoimmunity: A review on the potential interaction and molecular mechanisms. *Viruses*, *11*(8), 762. <https://doi.org/10.3390/v11080762>
- Soleimanjahi, H., & Heydarabadi, F. H. (2022). Reovirus and Rotaviruses. *Encyclopedia of Infection and Immunity*, 131–145. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818731-9.00050-1>
- Spencer, L., Olawuni, B., & Singh, P. (2022). Gut Virome: Role and Distribution in Health and Gastrointestinal Diseases. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, *12*, 836706. Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.836706>
- Steele, L., Errington, F., Prestwich, R., Ilett, E., Harrington, K., Pandha, H., Coffey, M., Selby, P., Vile, R., & Melcher, A. (2011). Pro-inflammatory cytokine/chemokine production by reovirus treated melanoma cells is PKR/NF- $\kappa$ B mediated and supports innate and adaptive anti-tumour immune priming. *Molecular Cancer*, *10*, 20. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-20>
- Su, R., Dong, L., Li, C., Nachtergaele, S., Wunderlich, M., Qing, Y., Deng, X., Wang, Y., Weng, X., Hu, C., Yu, M., Skibbe, J., Dai, Q., Zou, D., Wu, T., Yu, K., Weng, H., Huang, H., Ferchen, K., ... Chen, J. (2018). R-2HG Exhibits Anti-tumor Activity by Targeting FTO/m6A/MYC/CEBPA Signaling. *Cell*, *172*(1–2), 90–105. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.031>
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, *102*(43), 15545–15550. [www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506580102](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0506580102)
- Sun, L., Wu, J., Du, F., Chen, X., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP Synthase Is a Cytosolic DNA Sensor That Activates the Type I Interferon Pathway. *Science*, *339*(6121), 786–791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>
- Sun, Q., Sun, L., Liu, H.-H., Chen, X., Seth, R. B., Forman, J., & Chen, Z. J. (2006). The Specific and Essential Role of MAVS in Antiviral Innate Immune Responses. *Immunity*, *24*(5), 633–642. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.04.004>

- Takaoka, A., Yanai, H., Kondo, S., Duncan, G., Negishi, H., Mizutani, T., Kano, S., Honda, K., Ohba, Y., Mak, T. W., & Taniguchi, T. (2005). Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, *434*(7030), 243–249. <https://doi.org/10.1038/nature03308>
- Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D., & Taniguchi, T. (2008). The IRF Family Transcription Factors in Immunity and Oncogenesis. *Annual Review of Immunology*, *26*(1), 535–584. <https://doi.org/10.1146/annurev.immunol.26.021607.090400>
- Tanabe, A., Tanikawa, K., Tsunetomi, M., Takai, K., Ikeda, H., Konno, J., Torigoe, T., Maeda, H., Kutomi, G., Okita, K., Mori, M., & Sahara, H. (2016). RNA helicase YTHDC2 promotes cancer metastasis via the enhancement of the efficiency by which HIF-1 $\alpha$  mRNA is translated. *Cancer Letters*, *376*(1), 34–42. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.02.022>
- Tanaka, N., Kawakami, T., & Taniguchi, T. (1993). Recognition DNA Sequences of Interferon Regulatory Factor 1 (IRF-1) and IRF-2, Regulators of Cell Growth and the Interferon System. *Molecular and Cellular Biology*, *13*(8), 4531–4538. <https://doi.org/10.1128/mcb.13.8.4531-4538.1993>
- Tang, C., Klukovich, R., Peng, H., Wang, Z., Yu, T., Zhang, Y., Zheng, H., Klungland, A., & Yan, W. (2017). ALKBH5-dependent m6A demethylation controls splicing and stability of long 3'-UTR mRNAs in male germ cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(2), E325–E333. <https://doi.org/10.1073/pnas.1717794115>
- Tang, L., Wei, X., Li, T., Chen, Y., Dai, Z., Lu, C., & Zheng, G. (2021). Emerging Perspectives of RNA N6-methyladenosine (m6A) Modification on Immunity and Autoimmune Diseases. *Frontiers in Immunology*, *12*, 630358. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.630358>
- Taniguchi, T., & Takaoka, A. (2001). A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, *2*(5), 378–386. <https://doi.org/10.1038/35073080>
- Trifilo, M. J., Montalto-Morrison, C., Stiles, L. N., Hurst, K. R., Hardison, J. L., Manning, J. E., Masters, P. S., & Lane, T. E. (2004). CXC Chemokine Ligand 10 Controls Viral Infection in the Central Nervous System: Evidence for a Role in Innate Immune Response through Recruitment and Activation of Natural Killer Cells. *Journal of Virology*, *78*(2), 585–594. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.2.585-594.2004/FORMAT/EPUB>
- Trynka, G., 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>
- Tsai, K., & Cullen, B. R. (2020). Epigenetic and epitranscriptomic regulation of viral replication. *Nature Reviews Microbiology*, *18*(10), 559–570. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0382-3>
- Uematsu, S., & Akira, S. (2007). Toll-like receptors and type I Interferons. *Journal of Biological Chemistry*, *282*(21), 15319–15324. <https://doi.org/10.1074/jbc.R700009200>

- van Heel, D. A., Franke, L., Hunt, K. A., Gwilliam, R., Zhernakova, 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. <https://doi.org/10.1038/NG2058>
- Veals, S. A., Schindler, C., Leonard, D., Fu, X. Y., Aebersold, R., Darnell, J. E., & Levy, D. E. (1992). Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Molecular and Cellular Biology*, *12*(8), 3315–3324. <https://doi.org/10.1128/mcb.12.8.3315-3324.1992>
- Visscher, P. M., Brown, M. A., McCarthy, M. I., & Yang, J. (2012). Five years of GWAS discovery. *American Journal of Human Genetics*, *90*(1), 7–24. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.029>
- Wang, A., Tao, W., Tong, J., Gao, J., Wang, J., Hou, G., Qian, C., Zhang, G., Li, R., Wang, D., Ren, X., Zhang, K., Ding, S., Flavell, R., Li, H. B., Pan, W., & Zhu, S. (2022). m6A modifications regulate intestinal immunity and rotavirus infection. *ELife*, *11*, e73628. <https://doi.org/10.7554/eLife.73628>
- 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, X., Huang, J., Zou, T., & Yin, P. (2017). Human m6A writers: Two subunits, 2 roles. *RNA Biology*, *14*(3), 300–304. <https://doi.org/10.1080/15476286.2017.1282025>
- 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>
- Wang, Y., Li, Y., Toth, J. I., Petroski, M. D., Zhang, Z., & Zhao, J. C. (2014). N6-methyladenosine modification destabilizes developmental regulators in embryonic stem cells. *Nature Cell Biology*, *16*(2), 191–198. <https://doi.org/10.1038/ncb2902>
- Wardowska, A. (2021). m6A RNA Methylation in Systemic Autoimmune Diseases-A New Target for Epigenetic-Based Therapy? *Pharmaceuticals*, *14*(3), 218. <https://doi.org/10.3390/ph14030218>
- Wathelet, M. G., Lin, C. H., Parekh, B. S., Ronco, L. V., Howley, P. M., & Maniatis, T. (1998). Virus infection induces the assembly of coordinately activated transcription factors on the IFN- $\beta$  enhancer in vivo. *Molecular Cell*, *1*(4), 507–518. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80051-9](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80051-9)
- Wilhelmi, I., Roman, E., & Sánchez-Fauquier, A. (2003). Viruses causing gastroenteritis. *Clinical Microbiology and Infection*, *9*(4), 247–262. <https://doi.org/10.1046/J.1469-0691.2003.00560.X>

- Williams, G. D., Gokhale, N. S., & Horner, S. M. (2019). Regulation of Viral Infection by the RNA Modification N6-methyladenosine. *Annual Review of Virology*, *6*(1), 235–253. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-092818>
- 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). m6A 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 m6A Transcripts by the 3'→5' RNA Helicase YTHDC2 Is Essential for a Successful Meiotic Program in the Mammalian Germline. *Molecular Cell*, *68*(2), 374–387. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.09.021>
- Wu, J., & Chen, Z. J. (2014). Innate Immune Sensing and Signaling of Cytosolic Nucleic Acids. *Annual Review of Immunology*, *32*(1), 461–488. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032713-120156>
- Wu, J., Sun, L., Chen, X., Du, F., Shi, H., Chen, C., & Chen, Z. J. (2013). Cyclic GMP-AMP Is an Endogenous Second Messenger in Innate Immune Signaling by Cytosolic DNA. *Science*, *339*(6121), 826–830. <https://doi.org/10.1126/science.1229963>
- Wu, W., Zhang, W., Tian, L., Brown, B. R., Walters, M. S., & Metcalf, J. P. (2020). IRF7 is required for the second phase interferon induction during influenza virus infection in human lung epithelia. *Viruses*, *12*(4), 377. <https://doi.org/10.3390/v12040377>
- 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 m6A Reader YTHDC1 Regulates mRNA Splicing. *Molecular Cell*, *61*(4), 507–519. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.012>
- Xu, K., Yang, Y., Feng, G.-H., Sun, B.-F., Chen, J.-Q., Li, Y.-F., Chen, Y.-S., Zhang, X.-X., Wang, C.-X., Jiang, L.-Y., Liu, C., Zhang, Z.-Y., Wang, X.-J., Zhou, Q., Yang, Y.-G., & Li, W. (2017). Mettl3-mediated m6A regulates spermatogonial differentiation and meiosis initiation. *Cell Research*, *27*(9), 1100–1114. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.100>
- Yanai, H., Chiba, S., Hangai, S., Kometani, K., Inoue, A., Kimura, Y., Abe, T., Kiyonari, H., Nishio, J., Taguchi-Atarashi, N., Mizushima, Y., Negishi, H., Grosschedl, R., & Taniguchi, T. (2018). Revisiting the role of IRF3 in inflammation and immunity by conditional and specifically targeted gene ablation in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(20), 5253–5258. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1803936115/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Yang, J., Wang, H., & Zhang, W. (2019). Regulation of Virus Replication and T Cell Homeostasis by N6-Methyladenosine. *Virologica Sinica*, *34*(1), 22–29. <https://doi.org/10.1007/s12250-018-0075-5>
- 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 N6-methyladenosine. *Cell Research*, *27*(5), 626–641. <https://doi.org/10.1038/cr.2017.31>

- Yang, Y., Hsu, P. J., Chen, Y. S., & Yang, Y. G. (2018). Dynamic transcriptomic m6A decoration: Writers, erasers, readers and functions in RNA metabolism. *Cell Research*, 28(6), 616–624. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0040-8>
- Yoneyama, M., Kikuchi, M., Matsumoto, K., Imaizumi, T., Miyagishi, M., Taira, K., Foy, E., Loo, Y.-M., Gale, M., Akira, S., Yonehara, S., Kato, A., & Fujita, T. (2005). Shared and Unique Functions of the DExD/H-Box Helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in Antiviral Innate Immunity. *The Journal of Immunology*, 175(5), 2851–2858. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.175.5.2851>
- Yoneyama, M., Suhara W, Fukuhara Y, Fukuda M, Nishida E, & Fujita T. (1998). Direct triggering of the type I interferon system by virus infection: activation of a transcription factor complex containing IRF-3 and CBP/p300. *The EMBO Journal*, 17(4), 1087–1095. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.4.1087>
- Yue, Y., Liu, J., Cui, X., Cao, J., Luo, G., Zhang, Z., Cheng, T., Gao, M., Shu, X., Ma, H., Wang, F., Wang, X., Shen, B., Wang, Y., Feng, X., He, C., & Liu, J. (2018). VIRMA mediates preferential m6A mRNA methylation in 3'UTR and near stop codon and associates with alternative polyadenylation. *Cell Discovery*, 4(10), 1–17. <https://doi.org/10.1038/s41421-018-0019-0>
- Yue, Y., Liu, J., & He, C. (2015). RNA N 6-methyladenosine methylation in post-transcriptional gene expression regulation. *Genes & Development*, 29, 1343–1355. <https://doi.org/10.1101/gad.262766>
- Zhang, B., zur Hausen, A., Orłowska-Volk, M., Jäger, M., Bettendorf, H., Stamm, S., Hirschfeld, M., Yiqin, O., Tong, X., Gitsch, G., & Stickeler, E. (2010). Alternative Splicing-Related Factor YT521. *International Journal of Gynecological Cancer*, 20(4), 492–499. <https://doi.org/10.1111/IGC.0b013e3181d66ffe>
- Zhang, C., Chen, Y., Sun, B., Wang, L., Yang, Y., Ma, D., Lv, J., Heng, J., Ding, Y., Xue, Y., Lu, X., Xiao, W., Yang, Y.-G., & Liu, F. (2017). m6A modulates haematopoietic stem and progenitor cell specification. *Nature*, 549(7671), 273–276. <https://doi.org/10.1038/nature23883>
- Zhang, L., & Pagano, J. S. (2002). Review: Structure and Function of IRF-7. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 22(1), 95–101. <https://doi.org/10.1089/107999002753452700>
- Zhang, X., Chen, B. di, Zhao, L. dan, & Li, H. (2020). The Gut Microbiota: Emerging Evidence in Autoimmune Diseases. *Trends in Molecular Medicine*, 26(9) 862–873. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2020.04.001>
- Zhang, Y., Wang, X., Zhang, X., Wang, J., Ma, Y., Zhang, L., & Cao, X. (2019). RNA-binding protein YTHDF3 suppresses interferon-dependent antiviral responses by promoting FOXO3 translation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(3), 976–981. <https://doi.org/10.1073/pnas.1812536116>
- Zhao, X., Yang, Y., Sun, B.-F., Shi, Y., Yang, X., Xiao, W., Hao, Y.-J., Ping, X.-L., Chen, Y.-S., Wang, W.-J., Jin, K.-X., Wang, X., Huang, C.-M., Fu, Y., Ge, X.-M., Song, S.-H., Jeong, H. S., Yanagisawa, H., Niu, Y., ... Yang, Y.-G. (2014). FTO-dependent demethylation of N6-methyladenosine regulates mRNA splicing and is required for adipogenesis. *Cell Research*, 24(12), 1403–1419. <https://doi.org/10.1038/cr.2014.151>



- Zhen, D., Wu, Y., Zhang, Y., Chen, K., Song, B., Xu, H., Tang, Y., Wei, Z., & Meng, J. (2020). m6A Reader: Epitranscriptome Target Prediction and Functional Characterization of N6-Methyladenosine (m6A) Readers. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *8*, 741. <https://doi.org/10.3389/fcell.2020.00741>
- 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>
- Zheng, Q., Hou, J., Zhou, Y., Li, Z., & Cao, X. (2017). The RNA helicase DDX46 inhibits innate immunity by entrapping m6A-demethylated antiviral transcripts in the nucleus. *Nature Immunology*, *18*(10), 1094–1103. <https://doi.org/10.1038/ni.3830>
- Zhong, B., Yang, Y., Li, S., Wang, Y.-Y., Li, Y., Diao, F., Lei, C., He, X., Zhang, L., Tien, P., & Shu, H.-B. (2008). The Adaptor Protein MITA Links Virus-Sensing Receptors to IRF3 Transcription Factor Activation. *Immunity*, *29*(4), 538–550. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.09.003>
- Zhou, Y., Zeng, P., Li, Y. H., Zhang, Z., & Cui, Q. (2016). SRAMP: Prediction of mammalian N6-methyladenosine (m6A) sites based on sequence-derived features. *Nucleic Acids Research*, *44*(10), e91. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw104>
- Zong, X., Xiao, X., Shen, B., Jiang, Q., Wang, H., Lu, Z., Wang, F., Jin, M., Min, J., Wang, F., & Wang, Y. (2021). The N6-methyladenosine RNA-binding protein YTHDF1 modulates the translation of TRAF6 to mediate the intestinal immune response. *Nucleic Acids Research*, *49*(10), 5537–5552. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab343>
- Zou, S., Toh, J. D. W., Wong, K. H. Q., Gao, Y. G., Hong, W., & Woon, E. C. Y. (2016). N6-Methyladenosine: A conformational marker that regulates the substrate specificity of human demethylases FTO and ALKBH5. *Scientific Reports*, *6*, 25677. <https://doi.org/10.1038/srep25677>