



**Universidad
Europea**

Máster en Bioinformática

**Proteómica de células $\gamma\delta$ T en un modelo de
Psoriasis: Análisis de la respuesta a IL-23,
metabolismo y la Influencia de mTOR**

Autor: Jorge Santiago Yebra

Tutor: María Sánchez Ronco

Curso 2023-24

ÍNDICE

RESUMEN	3
1. INTRODUCCIÓN	4
1.1. Psoriasis: Fisiopatología y el Modelo murino de Imiquimod	4
1.2. Respuesta Inmune Tipo III y el Uso de Células $\gamma\delta 17T$ como modelo	6
1.3. Importancia del Metabolismo y mTOR en la Psoriasis	7
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
3. METODOLOGÍA	11
3.1 Modelo Animal.....	11
3.2. Generación de muestras	11
3.2.1 Tratamientos	11
3.2.3 Preparación de muestras para la proteómica	12
3.2.3. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ES-MS/MS).	13
3.2.4 Procesamiento de datos de proteómica.....	14
3.3. Análisis en R.....	15
3.3.1 Análisis de enriquecimiento funcional	15
3.3.2 Análisis de expresión diferencial.....	17
4. RESULTADOS.....	17
4.1. Análisis de expresión diferencial de rutas metabólicas y cambios en la expresión de proteínas asociadas tras el tratamiento con IL-23 y combinación de IL-23 con rapamicina.	17
4.2 mTOR influye en la respuesta a IL-23	22
5. DISCUSIÓN	24
6. CONCLUSIONES	26
7. BIBLIOGRAFÍA	26

RESUMEN

Las células $\gamma\delta 17T$ son esenciales en la fisiopatología de la psoriasis. En este contexto su regulación metabólica juega un papel crucial en su activación y función patogénica dependiente de la señalización por la interleucina 23 (IL-23) y la producción de interleucina 17 (IL-17). En este trabajo exploramos como el mTOR (mammalian target of rapamycin) surge como un regulador tanto del metabolismo de estas células, como de la respuesta a IL-23.

Palabras clave: psoriasis, proteomics, $\gamma\delta 17T$, IL-23, IL-17, mTOR, inmunometabolism.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Psoriasis: Fisiopatología y el Modelo murino de Imiquimod

La psoriasis es una enfermedad inflamatoria autoinmune crónica de la piel, que se caracteriza por la aparición de placas eritematosas y escamosas, cuya etiología implica tanto factores genéticos como ambientales. La psoriasis prevalece aproximadamente en el 2-3% de la población mundial. La fisiopatología de la psoriasis está impulsada por una interacción compleja entre los queratinocitos y el sistema inmunológico. En particular, los linfocitos T, las células dendríticas y las citoquinas inflamatorias, como la IL-23, la IL-17 y el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), desempeñan un papel central en la perpetuación del proceso inflamatorio. Esta interacción resulta en una hiperproliferación de los queratinocitos, lo que da lugar a las características placas engrosadas y escamosas de la psoriasis (Figura 1) (Boehncke & Schön, 2015).

El papel central de las citocinas proinflamatorias como IL-17 e IL-23 y la respuesta de las células Th17 y $\gamma\delta$ 17T, ha sido ampliamente reconocido en el desarrollo de la psoriasis. Las células T colaboradoras Th17, junto con las células $\gamma\delta$ 17T, son importantes productoras de IL-17, IL-22 y GM-CSF, en respuesta a señalización con IL-23. Estas citocinas cronifican la inflamación en la piel, generando los síntomas característicos de la enfermedad (Kapp, 1993). Los anticuerpos neutralizantes contra IL-23 han sido aprobados para el tratamiento de la psoriasis y la enfermedad de Crohn. A pesar de que estas terapias tienen alta especificidad y eficacia, tienen un costo muy elevado, por lo que su prescripción está considerablemente limitada (Daudén et al., 2016).

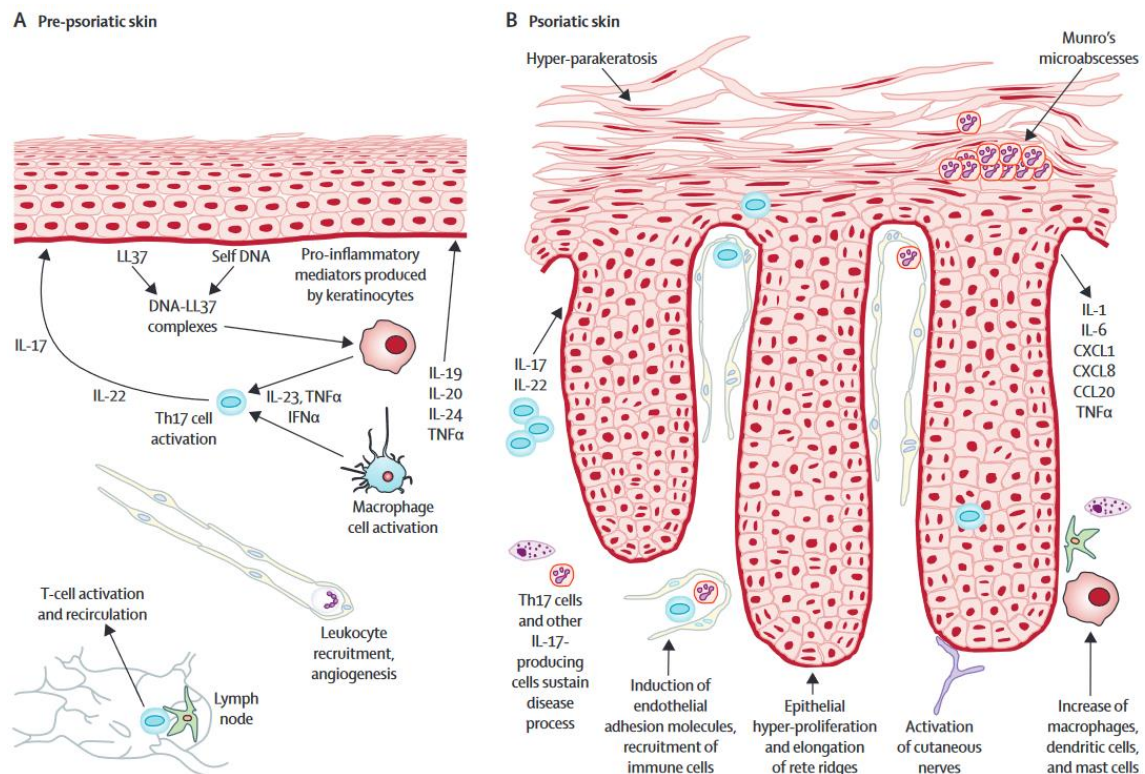


Figura 1. Respuesta inmune patogénica en psoriasis. La imagen muestra la transición de piel prepsoriásica a piel psoriásica. En la piel prepsoriásica (A), los queratinocitos comienzan la respuesta inflamatoria, liberando mediadores inflamatorios que activan las células Th17, promoviendo la recirculación de linfocitos y el reclutamiento de células inmunes. En la piel psoriásica (B), la inflamación crónica lleva a hiperproliferación epidérmica, formación de microabscesos de Munro, y mayor infiltración de células inmunes, especialmente productoras de IL-17 e IL-22, perpetuando la inflamación. Tomada de Boehncke and Schön (2015).

El modelo de ratón de psoriasis generado mediante el tratamiento con la crema de Imiquimod (IMQ) es ampliamente utilizado para estudiar esta enfermedad, ya que reproduce varios aspectos de la etiología humana. El IMQ es un inmunomodulador que actúa como un agonista del receptor de inmunidad innata (células dendríticas y macrófagos) TLR7 (Toll-like receptor 7), estimulando la producción de citoquinas proinflamatorias, como IL-1, IL-6, TNF- α e IL-23, lo que desencadena una respuesta inflamatoria que imita la psoriasis. En este modelo, se ha observado que las células $\gamma\delta 17T$ juegan un rol crucial. De hecho, estudios en ratones deficientes en $\gamma\delta 17T$ muestran una severidad reducida en las

lesiones psoriásicas inducidas por IMQ, lo que subraya la importancia de estas células en la amplificación de la respuesta inflamatoria (Fits et al., 2009).

1.2. Respuesta Inmune Tipo III y el Uso de Células $\gamma\delta 17T$ como modelo

La respuesta inmune tipo III, se caracteriza por la producción de IL-17, IL-22 y GM-CSF y desempeña un papel fundamental en la defensa contra patógenos extracelulares, pero también es clave en el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la psoriasis (Figura 2). Las células $\gamma\delta 17T$, una subpoblación de células T que presentan el receptor $TCR\gamma\delta$, son importantes contribuyentes a esta respuesta (Zhang et al., 2023).

Las células $\gamma\delta 17T$ responden tempranamente a IL-23 e IL-1 β y producen grandes cantidades de IL-17, lo que las convierte en un factor importante en el inicio y la perpetuación de la inflamación en la psoriasis. Estas células se diferencian tanto durante el desarrollo embrionario ($n\gamma\delta 17T$) como en la periferia en presencia de citocinas proinflamatorias ($i\gamma\delta 17T$). Este doble origen aumenta la complejidad de su estudio, pero también abre oportunidades para identificar nuevos enfoques terapéuticos (Lopes et al., 2021).

Además, la capacidad de generar in vitro células $\gamma\delta 17T$ estimuladas ($e\gamma\delta 17T$) permite estudiar de manera controlada su función patogénica en entornos proinflamatorios diversos.

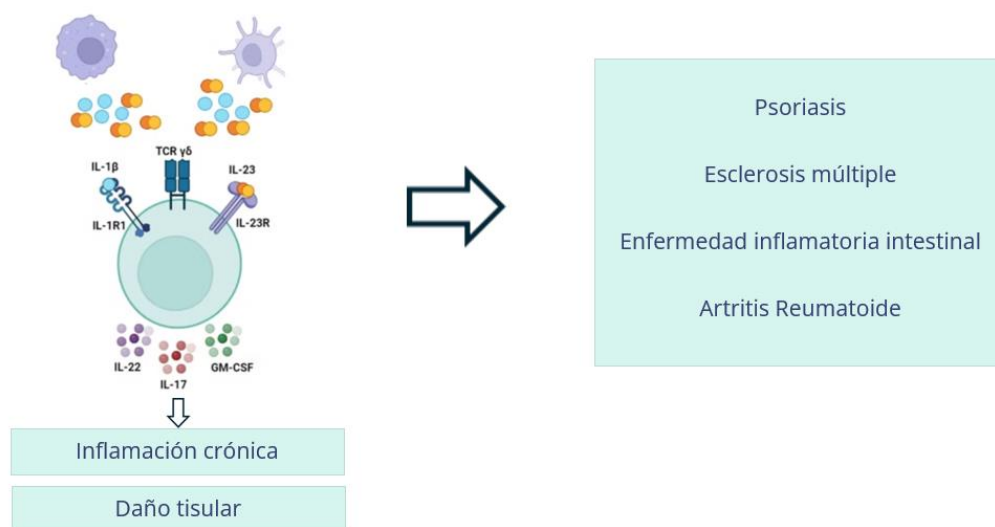


Figura 2. Diagrama esquemático que representa el papel de las células $\gamma\delta$ T productoras de IL-17 en el contexto de inflamación crónica y daño tisular.

Además, se enumeran las enfermedades autoinmunes asociadas a este proceso inflamatorio, incluyendo la psoriasis, esclerosis múltiple, enfermedad inflamatoria intestinal y artritis reumatoide. Realizado con Biorender

1.3. Importancia del Metabolismo y mTOR en la Psoriasis

Las células inmunes, incluidas las $\gamma\delta$ 17T, dependen en gran medida de su metabolismo para ejecutar sus funciones efectoras clave. En el caso de las $\gamma\delta$ 17T, se ha descrito que su perfil metabólico es predominantemente oxidativo, lo que indica una dependencia significativa de la función mitocondrial para mantener su actividad efectora (Latha et al., 2014). Estudios recientes también sugieren que el metabolismo del colesterol y los lípidos influye directamente en la producción de citocinas proinflamatorias como IL-17, lo que subraya la relevancia de estas vías en la inflamación observada en la psoriasis.

Entre las rutas metabólicas involucradas, la vía de señalización mTOR ha emergido como un regulador esencial en la respuesta celular a señales de nutrientes y energía. La activación de mTOR impulsa procesos celulares como la síntesis de proteínas y el crecimiento celular, los cuales están alterados en el contexto de la psoriasis y pueden explicar la proliferación de queratinocitos y los cambios en la diferenciación celular que contribuyen al fenotipo característico de las lesiones psoriásicas (Figura 3) (Raychaudhuri et al., 2014).

Además, mTOR tiene un papel crucial en la regulación de la activación de células inmunes, especialmente en linfocitos T, que están hiperactivados en la psoriasis. La vía mTOR modula la diferenciación de subtipos de células T, incluidos los linfocitos Th17, que producen interleucinas proinflamatorias como IL-17 e IL-23, elementos centrales en la fisiopatología de la psoriasis. Estas citocinas promueven una respuesta inflamatoria crónica que perpetúa la activación de mTOR, creando un ciclo patogénico de inflamación y alteraciones metabólicas (Buerger, 2018).

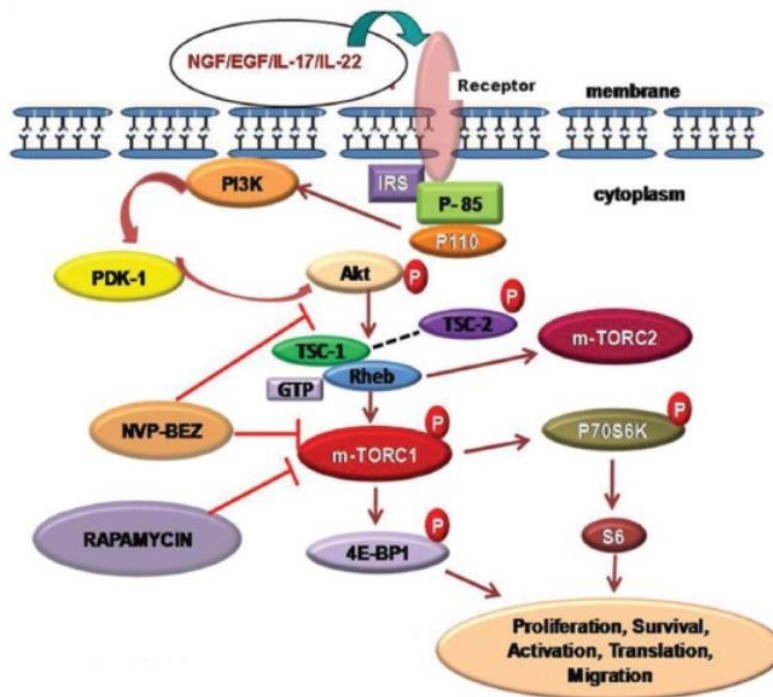


Figura 3. Representación esquemática de la vía de señalización de mTOR.

Cuando varios ligandos, como el factor de crecimiento nervioso (NGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), la IL-17 o la IL-22, se unen a sus receptores tirosina quinasa (RTKs), se produce la fosforilación de residuos de tirosina. Los residuos de tirosina fosforilados actúan como sitios de anclaje para las vías de señalización posteriores, incluyendo el fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K) y AKT. AKT, a su vez, fosforila diversos sustratos en las etapas siguientes, como mTORC1, que está involucrado en la regulación de una variedad de funciones celulares, tales como la proliferación, la supervivencia, la activación, la diferenciación y la migración. Tomada de Raychaudhuri et al. (2014).

Adicionalmente, la vía mTOR se erige como un regulador fundamental del metabolismo celular, especialmente en células inmunitarias activadas, como los linfocitos T. Aunque las células mamíferas normalmente utilizan el ciclo del ácido cítrico y la fosforilación oxidativa para generar ATP, las células T activadas optan por la glucólisis aeróbica, un proceso menos eficiente en términos de producción de ATP, pero que proporciona metabolitos intermedios esenciales para la rápida proliferación celular. Este cambio metabólico está regulado por la señalización de mTORC1, que controla la expresión de diversas enzimas clave en la glucólisis

y la vía de las pentosas fosfato (PPP), permitiendo la producción de NADPH, necesario para la síntesis de lípidos y nucleótidos (Waickman & Powell, 2012).

Además de la glucólisis, las células T también utilizan la glutaminólisis, que implica la degradación de glutamina para alimentar el ciclo del ácido cítrico y sustentar su proliferación. La actividad de mTORC1 es crucial en este proceso, ya que está influenciada por la disponibilidad de aminoácidos, especialmente la leucina (Waickman & Powell, 2012).

Por otro lado, la oxidación de ácidos grasos también contribuye a la generación de ATP, pero su importancia disminuye tras la activación de las células T. La regulación de la mitocondria y la biogénesis mitocondrial por mTORC1 es esencial para el mantenimiento de la actividad metabólica, al igual que la regulación de la autofagia, un proceso catabólico que permite a las células degradar componentes dañados para asegurar su supervivencia (Waickman & Powell, 2012).

En el contexto de la psoriasis y la función de las células $\gamma\delta 17T$, entender cómo mTOR interfiere en estos procesos metabólicos ofrece perspectivas sobre posibles estrategias terapéuticas para abordar las alteraciones metabólicas asociadas con la inflamación crónica. Por lo tanto, comprender cómo la vía mTOR influye en el metabolismo celular e inmune proporciona una perspectiva integral sobre los mecanismos subyacentes de la psoriasis. Asimismo, abre nuevas oportunidades terapéuticas, como el uso de inhibidores de mTOR, entre ellos la rapamicina, que han mostrado eficacia en la reducción de la hiperproliferación celular y la inflamación en modelos preclínicos y en pacientes con psoriasis (Waickman & Powell, 2012).

Los datos preliminares de nuestro laboratorio en una línea celular de células $\gamma\delta 17T$ (Tgd17-LTICs), indican que la respuesta de las células $\gamma\delta 17T$ a IL-23 podría estar directamente relacionada con la función mitocondrial, lo que refuerza la idea de que el metabolismo mitocondrial juega un papel crucial en su función proinflamatoria (Figura 4). También sabemos que la IL-23 regula estrictamente la activación y función de mTORc1. Estudiar estas interacciones, permitirá identificar posibles dianas metabólicas que podrían ser manipuladas

para reducir la inflamación en enfermedades como la psoriasis (“IL-23 regulation of mTORC1/AMPK balance is required for Tgd17 pathogenic function”, Pastor-Fernández et al, thesis dissertation and manuscript in preparation).

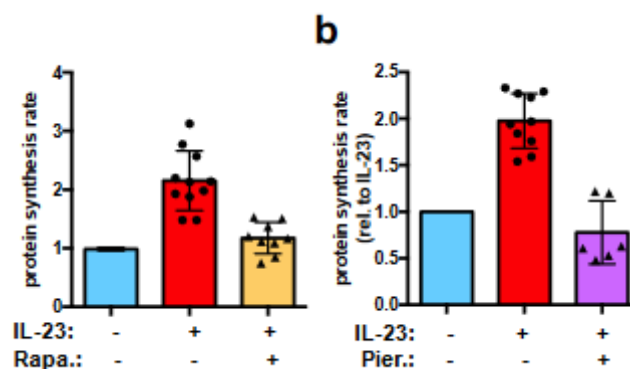


Figura 4. IL-23 induce síntesis de proteínas dependiendo de mTOR y del metabolismo mitocondrial en Tgd17-LTICs. a) Se estimuló a las Tgd17-LTICs con $\pm$ IL-23 y Rapamicina durante 20 horas, antes de una incubación de 10 minutos con puromicina, seguida de la tinción con anticuerpo anti-puromicina. Los histogramas muestran la incorporación de puromicina en las condiciones indicadas. El gráfico muestra el MFI relativo de la tinción con puromicina medido por citometría de flujo, normalizado a la condición no tratada (media $\pm$ desviación estándar, n=9-11). b) Se estimuló a las Tgd17-LTICs como se describe en a), en presencia de Piericidina A. El gráfico muestra el MFI relativo de la tinción con puromicina, normalizado a la condición no tratada (media $\pm$ desviación estándar, n=6-10).

Este trabajo investigará el papel de IL-23 y la vía mTOR en la regulación del metabolismo y la función de las células $\gamma\delta 17T$ en la psoriasis. Se utilizará un **enfoque bioinformático** basado en datos de proteómica, que permite una comprensión más profunda y detallada de los mecanismos inmunometabólicos involucrados. La bioinformática no solo facilita la integración y el análisis de grandes volúmenes de datos biológicos, sino que también potencia la identificación de biomarcadores y dianas terapéuticas, brindando así oportunidades sin precedentes para innovar en el tratamiento de enfermedades inflamatorias crónicas. Profundizar en estos mecanismos podría abrir nuevas avenidas para el desarrollo de tratamientos más efectivos.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

IL-23 induce una remodelación metabólica en las células $\gamma\delta 17T$ dependiente de mTOR en un contexto de psoriasis.

- Observar las principales rutas metabólicas enriquecidas.
- Comprobar el efecto de IL-23 sobre el metabolismo y su dependencia de mTOR.
- Identificar posibles dianas terapéuticas para frenar la respuesta a IL-23 en las células $\gamma\delta 17T$.

3. METODOLOGÍA

3.1 Modelo Animal.

Se utilizaron ratones Il23^{rw}/GFP con fondo genético C57BL/6J para los experimentos (Awasthi et al., 2009). Estos ratones expresan la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) como un marcador de la expresión de IL-23R, debido a la inserción del gen GFP en el locus del gen Il23r.

3.2. Generación de muestras

La preparación de las muestras, el análisis por cromatografía y el procesamiento de los datos fueron realizados en colaboración con el laboratorio de Doreen Cantrell de la Universidad de Dundee. Los protocolos relacionados fueron tomados de Marchingo et al. (2020).

3.2.1 Tratamientos

Se utilizó un modelo murino de psoriasis inducido mediante tratamiento tópico con IMQ durante 5 días en la piel rasurada de los ratones. Se aislaron las células TCR $\gamma\delta$ ⁺ a partir de ganglios linfáticos de ratones (5 animales por réplica biológica, 4 réplicas en total), utilizando columnas MACS manuales para la separación magnética positiva de las células TCR $\gamma\delta$ ⁺.

Posteriormente, las células aisladas se cultivaron durante 4 días en presencia de IL-7. En el cuarto día de cultivo, las células fueron tratadas con IL-23 (10 ng/ml) $\pm$ Rapamicina (20 nM) durante 24 horas, manteniendo la presencia de IL-7 en el medio de cultivo.

Se realizó un análisis posterior para comprobar que los tratamientos estaban funcionando, que incluyó la cuantificación y evaluación de las vías de señalización mediante la detección de las formas fosforiladas de STAT3 (p-STAT3-Y705) y de la proteína S6 (pS6-S235), así como la producción de citoquinas clave, como IL-17A, IL-17F e IL-22.

3.2.3 Preparación de muestras para la proteómica

Los pellets celulares fueron tratados a temperatura ambiente con una solución de 4% SDS, 50 mM TEAB (pH 8.5), y 10 mM TCEP bajo agitación continua (5 minutos a 1200 rpm en un agitador de tubos), luego se sometieron a ebullición (5 minutos, 500 rpm) y posteriormente se sonificaron con un dispositivo BioRuptor (ciclos de 30 segundos de encendido y 30 segundos de apagado, durante 30 ciclos). La concentración de proteínas en los lisados se midió utilizando el kit de cuantificación EZQ (Invitrogen), siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la alquilación, las proteínas se trataron con 20 mM de yodoacetamida durante una hora a temperatura ambiente y en condiciones oscuras. Posteriormente, se procedió a la limpieza proteica utilizando el método SP3, descrito por Hughes et al. (2014). En este proceso, se añadieron 200 μ g de una mezcla 1:1 de partículas magnéticas hidrofílicas e hidrofóbicas modificadas con carboxilato (Sera-Mag SpeedBead) a cada muestra de proteína. El pH se ajustó aproximadamente a 2.0 mediante la adición de una solución 10:1 de acetonitrilo:ácido fórmico. Las partículas magnéticas fueron inmovilizadas en un soporte magnético y las proteínas se lavaron dos veces con etanol al 70% y una vez con acetonitrilo puro. Luego, las partículas se reconstituyeron en una solución de 0.1% SDS, 50 mM TEAB (pH 8.5) y 1 mM de CaCl₂, y se sometieron a digestión enzimática con LysC durante la noche, seguida de una segunda digestión con tripsina, ambas a una proporción de enzima a proteína de 1:50.

Los péptidos resultantes se limpiaron siguiendo nuevamente el método SP3. Las mezclas de proteínas y partículas se resuspendieron, y se añadió acetonitrilo al 100% durante 10 minutos (con una inmovilización magnética de los últimos 2 minutos). El acetonitrilo y la solución de digestión se eliminaron, y los péptidos se lavaron con acetonitrilo y se eluyeron en una solución al 2% de DMSO. La concentración de péptidos se determinó usando el kit CBQCA (Invitrogen), conforme a las indicaciones del fabricante. Finalmente, se añadió ácido fórmico hasta alcanzar una concentración final del 5%.

Las muestras fueron fraccionadas empleando cromatografía líquida de fase inversa a pH alto. Se cargaron en una columna XBridge Peptide BEH C18 (2.1 mm x 150 mm, partículas de 3.5 μ m, Waters). La separación de los péptidos se realizó en un sistema Dionex Ultimate3000, usando un gradiente multietapa de 25 minutos con los solventes A (10 mM formiato a pH 9 en 2% acetonitrilo) y B (10 mM formiato de amonio a pH 9 en 80% acetonitrilo), a una tasa de flujo de 0.3 mL/min. Se obtuvieron 16 fracciones de péptidos, que fueron posteriormente consolidadas en ocho fracciones. Estas fracciones se secaron al vacío y se disolvieron en una solución al 5% de ácido fórmico para su posterior análisis mediante LC-ES-MS/MS.

3.2.3. Análisis por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ES-MS/MS).

Las muestras (≤ 1 μ g de péptido) fueron inyectadas en un sistema de cromatografía en fase inversa a escala nanométrica (UltiMate 3000 RSLC nano, Thermo Scientific) antes de ser ionizadas por electrospray e introducidas en un espectrómetro de masas Q Exactive Plus (Thermo Scientific). Los tampones de cromatografía utilizados fueron los siguientes: tampón A de HPLC (0.1% ácido fórmico), tampón B de HPLC (80% acetonitrilo en 0.1% ácido fórmico) y tampón C de HPLC (0.1% ácido fórmico). Se inyectaron 15 μ L de muestra y se lavaron con tampón C (10 μ L/min) durante 5 minutos antes de cambiar la válvula en una columna trampa Acclaim PepMap100 nanoViper C18 (diámetro interno de 100 μ m, 2 cm; Thermo Scientific). Después del enriquecimiento en la trampa, los péptidos fueron eluidos a una columna EASY-Spray PepMap RSLC nanoViper,

C18, 2 μm , 100 Å (75 μm , 50 cm; Thermo Scientific) utilizando el siguiente gradiente de tampones: de 2% a 5% B (0 a 5 min), de 5% a 35% B (5 a 130 min), de 35% a 98% B (130 a 132 min), 98% B (132 a 152 min), de 98% a 2% B (152 a 153 min) y equilibrado en 2% B (153 a 170 min) a una tasa de flujo de 0.3 $\mu\text{L}/\text{min}$.

La solución de péptidos eluida fue ionizada automáticamente por electrospray en el espectrómetro de masas Q Exactive Plus utilizando una fuente de nanoelectrospray EASY-Spray a 50°C y con un voltaje de fuente de 2.0 kV (Thermo Scientific). El espectrómetro de masas operó en modo de ionización positiva. Los datos se adquirieron mediante adquisición dependiente de datos: los 15 iones peptídicos más intensos del escaneo preliminar en el Q Exactive Plus se fragmentaron mediante disociación de colisión de alta energía. Se aplicaron los siguientes parámetros: resolución del escaneo MS1: 70,000; objetivo AGC de MS1: 1e6; tiempo máximo de inyección MS1: 20 ms; rango de escaneo MS1: 350–1600 Th; resolución del escaneo MS2: 17,500; objetivo AGC de MS2: 2e5; tiempo máximo de inyección MS2: 100 ms; ventana de aislamiento: 1.4 Th; masa fija inicial: 200 Th; NCE: 27; objetivo AGC mínimo: 2e3; se consideraron únicamente los estados de carga 2 a 6; coincidencia de péptidos: preferido; exclusión de isótopos: activado; exclusión dinámica: 45 s.

3.2.4 Procesamiento de datos de proteómica

Los datos fueron procesados, buscados y cuantificados utilizando el paquete de software MaxQuant, versión 1.6.2.6. Para las búsquedas de proteínas y péptidos, generamos una base de datos híbrida a partir de bases de datos de la versión 2019_07 de Uniprot. Esta base de datos consistió en todas las entradas de SwissProt de ratón anotadas manualmente, combinadas con entradas de TrEMBL de ratón con evidencia a nivel proteico disponible y homólogos anotados manualmente dentro de la base de datos SwissProt de humano. Se utilizaron los siguientes parámetros de búsqueda en MaxQuant: la acetilación N-terminal de proteínas, la oxidación de metionina, la conversión de glutamina a pirroglutamato y la desamidación de glutamina y asparagina fueron configuradas como modificaciones variables, mientras que la carbamidometilación de los residuos

de cisteína fue seleccionada como modificación fija. Se seleccionaron tripsina y LysC como las enzimas, permitiéndose hasta dos cortes erróneos. La tasa de descubrimiento falso (FDR) para proteínas y PSM fue establecida en 1%, y el emparejamiento de péptidos entre corridas fue desactivado.

El filtrado de datos y la cuantificación del número de copias proteicas fueron realizados en el paquete de software Perseus, versión 1.6.6.0. Las proteínas fueron cuantificadas a partir de péptidos únicos y "razor" (asignados a un grupo, pero no únicos de ese grupo). La calidad de la cuantificación se categorizó de la siguiente manera: se consideró alta precisión cuando las proteínas tenían ocho o más péptidos únicos y "razor" asignados, y al menos el 75% de estos péptidos eran únicos; se consideró precisión media cuando las proteínas tenían al menos tres péptidos únicos y "razor", con al menos el 50% de estos siendo únicos; y las proteínas por debajo de estos umbrales fueron consideradas de baja precisión.

El conjunto de datos fue filtrado para eliminar proteínas categorizadas como "contaminantes", "reversa" y "solo identificadas por sitio". El número medio de copias por célula se calculó utilizando el plugin "proteomic ruler" descrito por Wiśniewski et al. (2014). Brevemente, este método ajusta la suma de las intensidades de los péptidos de las histonas al número de histonas en una célula diploide de ratón y, a partir de la relación entre la intensidad de los péptidos de las histonas y las intensidades de otros péptidos identificados, se estima el número de copias proteicas por célula para todas las proteínas identificadas. Los datos fueron filtrados posteriormente para incluir solo proteínas con al menos una condición en la que se detectaron péptidos en ≥ 2 réplicas biológicas.

3.3. Análisis en R

3.3.1 Análisis de enriquecimiento funcional

El análisis de enriquecimiento funcional de las proteínas se realizó utilizando el paquete de R clusterProfiler (v3.14.3) para el análisis de rutas y anotaciones, y ReactomePA (v1.30.0) para rutas de Reactome, junto fgsea (v1.14.0) para el enriquecimiento génico. El mapeado se realizó con biomaRt (v2.42.1) a partir del dataset de Mus musculus en Ensembl.

- Preparación de los datos:

Se procesó el dataset eliminando proteínas contaminantes, identificadas por sitio o hits inversos. Las columnas seleccionadas incluían valores de abundancia proteica log2 y datos de genes y proteínas. Se imputaron valores faltantes cuando fue necesario utilizando un método de vecinos más cercanos, y se eliminaron proteínas duplicadas.

- Conversión de identificadores y anotación:

Se utilizó biomaRt para mapear los genes a identificadores de Entrez, eliminando aquellos que no se anotaron correctamente. El dataset final contenía abundancias log2 y los identificadores de Entrez necesarios para el análisis funcional.

- Análisis de enriquecimiento funcional:

Para evaluar el enriquecimiento de rutas metabólicas según la expresión diferencial de las proteínas, se utilizó fgsea junto con las rutas de Reactome proporcionadas por ReactomePA. Se analizaron rutas metabólicas clave, como el metabolismo de poliaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y ácidos grasos. Para cada condición experimental (Control, IL-23, Rapamicina e IL-23+Rapamicina), se calculó la media de expresión por proteína y se generó una lista ordenada de genes. Se seleccionaron y filtraron las rutas biológicamente relevantes para su visualización.

- Visualización:

Las 15 rutas más enriquecidas se visualizaron con ggplot2 (v3.3.0), generando gráficos de barras que muestran las puntuaciones de enriquecimiento normalizadas (NES). Además, se extrajeron genes específicos de rutas metabólicas de interés para análisis posteriores, y se guardaron en archivos CSV.

3.3.2 Análisis de expresión diferencial

Se utilizó un diseño experimental modelando las condiciones tratadas y no tratadas. Para cada comparación (IL-23 vs Control, Rapamicina vs Control e IL-23+Rapamicina vs Control), se generaron contrastes y se ajustaron modelos lineales con lmFit. Se aplicó un ajuste bayesiano mediante eBayes y se controló la tasa de falsos descubrimientos (FDR) con el método de Benjamini-Hochberg ($FDR < 0.05$). Posteriormente se identificaron las proteínas diferencialmente expresadas.

Las proteínas significativas se anotaron con biomaRt y org.Mm.eg.db (v3.10.0), y se realizó el análisis de enriquecimiento funcional usando clusterProfiler.

- Visualización:

Los cambios en la expresión se representaron en gráficos de barras horizontales con ggplot2 (v3.3.2), destacando proteínas con cambios significativos en su expresión (logFC) entre IL-23 y el control. Se utilizaron colores azul y rojo para indicar la regulación positiva y negativa, respectivamente.

4. RESULTADOS

4.1. Análisis de expresión diferencial de rutas metabólicas y cambios en la expresión de proteínas asociadas tras el tratamiento con IL-23 y combinación de IL-23 con rapamicina.

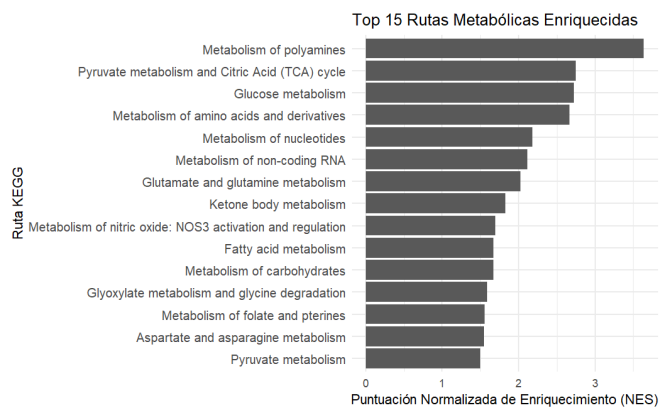
Para analizar el perfil metabólico de las $\gamma\delta 17T$ se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial (Figura 5A). En el que podemos observar que la principal ruta enriquecida es el metabolismo de poliaminas. Las poliaminas son pequeñas moléculas orgánicas de estructura lineal, compuestas principalmente por cadenas de carbono con grupos amino ($-NH_2$) en los extremos o en posiciones intermedias. Está descrito su papel en la modulación de la respuesta inmune y en la patogenicidad de las Th17 (Wagner et al., 2018). Otras rutas con gran presencia son el metabolismo de piruvato, el de la glucosa y el de aminoácidos.

Para analizar el efecto de IL-23 sobre el metabolismo, examinamos la expresión de proteínas asociadas a diversas rutas metabólicas, evaluando si su expresión se ve influenciada por el tratamiento con IL-23. Para ello, realizamos una comparación sistemática de los logFC de cada proteína entre la condición de tratamiento con IL-23 y el control. Esta comparación se hizo frente a un valor hipotético de $\log FC = 0$, que representaría la ausencia de cambio en la expresión. Además, representamos los genes en un *volcano plot* para observar la distribución de su expresión diferencial, y en un histograma que muestra el porcentaje de genes con logFC mayor o menor a 0. Esto nos permite visualizar de forma clara y cuantitativa las tendencias de expresión hacia la regulación positiva o negativa bajo el tratamiento con IL-23. Este análisis se replicó para la comparación IL-23 + rapamicina vs. IL-23, con el objetivo de evaluar el impacto de mTOR en la regulación metabólica inducida por IL-23 (Figura 5 B1).

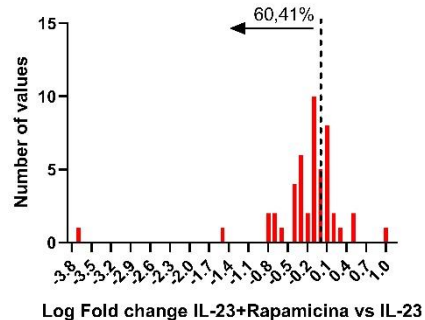
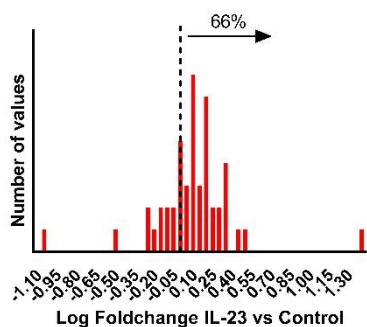
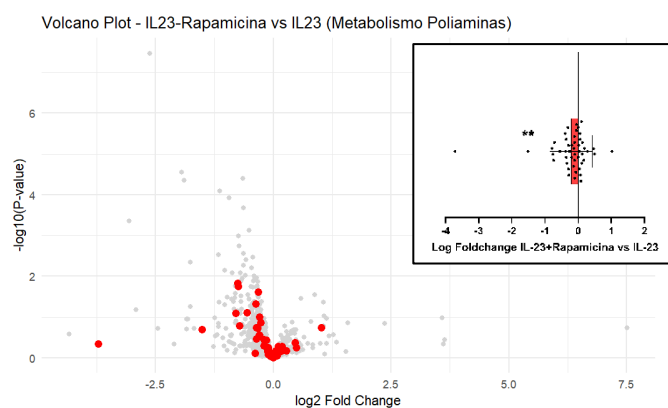
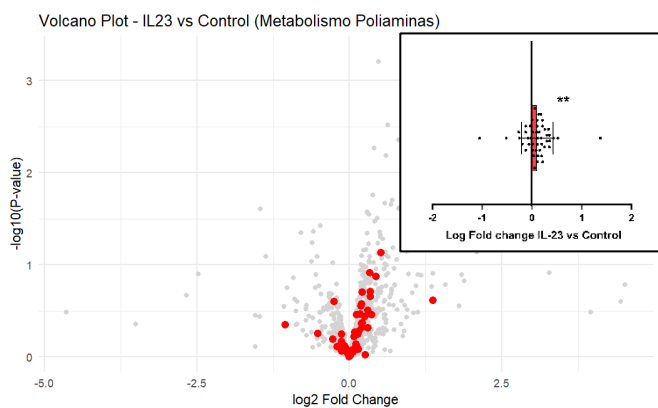
Las vías de metabolismo de poliaminas, aminoácidos y ácidos grasos mostraron una regulación positiva significativa bajo el tratamiento con IL-23. Este incremento, sin embargo, se redujo de manera significativa en presencia de rapamicina, lo cual incluye también la reducción en la expresión de proteínas asociadas al metabolismo de la glucosa (Figura 5: B1, B2, B3, B4 y B6). Aunque en este análisis nos hemos centrado en estas rutas específicas debido a su importancia para la función de las células $\gamma\delta 17T$, los *volcano plots* sugieren que estos efectos se observan en una amplia variedad de proteínas relacionadas con el metabolismo (Figura 5B).

Adicionalmente, se compararon los logFC de ambas condiciones, y se observaron reducciones significativas en todas las rutas metabólicas evaluadas. Esto sugiere que mTOR juega un papel fundamental en la regulación de varias vías metabólicas inducidas por IL-23, impactando así en el perfil metabólico general de estas células.

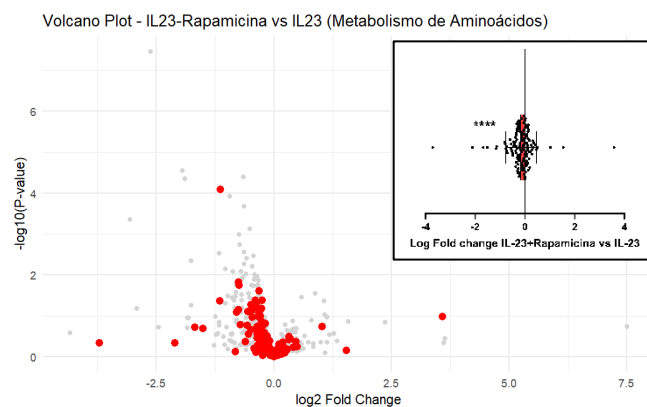
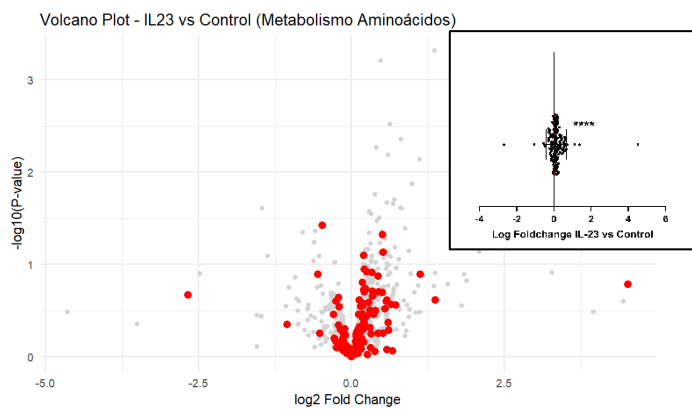
A

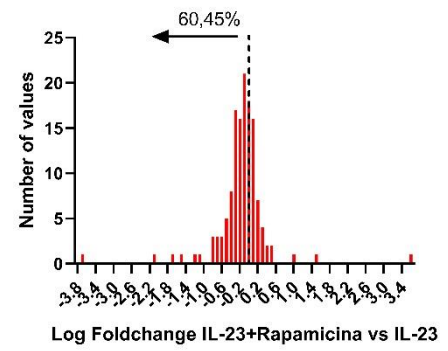
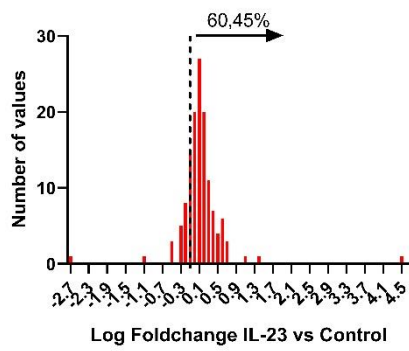


B1

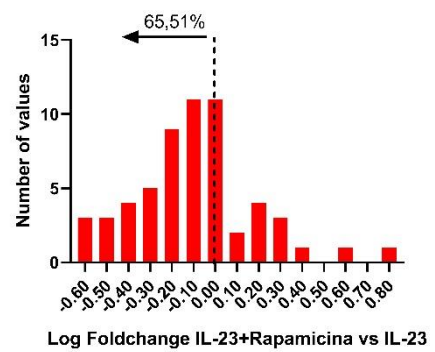
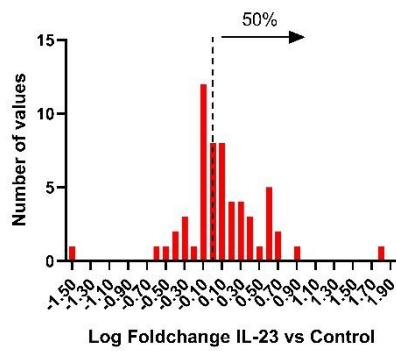
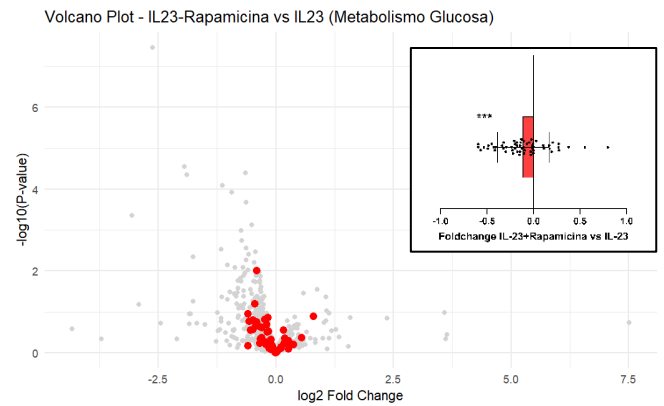
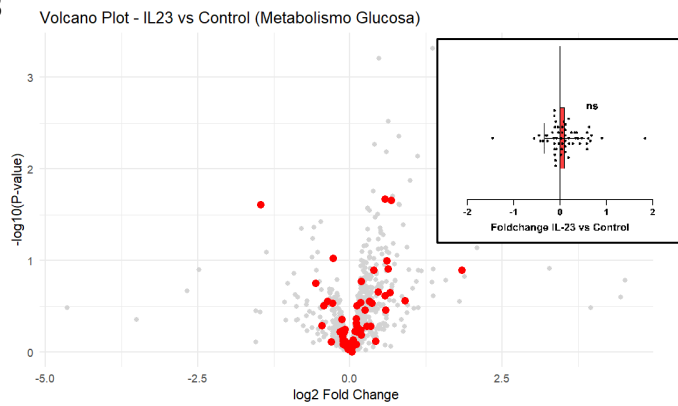


B2

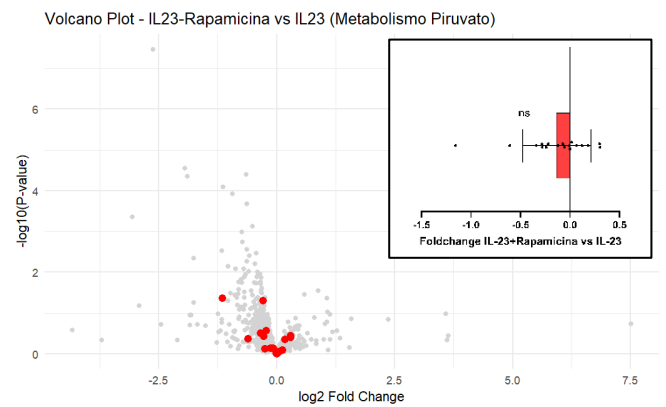
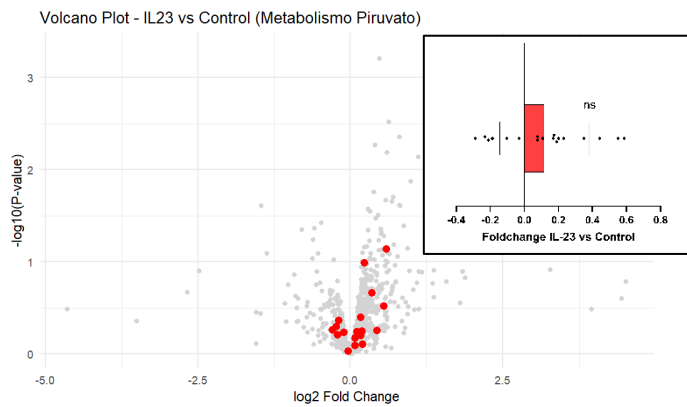


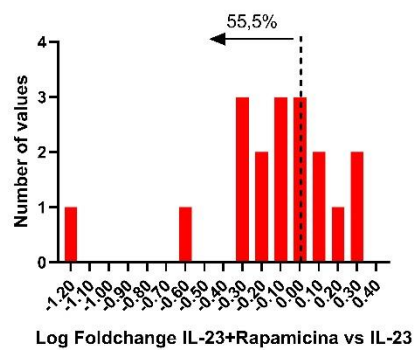
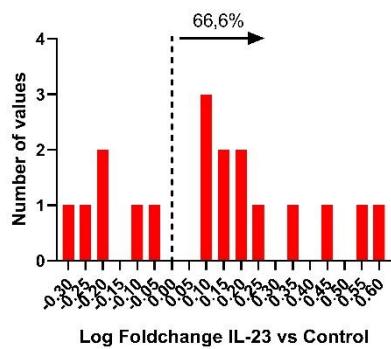


B3

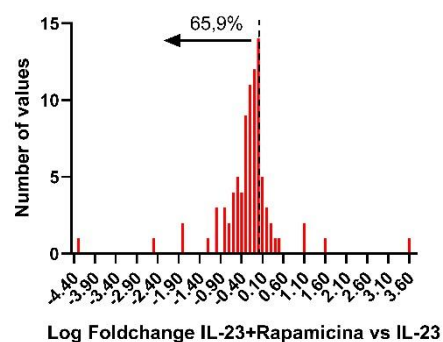
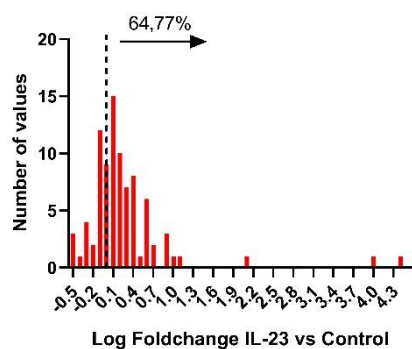
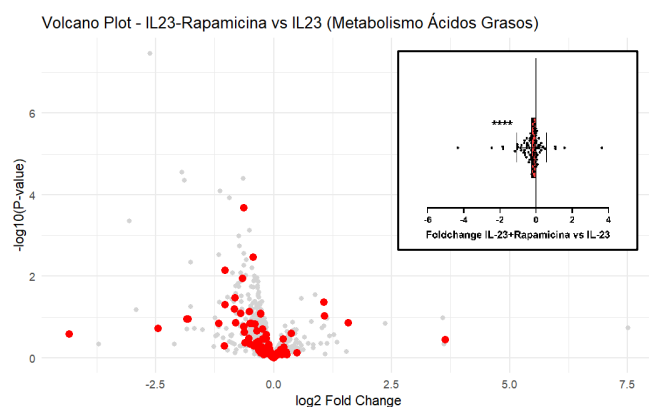
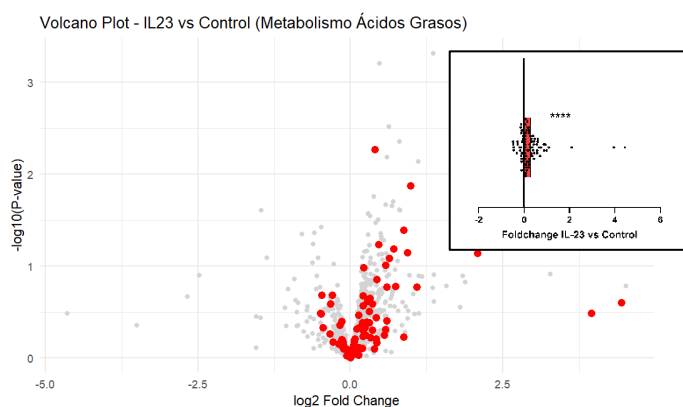


B4





B5



C

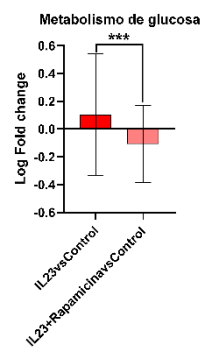
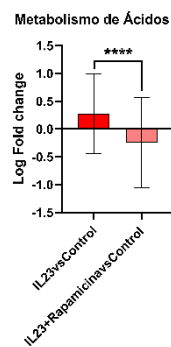
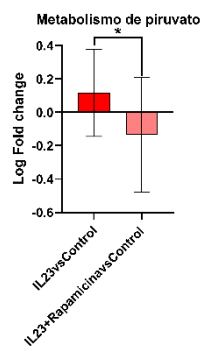
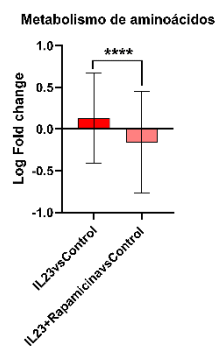
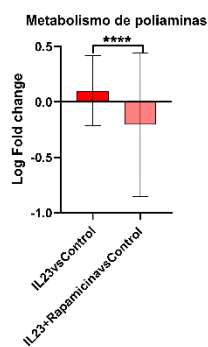


Figura 5. Aumento de la expresión de proteínas relacionadas con rutas metabólicas enriquecidas en células gammadelta17 de un modelo murino de psoriasis. **A.** Análisis de enriquecimiento funcional de rutas metabólicas, representado mediante el puntaje de enriquecimiento normalizado (NES) para cada ruta. **B.** Volcano plots que representan la expresión de proteínas y histogramas de distribución de valores de logFC, con sus respectivos porcentajes, para las comparaciones IL-23 vs. Control e IL-23 con rapamicina vs. IL-23 en distintos procesos metabólicos: B1. Metabolismo de poliaminas, B2. Metabolismo de aminoácidos, B3. Metabolismo de glucosa, B4. Metabolismo de piruvato y B5. Metabolismo de ácidos grasos. En cada gráfico, las proteínas resaltadas en rojo pertenecen a la ruta de interés y los recuadros muestran los logFC y la comparación de la suma de todos frente a un valor hipotético = 0 (p-valor < 0,05; p < 0,01 **; p < 0,001 ***). **C.** Comparación del logFC entre las condiciones IL-23 vs. Control y IL-23+Rapamicina vs. Control, destacando las rutas metabólicas seleccionadas (p-valor < 0,05; p < 0,01 **; p < 0,001 ***).

4.2 mTOR influye en la respuesta a IL-23

Para analizar el efecto de la estimulación con IL-23 sobre la expresión de proteínas en las $\gamma\delta 17T$, se extrajeron aquellas cuya expresión era significativamente mayor en la condición tratada con IL-23 (Figura 6A1). En primer lugar, con mayor nivel de significancia, IL17F, cuya expresión inducida por IL-23 y su implicación en la fisiopatología de la psoriasis han sido plenamente estudiadas (Kapp, 1993). Adicionalmente, se induce la expresión de JunB, un factor de transcripción con una función relevante en algunas células T, como las Th17 (Katagiri et al., 2021); sin embargo, su rol específico en las $\gamma\delta 17T$ aún no está estudiado.

Se observa también un incremento de la expresión de CPD, una carboxipeptidasa que se encarga de procesar proteínas dentro de la célula. Esto podría influir en su función al procesar moléculas relacionadas con la inflamación, como citoquinas o quimioquinas, aunque este punto no ha sido suficientemente estudiado. Por último, se detecta una represión de la expresión de PDCD4, un fenómeno asociado con un aumento en la proliferación y en la

respuesta inmune, el cual ha sido documentado en estudios previos sobre Th17 (Cao et al., 2024).

Como aproximación para estudiar el efecto de mTOR sobre la respuesta a IL-23, se comparó la condición de tratamiento con IL-23 y rapamicina con la de IL-23 sola, obteniendo una serie de proteínas cuya expresión se ve afectada. (Figura 6A2). SQLE y HMGCS1 están involucrados en el metabolismo del colesterol, lo que puede impactar directamente la activación de las células $\gamma\delta 17T$ (Bietz et al., 2017). PCLAF influye en la regulación del ciclo celular y también juega un papel en la diferenciación y función de células T (Liu et al., 2022), BUB1 también es un regulador del ciclo, sugiriendo un rol similar.

Adicionalmente, se analizó si la expresión significativa de estas proteínas que habíamos observado en la comparación IL-23 vs Control se veía afectada por mTOR (Figura 6B). Observamos una tendencia opuesta a lo previamente registrado, lo que sugiere que mTOR está modulando la respuesta a IL-23.

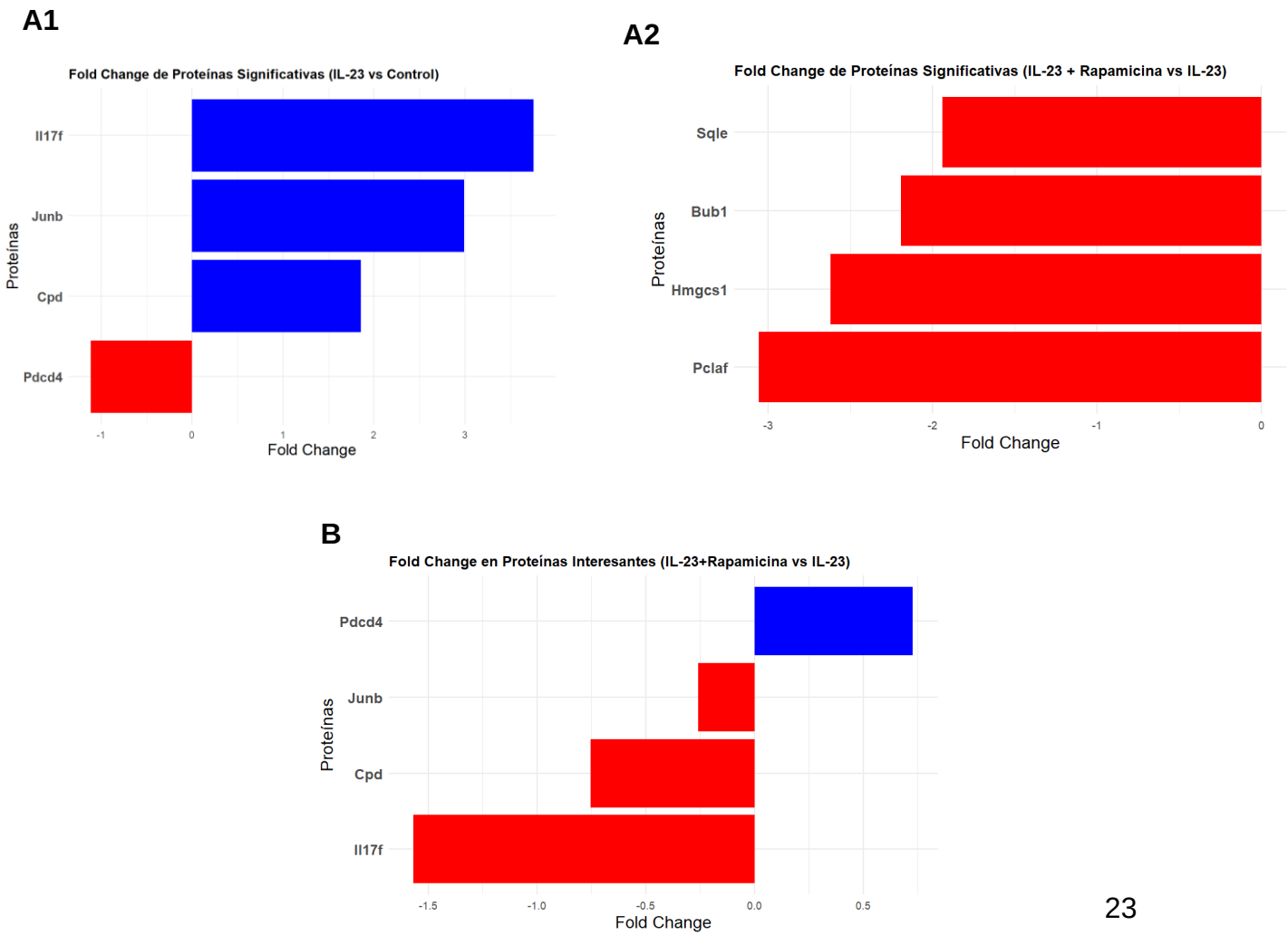


Figura 6. Comparación del cambio de expresión de genes significativos en las condiciones IL-23 vs Control e IL-23+Rapamicina vs IL-23. A. Gráficos de logFC de genes significativos (adj.p-value < 0,05): **A1.** Comparación IL-23 vs Control. **A2.** Comparación IL-23+Rapamicina vs IL-23. Cada gráfico muestra los genes que resultaron significativos en cada comparación, representando su cambio de expresión en la respectiva condición. **B.** LogFC de los genes que fueron significativos en la comparación IL-23 vs Control, mostrando su variación en la comparación IL-23+Rapamicina vs IL-23.

5. DISCUSIÓN

El análisis de expresión diferencial en células $\gamma\delta 17T$ reveló que el tratamiento con IL-23 induce un enriquecimiento en varias rutas metabólicas clave, siendo el metabolismo de las poliaminas la principal vía involucrada. Las poliaminas, como putrescina, espermidina y espermina, son moléculas orgánicas esenciales en diversos procesos celulares, entre los que se incluye la proliferación y la regulación de la respuesta inmune. Se ha descrito que estas moléculas pueden influir en la patogenicidad de las células Th17, asociadas a condiciones inflamatorias, por lo que podemos hipotetizar que en las células $\gamma\delta 17T$ también, lo que revela una posible nueva diana terapéutica (Wagner et al., 2018).

Además del metabolismo de poliaminas, las rutas de metabolismo de piruvato, glucosa y aminoácidos también presentaron una mayor expresión bajo el estímulo de IL-23. Estas rutas metabólicas son fundamentales para el mantenimiento energético y la biosíntesis, lo cual es indicativo de un perfil metabólicamente activo en respuesta a IL-23. El metabolismo de la glucosa, en particular, es crucial en la activación y función de las células T, lo que sugiere que IL-23 no solo promueve la respuesta inflamatoria de las células $\gamma\delta 17T$, sino que también favorece un entorno metabólico que sustenta esta activación.

El rol de mTOR en la regulación del metabolismo celular es bien conocido, especialmente en el contexto de la función inmune. En particular, su inhibición ha mostrado efectos profundos en la regulación de la homeostasis de células T y en la restricción de rutas anabólicas que facilitan la proliferación y la activación celular (Thomson et al., 2009). Los resultados que se han obtenido respaldan

esta observación, sugiriendo que mTOR es fundamental para que las células $\gamma\delta 17T$ desarrollen un perfil metabólico que sustente la inflamación inducida por IL-23. Este efecto se extiende a las vías involucradas en el metabolismo energético y biosintético, esenciales para el mantenimiento de una respuesta inflamatoria eficiente.

En conclusión, los resultados de este proyecto resaltan la importancia de mTOR en la regulación metabólica de las células $\gamma\delta 17T$ y sugieren que el uso de inhibidores de mTOR, como la rapamicina, podría tener aplicaciones terapéuticas en condiciones inflamatorias donde las $\gamma\delta 17T$ juegan un papel relevante. Futuras investigaciones podrían profundizar en cómo la modulación de rutas específicas, como el metabolismo de poliaminas, contribuiría a un control más preciso de la actividad inflamatoria de las células $\gamma\delta 17T$ en enfermedades autoinmunes.

Modular la expresión de proteínas específicas como JunB, CPD y PDCD4, cuya expresión cambia significativamente en respuesta a IL-23, según se ha observado en los resultados, podría ser clave en el desarrollo de esta respuesta. JunB, un factor de transcripción que regula la función patogénica de células Th17, puede tener la misma o parecida implicación en la actividad inflamatoria en las $\gamma\delta 17T$. Por otro lado, CPD, una carboxipeptidasa involucrada en el procesamiento de proteínas, también sugiere un papel en la inflamación a través de la modificación de mediadores de inflamación como citoquinas.

Finalmente, PDCD4, que está asociado a la inhibición de la proliferación celular y la reducción de la actividad inflamatoria, se encuentra reprimido en respuesta a IL-23, por lo que su sobreexpresión se presenta como una posible estrategia para reducir la patogenicidad de estas células. Dado que se observa que la rapamicina afecta la expresión de estas proteínas en respuesta a IL-23, la modulación de mTOR podría ajustarse para mejorar estos efectos terapéuticos. Un enfoque futuro podría combinar la modulación de la expresión de JunB, CPD y PDCD4, con la inhibición de mTOR, proporcionando un control más específico de la actividad inflamatoria de las células $\gamma\delta 17T$.

6. CONCLUSIONES

1. El metabolismo de las poliaminas es la vía metabólica más enriquecida en células $\gamma\delta 17T$ en respuesta a IL-23.
2. IL-23 activa rutas metabólicas esenciales, como las de glucosa, piruvato y aminoácidos, pero esta activación se ve alterada con la inhibición de mTOR.
3. La expresión de JunB, CPD y PDCD4 cambia significativamente en respuesta a IL-23, y este cambio también se ve afectado por la inhibición de mTOR.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Boehncke, W., & Schön, M. P. (2015). Psoriasis. *The Lancet*, 386(9997), 983–994. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(14\)61909-7](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(14)61909-7).
2. Kapp, A. (1993). The role of cytokines in the psoriatic inflammation. *Journal of Dermatological Science*, 5(3), 133–142. [https://doi.org/10.1016/0923-1811\(93\)90760-M](https://doi.org/10.1016/0923-1811(93)90760-M).
3. Daudén, E., Puig, L., Ferrándiz, C., Sánchez-Carazo, J. L., & Hernanz-Hermosa, J. M. (2016). Consensus document on the evaluation and treatment of moderate-to-severe psoriasis: Psoriasis Group of the Spanish Academy of Dermatology and Venereology. *Journal of The European Academy of Dermatology and Venereology*, 30. <https://doi.org/10.1111/jdv.13542>.
4. Fits, L. van der, Mourits, S., Voerman, J. S. A., Kant, M., Boon, L., Laman, J. D., Cornelissen, F., Mus, A.-M., Florencia, E., Prens, E. P., & Lubberts, E. (2009). Imiquimod-Induced Psoriasis-Like Skin Inflammation in Mice Is Mediated via the IL-23/IL-17 Axis. *Journal of Immunology*, 182(9), 5836–5845. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.0802999>.
5. Zhang, P., Su, Y., Li, S., Chen, H., Wu, R., & Wu, H. (2023). The roles of T cells in psoriasis. *Frontiers in Immunology*. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1081256>.

6. Lopes, N., McIntyre, C., Martin, S., Raverdeau, M., Sumaria, N., Kohlgruber, A. C., Fiala, G. J., Agudelo, L. Z., Dyck, L., Kane, H., Douglas, A., Cunningham, S., Prendeville, H., Loftus, R. M., Carmody, C., Pierre, P., Kellis, M., Brenner, M. B., Argüello, R. J., ... Lynch, L. (2021). Distinct metabolic programs established in the thymus control effector functions of $\gamma\delta$ T cell subsets in tumor microenvironments. *Nature Immunology*, 22(2), 179–192. <https://doi.org/10.1038/S41590-020-00848-3>.
7. Latha, T. S., Reddy, M. C., Durbaka, P. V. R., Rachamalla, A., Pallu, R., & Lomada, D. (2014). $\gamma\delta$ T Cell-Mediated Immune Responses in Disease and Therapy. *Frontiers in Immunology*, 5, 571. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2014.0057>.
8. Raychaudhuri, S. K., Raychaudhuri, S. K., & Raychaudhuri, S. R. (2014). mTOR Signaling Cascade in Psoriatic Disease: Double Kinase mTOR Inhibitor a Novel Therapeutic Target. *Indian Journal of Dermatology*, 59(1), 67–70. <https://doi.org/10.4103/0019-5154.123499>.
9. Buerger, C. (2018). Epidermal mTORC1 Signaling Contributes to the Pathogenesis of Psoriasis and Could Serve as a Therapeutic Target. *Frontiers in Immunology*, 9, 2786. <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.02786>.
10. Waickman, A. T., & Powell, J. D. (2012). mTOR, metabolism, and the regulation of T-cell differentiation and function. *Immunological Reviews*, 249(1), 43–58. <https://doi.org/10.1111/J.1600-065X.2012.01152.X>.
11. Awasthi, A., Riol-Blanco, L., Jäger, A., Korn, T., Pot, C., Galileos, G., Bettelli, E., Kuchroo, V. K., & Oukka, M. (2009). Cutting Edge: IL-23 receptor GFP Reporter mice reveal distinct populations of IL-17-Producing cells. *The Journal of Immunology*, 182(10), 5904–5908. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.0900732>.
12. Marchingo, J. M., Sinclair, L. V., Howden, A. J. M., & Cantrell, D. A. (2020). Quantitative analysis of how Myc controls T cell proteomes and metabolic pathways during T cell activation. *eLife*, 9. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.53725>
13. Wagner, A., Wang, C., DeTomaso, D., Koul, A., Regev, A., Kuchroo, V. K., & Yosef, N. (2018). Cell-specific metabolic models reveal novel metabolic regulators of Th17 pathogenicity: from single-cell RNA-Seq to actionable

metabolic targets. *The Journal of Immunology*, 200(1_Supplement), 163.21.
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.200.supp.163.21>.

14. Katagiri, T., Kameda, H., Nakano, H., & Yamazaki, S. (2021). Regulation of T cell differentiation by the AP-1 transcription factor JunB. *Immunological Medicine*, 44(3), 197–203. <https://doi.org/10.1080/25785826.2021.1872838>.

15. Cao, S., Colonna, M., & Deepak, P. (2024). DOP19 High dimensional profiling of IL-23-responsive cells revealed molecular signatures that predict response to anti-IL-23 therapy in patients with Crohn's Disease. *Journal of Crohn S and Colitis*, 18(Supplement_1), i106–i107. <https://doi.org/10.1093/ecco-icc/ijad212.0059>.

16. Bietz, A., Zhu, H., Xue, M., & Xu, C. (2017). Cholesterol metabolism in T cells. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01664>.

17. Liu, X., Cheng, C., Cai, Y., Gu, Y., Wu, Y., Chen, K., & Wu, Z. (2022). Pan-cancer analyses reveal the regulation and clinical outcome association of PCLAF in human tumors. *International Journal of Oncology*, 60(6). <https://doi.org/10.3892/ijo.2022.5356>.

18. Thomson, A. W., Turnquist, H. R., & Raimondi, G. (2009). Immunoregulatory functions of mTOR inhibition. *Nature Reviews. Immunology*, 9(5), 324–337. <https://doi.org/10.1038/nri2546>.