

Informe final publicable de proyecto

Identificación de TMEM176B como nuevo punto de control intrínseco de las células Th17

Código de proyecto ANII: FCE_3_2022_1_172213

Fecha de cierre de proyecto: 01/03/2025

RUSSO ROSSI, Soffa (Responsable Técnico - Científico)

HILL MONGABURE, Marcelo Rafael (Investigador)

MAHMOUD, Yamil (Investigador)

MALCUORI, Mateo (Investigador)

MORAES VIEIRA, Pedro (Investigador)

RABINOVICH, Gabriel (Investigador)

SEGOVIA DUARTE, Maria Mercedes (Investigador)

INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO (Institución Proponente) \\ INSTITUTO PASTEUR DE MONTEVIDEO

Resumen del proyecto

Las células T helper 17 (Th17) son células T CD4 con funciones importantes en respuestas contra bacterias y hongos extracelulares en barreras mucosas. Las células Th17 juegan un rol clave en diferentes patologías, siendo ampliamente estudiadas en enfermedades autoinmunes. Sin embargo, el rol de estas células en el cáncer aún es controvertido, reportándose tanto efectos anti-tumorales como pro-tumorales. Esta controversia puede explicarse por una característica remarcable de las células Th17, su gran plasticidad. Las células Th17 pueden tener propiedades reguladoras o inflamatorias dependiendo del ambiente de citoquinas en el que se diferenciaron. Las bases moleculares que determinan la función reguladora o efectora de las Th17 son aún muy mal comprendidas.

En el presente proyecto estudiamos un nuevo regulador intrínseco de las células Th17. Este nuevo regulador es TMEM176B, un canal iónico con capacidades inmunorreguladoras. Nuestro grupo tiene amplia experiencia en el estudio de TMEM176B a nivel de las células dendríticas. Sin embargo, el rol que cumple en las células Th17 no había sido abordado hasta el momento.

Resultados preliminares mostraban que TMEM176B determina la diferenciación hacia el fenotipo regulador. Por lo tanto, nos propusimos caracterizar a TMEM176B como conductor de dicho fenotipo. Estudiamos los mecanismos por los cuales TMEM176B determina el fenotipo regulador, así como su relevancia en células humanas in vitro y en modelos murinos de cáncer in vivo.

La inhibición de Tmem176b resultó en células Th17 con un fenotipo más efector, con aumento en producción de IFN γ , aumento en la fosforilación de AKT y de la glicólisis, y disminución de las capacidades regulatorias.

En humanos, encontramos que la expresión de Tmem176b en células Th17 en tumores de pacientes con cáncer colorrectal se asociaba a un peor pronóstico.

Por lo tanto, aportamos un nuevo blanco para la modulación farmacológica de las células Th17, pudiendo tener aplicabilidad en cáncer.

Ciencias Médicas y de la Salud / Medicina Básica / Inmunología / Inmunología celular

Palabras clave: TMEM176B / Células Th17 / /

Antecedentes, problema de investigación, objetivos y justificación.

Las células T CD4+ colaboradoras son actores claves en la respuesta inmune adaptativa. Luego del reconocimiento de su antígeno específico presentado por una célula presentadora profesional, estas células se diferencian, dependiendo del ambiente de citoquinas, a diferentes subpoblaciones. Una de estas subpoblaciones son las células T helper 17 (Th17). Las células Th17 ejercen funciones inmunes críticas contra bacterias y hongos extracelulares en barreras mucosas (1), y tienen un rol patogénico determinante en diversas enfermedades autoinmunes (2). En cáncer, el rol de las células Th17 es aún controvertido. Han sido reportados estudios que muestran un efecto anti-tumoral de las células Th17, así como otros que muestran su participación en la progresión tumoral.

Los efectos opuestos que las células Th17 parecen tener en el cáncer pueden explicarse por la gran heterogeneidad y/o plasticidad de estas células. A diferencia de las células Th1 y Th2, que son relativamente estables, las células Th17 presentan una gran plasticidad (3). Inicialmente, la diferenciación Th17 se vinculó a la acción conjunta de IL-6 y TGF-beta sobre linfocitos cooperadores vírgenes (4–7). Además, a la IL-23 se le atribuyó un papel estabilizador del fenotipo al tiempo que promueve la proliferación de los clones Th17 diferenciados (4–7). Años más tarde fue demostrado que las Th17 pueden

diferenciarse en ausencia de TGF-beta (8). La combinación de IL-1beta con IL-6 e IL-23 condujo a la generación de células Th17 con fuerte potencial efector o patogénico (8). Además, desde etapas precoces se reconoció que los linfocitos Th17 tienen aspectos ontogénicos y funcionales muy cercanos a las células T reguladoras (Treg)(6). De esta manera, hoy sabemos que las células Th17 pueden tener propiedades reguladoras o efectoras dependiendo del microambiente citoquinínico en el que se diferencian. Estos fenotipos contrarios pueden explicar por qué las células Th17 tienen potentes propiedades anti-tumorales en algunos diseños experimentales, mientras que en otros promueven el crecimiento tumoral. Sin embargo, las bases moleculares de cómo, cuándo y por qué las células Th17 se diferencian hacia poblaciones efectoras o reguladoras son todavía muy mal comprendidas (9).

Estos dos fenotipos de células Th17 se diferencian además en sus vías metabólicas. En los últimos años el estudio del metabolismo en células del sistema inmune, ha cobrado gran relevancia. De hecho, ha surgido el concepto de que las funciones inmunológicas se asocian fuertemente a programas metabólicos que aportan los niveles de energía y metabolitos necesarios en cada caso (10). Dicho de otra manera, hoy conocemos que nutrientes y metabolitos son reguladores importantes de la función de células inmunes. Así, la inmunidad adaptativa es orquestada por una intercomunicación dinámica y bidireccional entre señales inmunológicas y el metabolismo celular (10). Un estudio reciente mostró que las células Th17 generadas in vitro en presencia de IL-6, IL-1beta e IL-23 presentan un perfil metabólico diferente a las células generadas en presencia de TGF-beta e IL-6 (11). Las células Th17 efectoras o "patogénicas" presentan una mayor expresión de genes asociados a la vía de la glicólisis, y la capacidad glicolítica basal y máxima es mucho mayor al de las células Th17 reguladoras o "no patogénicas"(11). Estas células presentan aumentada la vía de AKT/mTOR, la biosíntesis de colesterol y el metabolismo de aminoácidos, mientras que las células Th17 "no patogénicas" presentaban una mayor síntesis de ácidos grasos (11). Con algunas diferencias, lo mismo se observa en células Th17 generadas in vivo (12).

A pesar del conocimiento generado en relación al fenotipo, metabolismo y funcionalidad, todavía no se comprende cómo se regula a nivel molecular la decisión de diferenciar la célula Th17 hacia la subpoblación efectora o reguladora in vitro e in vivo. Entender cómo modular ese aspecto es de gran relevancia para diversas patologías. Mientras en el cáncer favorecer la diferenciación a células Th17 "patogénicas" sería beneficioso, en enfermedades autoinmunes (como la esclerosis múltiple, artritis reumatoidea, enfermedad inflamatoria intestinal, entre otras) la diferenciación hacia "no patogénicas" sería lo buscado. En el presente proyecto propusimos el estudio de un posible nuevo regulador intrínseco de las células Th17, el cual puede constituir un blanco molecular para modular dichas células. Este nuevo regulador es TMEM176B, proteína inmunoreguladora cuya función fue descrita por primera vez por nuestro equipo (13).

TMEM176B es una proteína intracelular transmembrana que pertenece a la familia de proteínas MS4A (14). Se encuentra expresada de forma ubicua y está localizada en la membrana endofagosomal y en la red trans-Golgi (13, 15). A nivel la expresión en subtipos de células del sistema inmune, TMEM176B presenta una alta expresión en células dendríticas derivadas de la médula ósea y en células dendríticas convencionales (15). La expresión de TMEM176B ha sido asociada al estado inmaduro de los monocitos y células dendríticas, disminuyendo su expresión notoriamente luego de la estimulación inflamatoria (16). Recientemente, ha sido reportado que células dendríticas convencionales tipo 2 (cDC2) provenientes de ratones (17) y humanas (18) expresan TMEM176B. Nuestro grupo fue el primero en mostrar la función de TMEM176B. Se demostró que TMEM176B es un canal/transportador iónico (19). En DCs, TMEM176B regula el pasaje fagosomal de cationes monovalentes lo que impacta directamente en la actividad V-ATPasa y de esa manera en el pH fagosomal (13).

Mi trabajo de doctorado contribuyó a la publicación de un artículo en el que mostramos el rol de TMEM176B a nivel del sistema inmune en el cáncer (19). En ese trabajo mostramos que TMEM176B inhibe al inflammasoma NLRP3 al controlar al calcio citosólico. Su deficiencia resulta en una mayor respuesta inmune anti-tumoral, y una mayor eficacia de los bloqueadores de puntos de control (anti-PD1 y anti-CTLA4), de manera

dependiente del inflamasoma (19). En dicho trabajo mostramos también que la deficiencia de TMEM176B se asocia con un aumento en frecuencia de células Th17, y que a su vez la IL17 sería necesaria para la respuesta anti-tumoral generada en ratones *Tmem176b*^{-/-} (19). Luego hemos trabajado en caracterizar cómo la modulación farmacológica y la deleción genética de TMEM176B en DCs modulan respuestas Th17 anti-tumorales. Habíamos mostrado entonces que en los ratones deficientes en *Tmem176b* había una mayor activación del inflamasoma en células dendríticas convencionales tipo 2 (cDC2), y una mayor frecuencia de linfocitos Th17 en el ganglio que drena el tumor de estos ratones comparados con los WT. Dado que las células cDC2 están especializadas en la diferenciación de los linfocitos TCD4 hacia las subpoblaciones Th2 y Th17 (20), evaluamos si la deficiencia de TMEM176B en las cDC2 estaba influenciando la diferenciación hacia Th17.

Mediante separación celular por citometría de flujo de cDC2 de ganglios que drenan el tumor, mostramos que las cDC2 provenientes de ratones deficientes de TMEM176B o tratados con BayK8644 inducían una mayor diferenciación de linfocitos TCD4 OT2 hacia células Th17 que las cDC2 de ratones WT o tratados con vehículo, respectivamente. A su vez, esto fue dependiente del inflamasoma ya que el aumento en la diferenciación hacia células Th17 se pierde en ratones deficientes en TMEM176B y Caspasa 1. Recientemente se reportó la expresión de TMEM176B en células ROR-gamma-t positivas como son las células Th17, células linfoides innatas tipo 3 y células dendríticas convencionales tipo 2 ROR-gamma-t+ (15, 21). Sorprendentemente, *Tmem176b* forma parte del selecto grupo de 11 genes cuya expresión depende directamente de ROR-gamma-t (22). Si bien el rol de TMEM176B en células dendríticas ha sido bien explorado, su rol en las células Th17 no ha sido abordado.

Por lo tanto, nuestros resultados previos sugerían que la expresión de TMEM176B en células dendríticas es capaz de modular el balance regulador/efector de las Th17. Sin embargo, debido a que TMEM176B también está expresado en las propias células Th17, el objetivo del presente proyecto fue estudiar cuál es el papel que juega este canal iónico en las células Th17. Nuestros resultados preliminares sugerían que TMEM176B dirige el fenotipo regulador en las Th17. En ese contexto, nos propusimos caracterizar a TMEM176B como conductor del fenotipo regulador estudiando los mecanismos por los cuales TMEM176B conduce al fenotipo regulador, así como su relevancia en modelos preclínicos de cáncer y en células humanas.

Para abordar este objetivo general nos propusimos evaluar el rol de TMEM176B en la activación del inflamasoma, en la vía de señalización Akt/mTOR y en el inmunometabolismo de las células Th17. También fue nuestro objetivo evaluar la relevancia biológica de las células Th17 deficientes en TMEM176B en un modelo de cáncer murino así como en humanos.

Metodología/Diseño del estudio

En el presente proyecto se planteó el estudio del rol intrínseco de *Tmem176b* en las células Th17.

Para abordar este objetivo primeramente evaluamos el rol de TMEM176B en la activación del inflamasoma en células Th17. Para esto diferenciamos células Th17 a partir de linfocitos T CD4⁺ naive purificados de esplenocitos de ratones *Tmem176b*^{-/-} o WT. La purificación se realizó mediante separación magnética por selección negativa (Miltenyi Biotech.). La diferenciación de las células T CD4⁺ naive a Th17 se logró cultivando a las células durante 6 días en presencia de TGF-beta (2,5 ng/mL), IL6 (30 ng/mL) y anti-IFNgamma (10 ug/mL). Al día 3 del cultivo se cambió el medio manteniendo la concentración de las citoquinas y anticuerpos antes mencionados y agregando IL2 (5 ng/mL).

Una vez diferenciadas las células Th17 se estimularon durante 4 horas con ATP (5 mM) y se evaluó la activación de Caspasa 8 y Caspasa 1 por citometría de flujo. Alternativamente, se diferenciaron células Th17 WT en presencia de diferentes concentraciones de BayK8644 (inhibidor farmacológico de TMEM176B) y luego de diferenciadas se estimularon durante 4 horas con ATP (5 mM) y se evaluó la activación de Caspasa 8 por citometría de flujo.

Paralelamente también se evaluó la fosforilación de AKT en condiciones basales por Western Blot. Para esto al menos 2 millones de células Th17 WT o Tmem176b^{-/-} se lisaron y se sembraron 30 ug de proteínas en geles de poliacrilamida. Se transfirió a membrana de nitrocelulosa y se incubó con anticuerpos anti-phospho AKT (Ser473) o anti-AKT (pan). Se incubó con anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa y se reveló con sustrato ECL (SuperSignal West Pico PLUS).

También se evaluó el perfil metabólico de las células Th17 WT y Tmem176b^{-/-}. Para esto se diferenciaron células Th17 WT y Tmem176b^{-/-} y, en colaboración con el Dr. Carlos Escande, realizamos pruebas de estrés mitocondrial (Mito Stress Test) y de glicólisis (Glycolysis Stress Test) en el equipo Seahorse Analyzer.

Se evaluó la producción de IFN γ por células Th17 Tmem176b^{-/-} con la vía de la glicólisis inhibida mediante 2-deoxiglucosa y la vía de la fosforilación oxidativa inhibida con oligomicina. Para esto células Th17 Tmem176b^{-/-} diferenciadas in vitro se estimularon con PMA (50ng/mL), ionomicina (1ug/mL) y Brefeldina A en presencia o no de 2-deoxiglucosa (5 mM) u oligomicina (1 uM) durante 5h. Luego de este tiempo se marcaron las células para evaluar la producción de IFN γ por citometría de flujo.

Dentro de los objetivos planteados en este proyecto se encontraba la evaluación de la funcionalidad de las células Th17 Tmem176b^{-/-}. Para abordar este objetivo, primeramente, se evaluó la capacidad de estas células de inhibir la proliferación de células T CD8. Para esto se generaron células Th17 reguladoras WT y Tmem176b^{-/-} y se co-cultivaron con esplenocitos de ratones OT1 junto con péptido OVA-I. Luego de 3 días se analizó la proliferación de los linfocitos T CD8 evidenciada por la dilución de la marcación de CellTrace Far Red por citometría de flujo. También se evaluó la funcionalidad de estas células in vivo. Para esto, se generaron células Th17 a partir de esplenocitos de ratones OT2 u OT2 Tmem176b^{-/-} en presencia del cocktail de citoquinas especificado más arriba y 1ug/mL de péptido OVA (323-339). Luego de 6 días diferenciación se administraron vía intravenosa 6 millones de Th17 WT o Tmem176b^{-/-} a ratones B6 que previamente se les habían inoculado células tumorales EG7.OVA y estaban siendo tratados con anti-PD1. Se siguió el crecimiento tumoral y la supervivencia de estos ratones.

El último objetivo de este proyecto era estudiar el rol de TMEM176B en células Th17 humanas. Para esto se purificaron células T CD4⁺ naive de células mononucleares de sangre periférica a partir de conos de leucorreducción obtenidos en aféresis de donantes de plaquetas. Estas células se diferenciaron a células Th17 por estimulación con perlas anti-CD3/anti-CD28 (1 perla cada 2 células), TGF-beta (1 ng/mL), IL-6 (20 ng/mL) e IL23 (100 ng/mL). Al día 3 de cultivo se retiran las perlas y se agrega IL2 (10 ng/mL). TMEM176B se inhibió durante la diferenciación utilizando BayK8644 (5-10 uM). Al quinto día de diferenciación se evaluó por citometría de flujo el fenotipo de las células y la producción de IFN γ .

El rol de TMEM176B en las células Th17 humanas también se estudió a través del análisis bioinformático de la correlación de expresión de TMEM176B en Th17 con el pronóstico de pacientes con cáncer de colon. Para esto se utilizaron los datos de secuenciación de ARN de célula única (scRNAseq) de Pelka et al. (23).

Los datos de Pelka et al. (23) están disponibles públicamente, incluyendo los datos de expresión, sus anotaciones de tipos y subtipos celulares, así como los metadatos de los pacientes. La exploración y el análisis de los datos de expresión de célula única se realizaron usando Seurat (24). Partiendo de las células anotadas como "T, NK e ILC3" (76.965 células), se filtraron los datos para retener solo las células T y visualizar los distintos clusters dentro de este grupo celular. Se identificó y anotó a las células Th17 manualmente usando los marcadores RORC e IL-17 junto con anotaciones de autores y para ellas se estudió la expresión de TMEM176B. A su vez, esta expresión se correlacionó con los distintos grupos clínicos de pacientes categorizados en Pelka et al (23). Los pacientes están originalmente clasificados según la condición MMRd o MMRp, y según si presentaron o no infiltración de células tumorales en los ganglios drenantes (como ganglios positivos y negativos, respectivamente).

Resultados, análisis y discusión

Nuestra hipótesis de trabajo es que TMEM176B controla funciones reguladoras de las células Th17, pudiendo constituir un nuevo blanco sobre las células Th17 para potenciar sus funciones efectoras. En cuanto al mecanismo involucrado hipotetizamos 3 vías no excluyentes. Por un lado, dado que hemos mostrado que TMEM176B inhibe la activación del inflammasoma NLRP3, y que se ha reportado la activación de NLRP3 en células Th17, hipotetizamos que TMEM176B inhibe funciones efectoras de las células Th17 a través de la inhibición del inflammasoma. Por otro lado, en algunas líneas celulares tumorales TMEM176B inhibe la fosforilación de AKT. Qué es lo que sucede a nivel de las células Th17 no es conocido. Ha sido reportado que la activación de la vía AKT/mTOR en células Th17 promueve la expresión de Tbet e IFN-gamma, induciendo un fenotipo efector. Por lo tanto, hipotetizamos que la modulación de las funciones reguladoras de las células Th17 por TMEM176B podría darse por regulación de la vía AKT/mTOR. Por último, dado que las vías metabólicas determinan el fenotipo de las células Th17, nuestra hipótesis es que TMEM176B podría estar modulando, a través de la movilización de iones calcio y/o la fosforilación de AKT, las vías metabólicas y por lo tanto el fenotipo de las células Th17.

Comenzamos entonces evaluando si TMEM176B regula la activación del inflammasoma en células Th17. Para esto generamos células Th17 WT y Tmem176b-/- con cocktail de citoquinas que induce Th17 reguladoras (TGF- β e IL-6) y una vez diferenciadas se estimularon con ATP. Encontramos que las células Th17 Tmem176b-/- tienen una mayor activación de la Caspasa 8 luego del estímulo con ATP que las células Th17 WT, pero no se observa aumento de Caspasa 1. A su vez, si las células Th17 WT se diferencian en presencia de BayK8644, y luego se estimulan con ATP se da un aumento dosis dependiente del porcentaje de células con caspasa 8 activa. En las condiciones evaluadas (4 y 8 horas de estímulo con ATP) no fue posible detectar IL1 β en el sobrenadante de cultivo. Por lo tanto, al igual que lo que ocurre en células dendríticas, TMEM176B inhibe la activación del inflammasoma en las células Th17. A diferencia de lo que ocurre en las células dendríticas, en donde la deficiencia de TMEM176B conduce a un aumento de la activación de la vía NLRP3-Caspasa-1, en las células Th17 esto ocurre a través de la vía NLRP3-Caspasa-8.

Dado que ha sido reportado que en algunas líneas celulares tumorales TMEM176B afecta la fosforilación de AKT evaluamos la fosforilación basal de AKT en células Th17 WT y Tmem176b-/-. Encontramos aumentado el ratio pAKT/AKT en las Th17 Tmem176b-/- en comparación con las WT. Dado que las especies reactivas del oxígeno (ROS) mitocondriales pueden influenciar la fosforilación de AKT evaluamos la producción de ROS mitocondrial no encontrando diferencia entre células Th17 WT y Tmem176b-/-. Para evaluar si esta mayor fosforilación de AKT repercute, a través de la vía AKT/mTOR, en la producción de IFN γ inhibimos mTOR con rapamicina y no encontramos diferencias en la producción de IFN γ . Por lo tanto, al menos en nuestras condiciones, la vía mTOR no influye en la producción de IFN γ por las células Th17.

Posteriormente evaluamos el perfil metabólico de las células Th17 WT vs Tmem176b-/-. Resultados de scRNAseq de células Th17 WT y Tmem176b-/- diferenciadas con TGF- β , IL6 y anti-IFN γ mostraron un aumento en la glicólisis, en la fosforilación oxidativa y en ciclo de Krebs en las células Tmem176b-/- comparando con las WT. Estos resultados bioinformáticos fueron confirmados con experimentos de Seahorse, en donde encontramos una mayor fosforilación oxidativa y glicólisis en las células Th17 Tmem176b-/- comparado con las WT. La inhibición de la glicólisis con 2 deoxiglucosa resultó en una inhibición de la producción de IFN γ por células Th17 Tmem176b-/-.

Como se explicitó anteriormente, en este proyecto también buscábamos evaluar la funcionalidad de las células Th17 Tmem176b-/-. Para esto, primeramente evaluamos in vitro la capacidad de las células Th17 WT y Tmem176b-/- de inhibir la proliferación de células T CD8. Encontramos que si bien las células Th17 WT inhiben la proliferación de las células T CD8 esto no ocurre con las Tmem176b-/-, siendo esto en parte debido a la producción de IFN γ por estas células, ya que la neutralización del IFN γ afecta la proliferación de las células T CD8 cuando se co-cultivan con Th17 Tmem176b-/-, pero no cuando se co-cultivan con Th17 WT. Para evaluar la funcionalidad de estas células in vivo realizamos una transferencia adoptiva de células Th17 WT vs Tmem176b-/-. En un primer experimento se pudo ver que las células Th17 Tmem176b-/- logran

prolongar la supervivencia de los ratones con cáncer tratados con anti-PD1 mientras que la transferencia de las células Th17 WT no. Cuando repetimos estos experimentos no pudimos lograr la reproducibilidad. Indagando en las causas de esta falta de reproducibilidad encontramos que los ratones con los que trabajamos (OT2 y Tmem176b^{-/-} OT2) habían perdido la capacidad de reconocer fuertemente al péptido de OVA (323-339). Se compraron ratones OT2 nuevamente y se está eliminando el gen Tmem176b mediante la técnica CRISPR/Cas9. Una vez que se obtengan nuevamente estos ratones se repetirá este experimento para confirmar el rol anti-tumoral de las células Th17 Tmem176b^{-/-}.

El último objetivo de este proyecto fue evaluar el rol de TMEM176B en células Th17 humanas. Para esto se purificaron células T CD4 naive de células mononucleares de sangre periférica. Se diferenciaron a células Th17 en presencia o ausencia de BayK8644. Al igual que lo que sucede en ratón, la diferenciación de células Th17 humanas en presencia de BayK8644 resultó en una mayor frecuencia de células Th17 productoras de IFN γ . Interesantemente, la inhibición de TMEM176B resulta en una disminución significativa de la frecuencia de células Th17 diferenciadas in vitro. Como se mencionó anteriormente, Tmem176b es uno de los 11 genes regulados directamente por ROR γ t. Nuestros resultados sugieren que podría existir también una regulación inversa, Tmem176b controlando la expresión de ROR γ t. Esto ocurriría solo en las células humanas, ya que en ratón no encontramos una diferencia de expresión en ROR γ t por la inhibición de Tmem176b.

Por último, evaluamos a partir de datos públicos de scRNAseq de 62 pacientes con cáncer colorrectal no tratados la correlación entre la expresión de Tmem176b en Th17 y el pronóstico. Dentro del conjunto de pacientes, 28 pacientes presentaban células tumorales capaces de realizar "Mismatch repair" (MMRp), mientras que las células tumorales de 34 pacientes no eran deficientes en el proceso de "Mismatch repair" (MMRd). Es conocido que los pacientes que presentan tumores MMRd tiene una mayor carga mutacional y alrededor del 50% de estos pacientes responden a las terapias con bloqueadores de puntos de control. Sin embargo, los pacientes con tumores MMRp tiene una baja carga mutacional, no responden a los bloqueadores de puntos de control y por lo tanto tienen una peor supervivencia. Luego de identificar los clusters de células Th17 en las muestras se analizó la expresión de Tmem176b. Encontramos que en los pacientes MMRp un mayor número de células Th17 expresan Tmem176b comparado con los pacientes MMRd. A su vez las células Th17 de los pacientes MMRp tienen un nivel de expresión de Tmem176b mayor que los pacientes MMRd. En el mismo sentido, los pacientes que tienen infiltración de células tumorales en ganglios, pacientes con peor pronóstico, presentan una mayor expresión de Tmem176b en las células Th17 intratumorales comparado con pacientes sin infiltración en ganglios. Por lo tanto, evidenciamos una correlación entre la expresión de Tmem176b en células Th17 y el peor pronóstico de pacientes con cáncer colorrectal.

Conclusiones y recomendaciones

El desarrollo de estrategias farmacológicas para modular la polarización de las células Th17 hacia fenotipos efectores es altamente relevante en la inmunoterapia del cáncer.

En el presente proyecto evaluamos el rol intrínseco de Tmem176b en células Th17 con foco en la respuesta inmune anti-tumoral. Encontramos que Tmem176b se encuentra sobre expresado en células Th17 reguladoras comparado con las efectoras. La deficiencia o la inhibición de Tmem176b resulta en células Th17 con un fenotipo más efector, con aumento en producción de IFN γ , aumento en la fosforilación de AKT y de la glicólisis, y disminución de las capacidades regulatorias.

En humanos, encontramos que la inhibición de TMEM176B durante la diferenciación in vitro de células Th17 resulta en un aumento de IFN γ . A su vez, encontramos que la expresión de Tmem176b en células Th17 en tumores de pacientes con cáncer colorrectal se asocia a un peor pronóstico.

En conclusión, encontramos que TMEM176B es un nuevo regulador intrínseco de la polaridad de las células Th17 a través del control metabólico. Esto puede tener importantes implicancias traslacionales. El inhibidor

farmacológico de TMEM176B, BayK8644, identificado por nuestro grupo y del cual hemos previamente patentado su utilización en cáncer, logró modificar la polarización de las células Th17 hacia Th17 efectoras, pudiendo en un futuro ser utilizado en el tratamiento de algunos tipos de cáncer en combinación con otras terapias.

Productos derivados del proyecto

Tipo de producto	Título	Autores	Identificadores	URI en repositorio de Silo	Estado
Póster	Abstract 1412: Immune and metabolic control of Th17 cells by TMEM176B: Potential implication in cancer immunotherapy. AACR Annual Meeting 2024	Sofía Russo; Mateo Malcuori; Mercedes Segovia; Marcelo Hill		https://hdl.handle.net/doi.org/10.1158/1538-7445.AM2024-1412	Finalizado

Referencias bibliográficas

- Korn T, Bettelli E, Oukka M, Kuchroo VK. IL-17 and Th17 Cells. *Annual Review of Immunology*. 2009 Mar 20;27(1):485–517.
- Knochelmann HM, Dwyer CJ, Bailey SR, Amaya SM, Elston DM, Mazza-McCrann JM, et al. When worlds collide: Th17 and Treg cells in cancer and autoimmunity. *Cellular & Molecular Immunology*. 2018;15(5):458–69.
- Muranski P, Restifo NP, Dc W. Essentials of Th17 cell commitment and plasticity. *Blood*. 2013;121(13):2402–14.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: An Effector CD4 T Cell Lineage with Regulatory T Cell Ties. Vol. 24, *Immunity*. 2006. p. 677–88.
- Mangan PR, Harrington LE, O’Quinn DB, Helms WS, Bullard DC, Elson CO, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the TH17 lineage. *Nature*. 2006;441(7090):231–4.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, et al. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature*. 2006;441(7090):235–8.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFb in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity*. 2006 Feb;24(2):179–89.
- Ghoreschi K, Laurence A, Yang XP, Tato CM, McGeachy MJ, Konkel JE, et al. Generation of pathogenic TH17 cells in the absence of TGF-b signalling. *Nature*. 2010;467(7318):967–71.
- Cerboni S, Gehrman U, Preite S, Mitra S. Cytokine-regulated Th17 plasticity in human health and diseases. *Immunology*. 2021 May 1;163(1):3–18.
- Chapman NM, Chi H. Metabolic adaptation of lymphocytes in immunity and disease. Vol. 55, *Immunity*. Cell Press; 2022. p. 14–30.
- Qiu R, Yu X, Wang L, Han Z, Yao C, Cui Y, et al. Inhibition of Glycolysis in Pathogenic T H 17 Cells through Targeting a miR -21–Peli1 –c-Rel Pathway Prevents Autoimmunity. *The Journal of Immunology*. 2020 Jun

15;204(12):3160–70.

12. Papadopoulou G, Xanthou G. Metabolic rewiring: a new master of Th17 cell plasticity and heterogeneity. *FEBS Journal*. Blackwell Publishing Ltd; 2021.

13. Segovia M, Louvet C, Charnet P, Savina a., Tilly G, Gautreau L, et al. Autologous dendritic cells prolong allograft survival through Tmem176b-dependent antigen cross-presentation. *American Journal of Transplantation*. 2014;14(5):1021–31.

14. Louvet C, Chiffolleau E, Heslan M, Tesson L, Heslan JM, Brion R, et al. Identification of a new member of the CD20/FcepsilonRIbeta family overexpressed in tolerated allografts. *Am J Transplant*. 2005 Sep;5(9):2143–53.

15. Drujont L, Lemoine A, Moreau A, Bienvenu G, Lancien M, Cens T, et al. RORgammat + cells selectively express redundant cation channels linked to the Golgi apparatus. *Scientific Reports*. 2016 Mar 24;6.

16. Condamine T, le Texier L, Howie D, Lavault A, Hill M, Halary F, et al. Tmem176B and Tmem176A are associated with the immature state of dendritic cells. *J Leukoc Biol*. 2010;88(3):507–15.

17. Binnewies M, Mujal AM, Pollack JL, Combes AJ, Hardison EA, Barry KC, et al. Unleashing Type-2 Dendritic Cells to Drive Protective Antitumor CD4+ T Cell Immunity. *Cell*. 2019 Apr 18;177(3):556–571.e16.

18. Villani AC, Satija R, Reynolds G, Sarkizova S, Shekhar K, Fletcher J, et al. Single-cell RNA-seq reveals new types of human blood dendritic cells, monocytes, and progenitors. *Science*. 2017;356(6335):eaah4573.

19. Segovia M, Russo S, Jeldres M, Mahmoud YD, Perez V, Duhalde M, et al. Targeting TMEM176B Enhances Antitumor Immunity and Augments the Efficacy of Immune Checkpoint Blockers by Unleashing Inflammasome Activation. *Cancer Cell*. 2019;35(5):767–781.e6.

20. Laoui D, Keirsse J, Morias Y, van Overmeire E, Geeraerts X, Elkrim Y, et al. The tumour microenvironment harbours ontogenically distinct dendritic cell populations with opposing effects on tumour immunity. *Nat Commun*. 2016 Dec;7:13720.

21. Mattioli I, Mantovani A, Locati M. The tetraspan MS4A family in homeostasis, immunity, and disease. Vol. 42, *Trends in Immunology*. Elsevier Ltd; 2021. p. 764–81.

22. Ciofani M, Madar A, Galan C, Sellars M, MacE K, Pauli F, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*. 2012 Oct 12;151(2):289–303.

23. Pelka K, Hofree M, Chen J, Sarkizova S, Pirl JD, Jorgji V, et al. Spatially organized multicellular immune hubs in human colorectal cancer. *Cell*. 2021 Sep 2; 184: 4734–4752

24. Hao Y, Stuart T, Kowalski M, Choudhary S, Hoffman P, Hartman A, et al. Dictionary learning for integrative, multimodal, and massively scalable single-cell analysis. *Nature Biotechnology*. 2023 May 25;42(2):293–304

Licenciamiento

Reconocimiento-NoComercial-SinObrasDerivadas 4.0 Internacional. (CC BY-NC-ND)