

Perfilamiento transcriptómico de microglías fagocíticas y no fagocíticas en ratones *Ifngr1* KO

Introducción:

Las enfermedades neurodegenerativas y la neurodegeneración en general siguen siendo en muchos aspectos un misterio. Esto debido al poco conocimiento en general que se tiene de los mecanismos por los que funciona el cerebro. Todo esto se ve reflejado en los pocos tratamientos que existen contra este tipo de enfermedades y la pobre efectividad que estos muestran en pacientes. Pero con el avance del conocimiento, de mano con la explosión de investigaciones transcriptómicas, cada vez se conoce más sobre cómo funciona este órgano tan importante y que tipo de cambios suceden en el a nivel transcripcional cuando empieza a fallar.

Una de las cosas que se ha dilucidado con investigación es la relevancia de las microglías en el correcto funcionamiento del cerebro. En el contexto de la neurodegeneración, estas se han convertido en un tema de investigación de gran importancia. Las enfermedades neurodegenerativas, como el Alzheimer, el Parkinson y la esclerosis lateral amiotrófica, se caracterizan por la pérdida progresiva de neuronas y la acumulación de agregados proteicos anormales en el cerebro.

Se ha observado que la disfunción de las microglías puede desencadenar una respuesta inflamatoria excesiva y desregulada en el cerebro, lo que puede contribuir al proceso neurodegenerativo. Estas, en su función de células inmunitarias del cerebro, también desempeñan un papel crucial en la fagocitosis, un proceso mediante el cual las células engullen y eliminan los desechos celulares y las sustancias dañinas. Esta capacidad fagocitótica de la microglía es fundamental para mantener la limpieza y la salud del cerebro.

El gen *Ifngr1*, también conocido como receptor 1 del interferón gamma, desempeña un papel fundamental en el sistema inmunológico y la respuesta a las infecciones. *Ifngr1* codifica una proteína que actúa como receptor de señalización para el interferón gamma, una citoquina importante en la respuesta inmunitaria. En el contexto de microglías nos es relevante ya que, como ya se mencionó, la respuesta inflamatoria excesiva es dañina para el cerebro, y la expresión de *Ifngr1* en particular ha sido ligada a neurodegeneración, por lo que vale la pena estudiar como la ausencia de esta afecta las funciones de la microglía [1].

Hipótesis:

La ausencia de *Ifngr1* en microglías de ratones causa una incapacidad en estas de reaccionar a muerte celular e inhibe la activación de vías inflamatorias. Esta incapacidad de reaccionar se vería reflejado en el transcriptoma de las microglías KO expuestas al comparar con las WT expuestas, que si serian capaces de reaccionar y causar inflamación.

Metodología:

Diseño general:

En 2 grupos de ratones, WT y Ifngr1 KO, se inyectaron neuronas apoptóticas en el córtex para causar una respuesta inmune de las microglías. después de 16 horas se tomaron muestras de neuronas fagocíticas y no fagocíticas para llevar a cabo RNA-seq. Con lo que nos quedamos con 4 grupos de microglías; WT no fagocíticas, KO no fagocíticas, WT fagocíticas y KO fagocíticas. Lo que nos deja con 12 muestras en total (3 réplicas de cada grupo)

Procesamiento de datos:

Chequeo de calidad se llevo a cabo con fastqc, se usó Trim Galore despues y con Hisat2 se llevo a cabo el mapeo de lecturas. Samtools y bamCoverage fue usado para conversión de formatos. Por ultimo, en R, se uso Rsubread para pasar a counts. (Mas detalles en <https://github.com/lotmta/proyTranscriptomica>).

Análisis de expresión diferencial:

El análisis de expresión diferencial se hizo todo en R, se usó la librería de edgeR para el análisis y las librerías de ggplot2 y pheatmap para las gráficas. El análisis de ontología fue hecho, igual en R, haciendo uso de las librerias clusterProfiler, org.Mm.eg.db y AnnotationDbi (Mas detalles en <https://github.com/lotmta/proyTranscriptomica>).

Resultados:

Agrupamiento de datos:

Utilizando PCA y MDS se observo que los grupos si se agrupan entre categorías (Figura 1), más que por el fenotipo (WT o KO) parece que se agrupan mas por si son microglías fagocíticas o no, pero igual si se nota cierta separación por fenotipo.

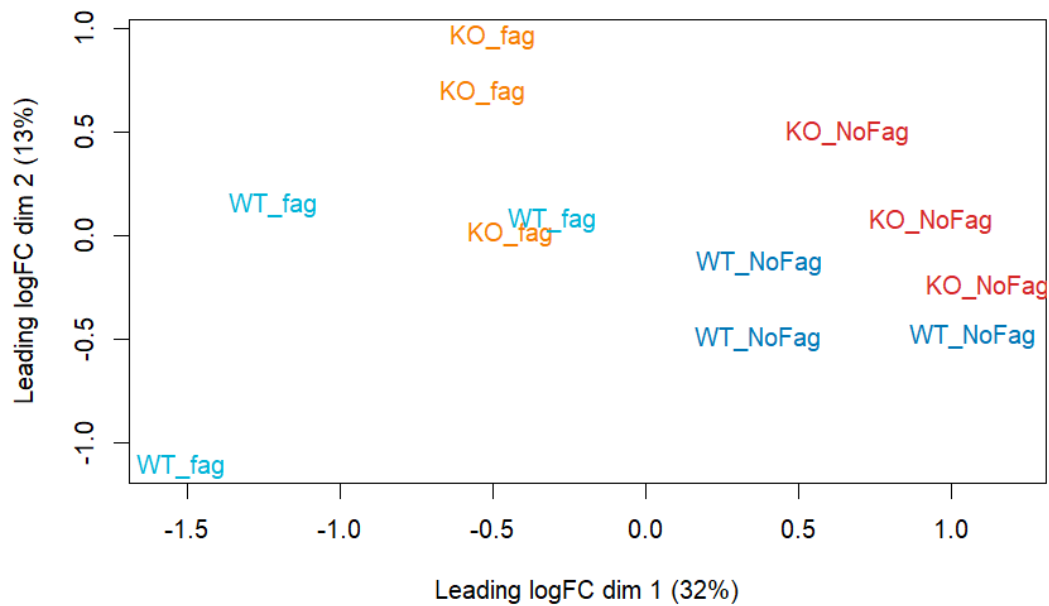


Figura 1. MDS de los mostrando agrupamiento de los 4 grupos. PCA disponible en github.

Expresión Diferencial:

Como el efecto en el que se esta interesado son los cambios por el knockout de *Ifngr1*, se hizo comparación entre WT y KO, fagocíticas y no. Como se ve en las figuras 2 y 3, tanto las células fagocíticas como las no fagocíticas mostraron cambios de expresión en una cantidad similar de genes por el KO.

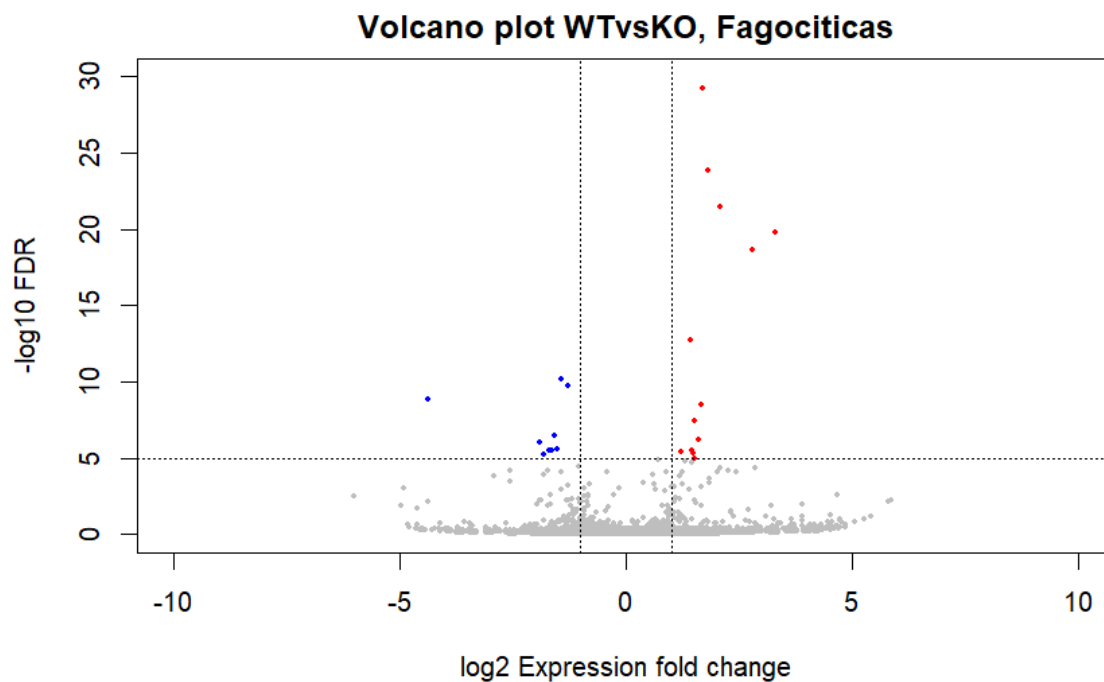


Figura 2. Volcano plot comparando expresión diferencial en microglías fagocíticas según el genotipo.

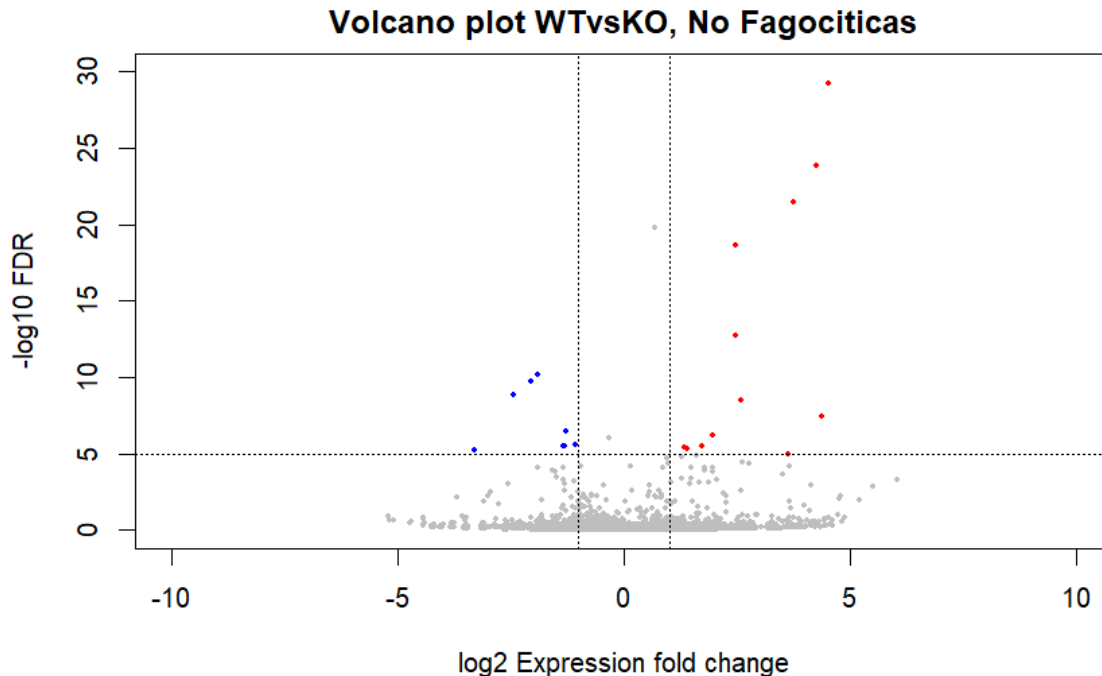


Figura 3. Volcano plot comparando expresión diferencial en microglías no fagocíticas según el genotipo.

Para observar mejor las diferencias entre nuestros grupos se generó un heatmap con los 50 genes que mostraban un LogFC más significativo (Figura 4). Con este se ilustra que, como se hipotetizaba, la mayor diferencia fue entre nuestras microglías fagocíticas KO y WT, las WT fagocíticas parecen tener un perfil transcripcional característico, probablemente debido a su activación. Mientras que las KO fagocíticas son más parecidas a las no activadas, aunque sí teniendo algunos cambios particulares. Igual se puede ver que, al menos con estos genes, las microglías no activadas, independientemente del genotipo, parecen tener una expresión parecida, lo que contribuye a la hipótesis de que el efecto del genotipo no sería visto hasta que se activen las vías inflamatorias afectadas por el KO de *Ifngr1*.

Análisis de ontología:

Para ver más funcionalmente cómo el fenotipo afecta la respuesta inflamatoria y fagocitosis, se llevó a cabo un análisis de ontología con los genes con el menor p-value (Figuras 5 y 6). Como se esperaba, en procesos biológicos y funciones moleculares se vieron enriquecidas vías relacionadas a inflamación y respuesta inmune, no se tuvieron resultados significantes con componentes celulares (Gráfica encontrada en github).

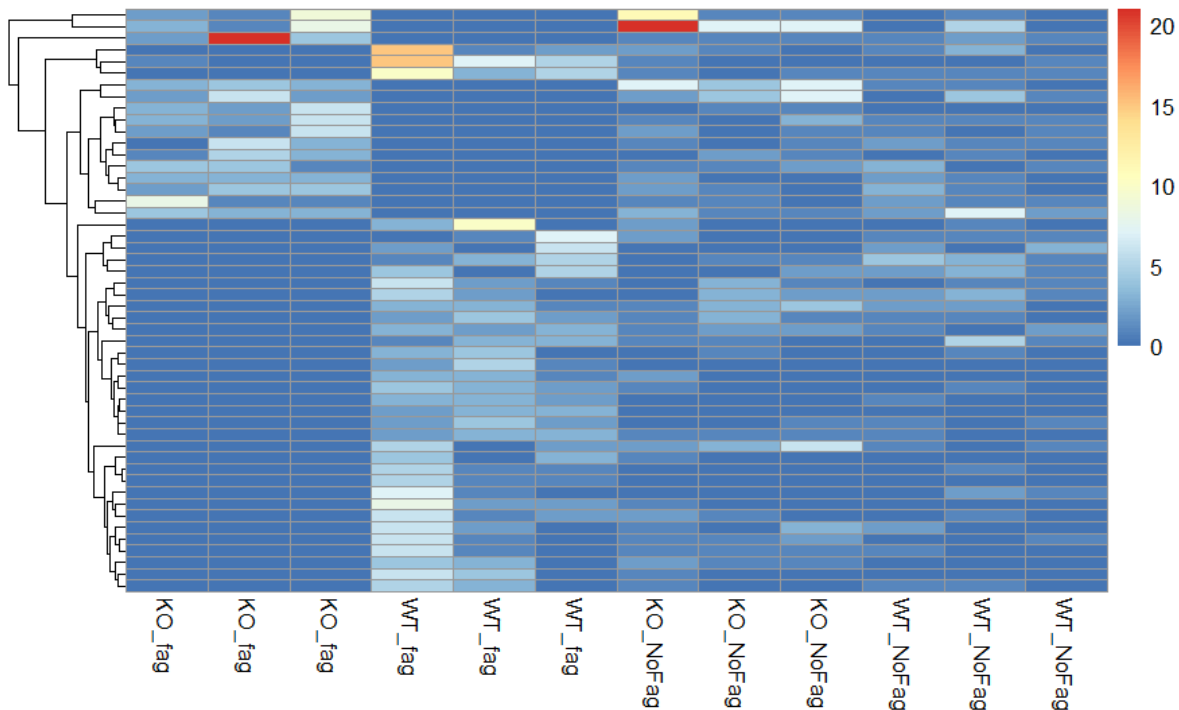


Figura 4. HeatMap de los 50 genes con LogFC más significativa entre grupos WT_fag y KO_fag

Conclusión:

A través de este análisis de datos se pudo observar y demostrar hasta cierto punto la importancia de *Ifngr1* en la función fagocítica de las microglías. Se observó que las microglías sin *Ifngr1* son, por lo menos del punto de vista transcriptómico, incapaces de responder de la misma manera a estímulos provocados por neuronas apoptóticas. Mientras que no parece afectar su funcionalidad normal, teniendo un perfil transcriptómico similar al WT cuando hay ausencia de estímulo. Pero poco más se puede decir con los datos obtenidos, faltaría ver las diferencias in vivo del tejido neural WT contra el KO, o su reacción bajo estímulos diferentes.

También sería necesario, para poder hacer conclusiones más informativas, estudiar más a detalle los genes que mostraron mayor diferencia de expresión, ya que muchos de estos no están realmente caracterizados y parecen ser, por lo menos con los datos obtenidos, de importancia para la activación de microglías y su función fagocítica, cosas que tienen un rol importante en la neurodegeneración.

Es importante remarcar que los datos en general no tenían mucha resolución, pocos reads en general y un porcentaje de alineación contra el genoma algo bajo. Por lo que sería útil replicar el experimento a mayor resolución.

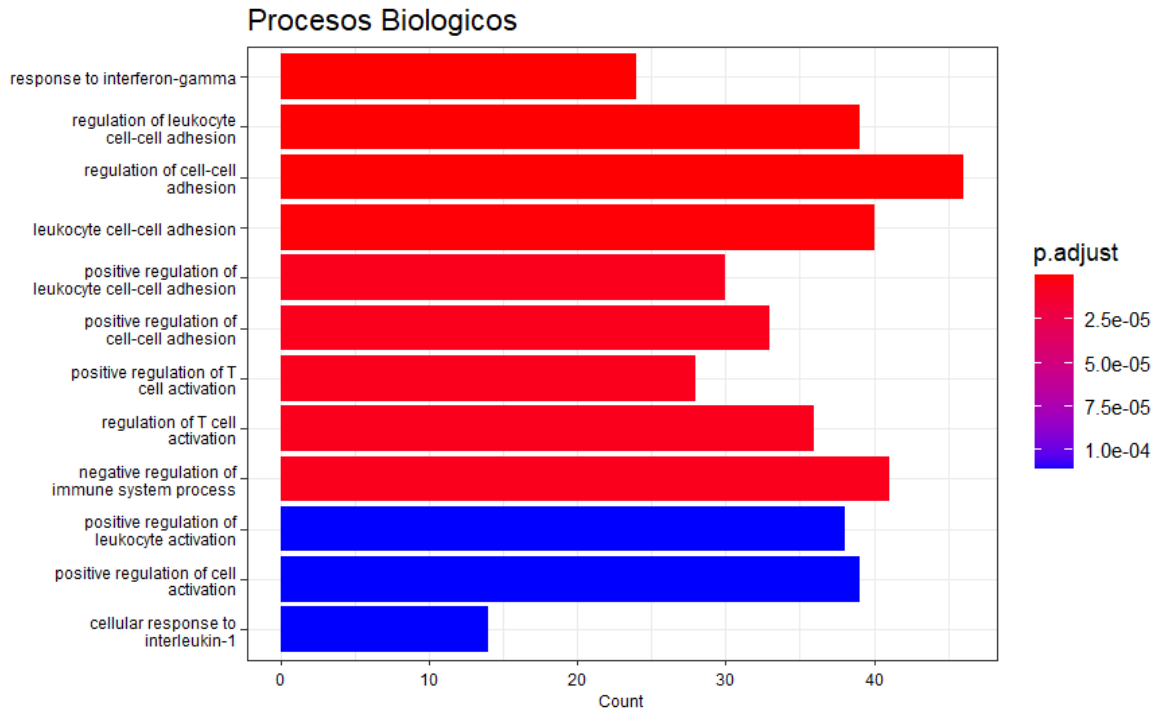


Figura 5. Procesos biológicos enriquecidos por los genes diferencialmente expresados.

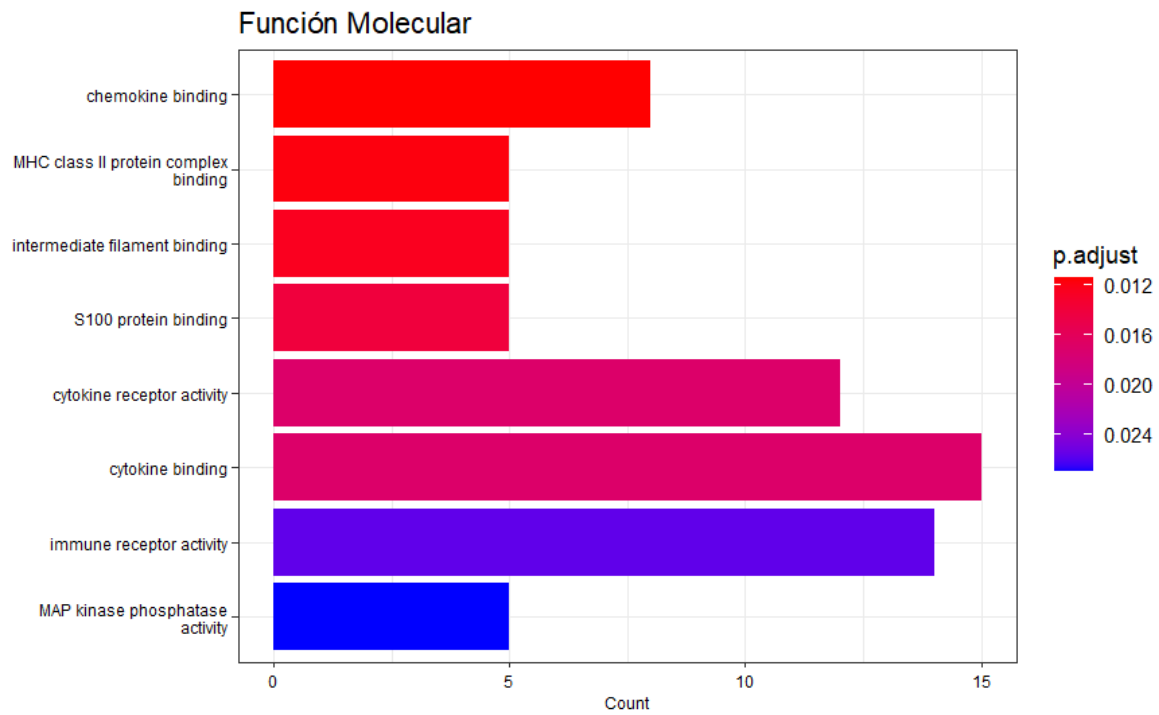


Figura 6. Funciones moleculares enriquecidas por los genes diferencialmente expresados.

Referencias:

1. Strickland, Michael R., Emily J. Koller, Doris Z. Deng, Carolina Ceballos-Diaz, Todd E. Golde, and Paramita Chakrabarty. "IFNGR1 and STAT1 Mediated Canonical IFN- γ Signaling Drives Nigrostriatal Degeneration." *Neurobiology of Disease* 110 (2018): 133–41.
<https://doi.org/10.1016/j.nbd.2017.11.007>.