

Immunometabolic effects of vitamin D unravelled by an integrative systems biology analysis

Citation for published version (APA):

Muñoz García, A. (2020). *Immunometabolic effects of vitamin D unravelled by an integrative systems biology analysis: A collaborative bioinformatics and laboratory approach*. Maastricht University. <https://doi.org/10.26481/dis.20200825ag>

Document status and date:

Published: 01/01/2020

DOI:

[10.26481/dis.20200825ag](https://doi.org/10.26481/dis.20200825ag)

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

Summary

This thesis is the result of a joint collaboration between research institutes with expertise in two distinct aspects of science: cell biology and bioinformatics. By using state of the art techniques from both of these fields the thesis describes the discovery of an entirely new role for vitamin D in the immune system, as a potent regulator of immunometabolism. To demonstrate this, the project initially focused on bioinformatic analyses in which we developed applied computational techniques to interrogate publically available transcriptomic datasets generated in studies of the immunomodulatory effects of the active form of vitamin D, 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃). Using this bioinformatic approach we were able to demonstrate that the predominant effect of 1,25(OH)₂D₃ on myeloid derived innate immune cells such as monocytes and dendritic cells (DC) was to regulate cell metabolism via enhanced glycolysis, electron transport, oxidative phosphorylation and TCA cycle activity. In the second half of this thesis, we have explored the immunometabolic function of 1,25(OH)₂D₃ further through *in vitro* experiments that investigated the specific function of immunometabolism in mediating the tolerogenic effects of 1,25(OH)₂D₃ on DC. The overall conclusion from these cellular experiments was that the ability of 1,25(OH)₂D₃ to promote anti-inflammatory tolerogenic innate immune responses by DC is crucially dependent on the regulation of cell metabolism rather than specific immune actions. This new perspective on the immunomodulatory actions of vitamin D may help to identify new strategies for the therapeutic use of vitamin D in the treatment of inflammatory disease.

Contextualizing public gene expression data into biological pathways

As mentioned above, the first part of this PhD project focused on the generation of a bioinformatic workflow or 'pipeline' that was used to retrieve and analyse large gene expression datasets for different immune cell models that were treated with the active form of vitamin D, 1,25(OH)₂D₃. Gene expression datasets were initially retrieved from public repositories in as raw experimental data. As described in **Chapter 2**, we established a bioinformatic pipeline that analysed the quality of the raw expression data and processed these data to retrieve gene

expression parameters that enabled the contextualization of the data at functional pathway level using the PathVisio and WikiPathways open-source bioinformatics platforms. Furthermore, the integration of another open-source software platform, Cytoscape, into the pipeline enabled the use of different apps that allowed integration of additional biological information into the analysis to generate biological networks that plot molecule-molecule interactions. Cytoscape also enabled visualization of experimental data resulting in a user-friendly way to understand biological activities that were occurring in response to treatment with vitamin D.

Once the PathVisio/WikiPathways/Cytoscape pipeline was established, the next aim of the project was to test the pipeline using different lymphoid cell models that had been used to investigate the actions of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (**Chapter 3**). The bioinformatic pipeline was applied to a vitamin D study that had generated RNA-seq transcriptomic data in a wet-lab study, but where the overall impact of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was still unclear. The aim here was to incorporate the PathVisio/WikiPathways/Cytoscape pipeline into an existing study to provide a new perspective on the available transcriptomic data. J A Tamblyn et al. [236] explored the immunomodulatory role of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in two different natural killer (NK) cell populations: uterine NK (uNK) from the decidual tissue of the placenta and peripheral blood NK (pNK). Bioinformatic analysis of activated uNK and pNK gene expression data showed that uNK were transcriptionally distinct from pNK despite the fact that both cells express similar cell surface markers [236]. This new information supported the central hypothesis that uNK have completely different actions in the decidua compared to pNK immune function in the general circulation. These studies also showed that the vitamin D receptor (VDR) system for responding to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was differentially expressed in uNK relative to pNK, but multiple comparison analysis indicated that this did not result in significant differential effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ on gene expression in these cells. The conclusion from this part of my PhD project was that the PathVisio/WikiPathways/Cytoscape pipeline developed at the start of the PhD project could be used successfully to clarify existing transcriptomic datasets and identify specific mechanistic targets for future studies.

After showing that the PathVisio/WikiPathways/Cytoscape pipeline could be incorporated into recently generated transcriptomic datasets from individual studies, the next stage of the project was to apply this bioinformatic strategy to analyse multiple publically available datasets. The aim of this approach was to determine if pathway analysis could provide a much broader view of the actions of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in a biological system. In this case, the project focused on the actions of vitamin D as an established regulator of innate immunity. Multiple transcriptomic datasets from $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -treated myeloid cell types - monocytes,

DC, and monocytic cell lines - as well as non-myeloid lymphoid cells - were analysed using PathVisio/WikiPathways/Cytoscape. This approach showed clearly that innate immune responses to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ were associated with dramatic metabolic reprogramming. Notably enhanced glycolysis, electron transport, oxidative phosphorylation and TCA cycle activity (**Chapter 4**). These effects were quite distinct from other, better recognised, responses to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, such as antiproliferative pathways, that were well represented in the monocytic cell lines but not in primary cultures of monocytes or DC. Identification of novel metabolic reprogramming responses to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in primary cultures of myeloid cells provided the platform for the final part of the PhD which was to use the bioinformatic data analysis to design new wet-lab experiments.

Exploring the role of vitamin D in immunometabolism in dendritic cells

It is well established that vitamin D can regulate DC development *in vitro* to promote a more anti-inflammatory, tolerogenic DC phenotype. However, the mechanisms by which $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ achieves these effects is much less clear. The aim of the final part of the PhD project was to address this by applying information obtained in **Chapter 3** and **Chapter 4** to wet-lab studies of peripheral blood mononuclear cell-derived DC. The resulting work described in **Chapter 5** was carried out to investigate the hypothesis that **the tolerogenic effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ are due to metabolic reprogramming of DC**. The novel approach used to test this hypothesis was to focus specifically on the direct effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ by analysing immature tolerogenic DC (itoIDC) that had been exposed to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in the absence of any other immune modulators. In this way, we aimed to assess direct responses to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ rather than the ability of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ to oppose other DC modulators such as actions of the immunogen lipopolysaccharide (LPS). Initial experiments were carried out to confirm that genes involved in electron transport chain, and tricarboxylic acid cycle were up-regulated in itoIDC relative to control iDC. Subsequent functional studies showed increased oxygen consumption in itoIDC. This effect was observed for treatment with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ alone but not for DC treated with LPS to generate mature DC (mDC), or for DC with only short-term exposure to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (iDC+ $1,25\text{D}$).

Data from **Chapter 3** and **Chapter 4** also showed that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promoted glucose metabolism pathways in DC. Further studies were therefore carried out using $^{13}\text{C}_6$ -labeled glucose to trace the metabolism of glucose in itoIDC. These tracer experiments carried out using mass spectrometry confirmed that at a functional level, glycolysis and the TCA cycle were positively regulated by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in itoIDC. Tracer studies were also carried out

using $^{13}\text{C}_5$ -labeled glutamine to determine if alternative TCA cycle substrate sources could also be enhanced by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in itolDC. However, these experiments revealed only minor changes in TCA cycle metabolism by $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, confirming that glucose metabolism is the major target for $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -regulation in DC. Finally, although ^{13}C tracer studies showed potent DC metabolic reprogramming in response to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, these studies were focused on polar carbohydrate metabolites. Analysis of non-polar lipophilic metabolites of $^{13}\text{C}_6$ -glucose metabolism revealed significant incorporation of label ^{13}C in palmitate, suggesting that $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ promotes metabolic remodelling and fatty acid synthesis in itolDC.

Collectively wet-lab data confirmed the bioinformatic analysis of myeloid cells and specifically DC, that metabolic reprogramming is the key innate immune response to $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$. Furthermore, tracer analysis of glucose metabolism indicated that glycolysis and the TCA cycle were important target pathways for $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, and analysis of non-polar metabolites of glucose indicated that a key consequence of DC treatment with $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ was increased synthesis of fatty acids. We, therefore, proposed an additional hypothesis for wet-lab studies that synthesis of fatty acids was essential for the tolerogenic effects of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in DC. To test this hypothesis we blocked fatty acid synthase in itolDC and studied the effect of this on DC phenotype and function. The resulting data indicated that inhibition of fatty acid synthesis altered itolDC morphology and suppressed expression of CD14 and IL-10 by these cells. These data indicate that the ability of $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ to induce tolerogenic DC is dependent on metabolic remodelling leading to the synthesis of fatty acids.

Conclusion

Data presented in this thesis show how improved analysis of large datasets and visualisation of these outcomes can help to identify entirely new target mechanisms for vitamin D in a cell model - DC - that had been previously well studied. Thus, the application of pathway analysis and network software tools to experimental transcriptomic datasets provided a completely new perspective on the immune actions of vitamin D. In addition, by applying the same bioinformatic pipeline to recently generated datasets from other experimental models, we were able to demonstrate the broader impact of pathway analysis in helping to clarify conclusions from diverse studies of vitamin D function. Pathway analysis also allowed us to streamline subsequent wet-lab experiments and more rapidly investigate novel hypotheses that arose from the original bioinformatic analysis. In this PhD project, wet-lab studies were carried out only for the last two years of the project. However, because we were able to identify more clearly target pathways, we were able to better design functional experiments.

This is particularly important in the field of metabolism research where technologies such as tracer metabolite analysis are expensive and time-consuming. With ongoing challenges in research funding, it may be important in the future to incorporate bioinformatic analysis of datasets as a possible prelude to subsequent lab work. The overall conclusion from this PhD project is that metabolic reprogramming is a crucial part of the interaction between vitamin D and the immune system, and further investigation of this may improve the use of vitamin D as a possible therapy for autoimmune inflammatory diseases.

Resumen

Esta tesis es el resultado de una colaboración conjunta entre dos grupos de investigación especializados en dos áreas científicas: biología celular y bioinformática. Gracias al uso de técnicas modernas desarrolladas en ambos campos científicos esta tesis describe el descubrimiento de un nuevo papel de la vitamina D en el sistema inmune como un potente regulador del inmuno-metabolismo. Para demostrarlo, el inicio de este proyecto se centró en realizar análisis bioinformáticos a partir de los cuales se pudieron desarrollar técnicas computacionales que permiten analizar set de datos transcriptómicos originados por experimentos centrados en investigar los efectos inmuno-moduladores de la forma activa de la vitamina D, 1-,25-dihidroxitamina D3 ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$). El uso del conjunto de estas técnicas bioinformáticas hizo posible demostrar que el efecto predominante de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en células inmunes innatas derivadas del linaje mieloide, tales como monocitos y células dendríticas, es regular el metabolismo celular a través de la actividad de glicólisis, cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs. En la segunda mitad de la tesis, exploramos en mayor detalle la función inmuno-metabólica de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ por medio de la realización de experimentos *in vitro*, a través de los cuales investigamos la función inmuno-metabólica específica de la vitamina D por la cual modula los efectos tolerogénicos en células dendríticas. Gracias a estos experimentos pudimos llegar a la conclusión de que la habilidad de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de promover, a través de células dendríticas, respuestas tolerogénicas y anti-inflamatorias en el sistema inmune innato, es dependiente de una regulación metabólica celular frente a una regulación puramente inmunológica. Esta nueva perspectiva sobre las acciones inmuno-moduladoras de la vitamina D puede ayudar a desarrollar nuevas estrategias terapéuticas basadas en el uso de la vitamina D en el tratamiento de enfermedades inflamatorias.

Contextualizando datos públicos de expresión génica en rutas biológicas

Como se ha mencionado anteriormente, la primera parte de este proyecto se centró en la creación de una herramienta bioinformática capaz de analizar sets de datos de experimen-

tos publicados en base de datos abiertas a la comunidad científica. Como describimos en el **Capítulo 2**, hemos establecido esta herramienta bioinformática capaz de analizar la calidad de estos sets de datos y procesarlos para obtener los parámetros que indican los cambios en la expresión génica los cuales serán contextualizados a nivel de rutas biológicas a través de PathVisio y WikiPathways. Además, la inclusión de otros programas, como Cytoscape, ha permitido incorporar plugins que son capaces de integrar información biológica en nuestro análisis para crear networks biológicas capaces de ilustrar las interacciones moleculares de sistemas biológicos. Cytoscape permite visualizar datos de experimentos moleculares siendo una herramienta de uso sencillo que facilita el entendimiento de las dinámicas biológicas en determinados sistemas en respuesta a la vitamina D.

Una vez establecido el eje PathVisio/WikiPathways/Cytoscape, nuestro objetivo fue testar esta herramienta bioinformática con set de datos de expresión génica de modelos celulares del sistema linfóide que han sido tratados con la vitamina D (**Capítulo 3**). Esta herramienta fue aplicada a un estudio de vitamina D que generó un set de datos a través de un estudio de ARN-seq, sin embargo, este estudio no pudo analizar el impacto global de la vitamina D en el sistema biológico en cuestión. Nuestro objetivo fue aplicar el protocolo PathVisio/WikiPathways/ Cytoscape a este estudio para proporcionar una nueva perspectiva a este análisis de expresión génica. J A Tamblyn et al [236] exploró el efecto inmuno-modulador de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en dos diferentes tipos de células NK (del inglés, natural killer): NK uterinas (del inglés, uNK) procedentes del tejido decidual de la placenta y NK de sangre periférica (del inglés, pNK). El análisis bioinformático, el cual comparó la expresión génica de células uNK con pNK, mostró que, transcripcionalmente hablando, estos tipos celulares son diferentes a pesar de que ambos tipos celulares expresan los mismos marcadores celulares [236]. Esta nueva información apoya la teoría central de que uNK tienen una función completamente diferente en la decidua comparada con la función inmunológica de células pNK en circulación. Este estudio también mostró que el sistema regido por el receptor de la vitamina D (del inglés, VDR) que responde a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ fue significativamente más expresado en uNKs en comparación con pNKs, pero comparaciones y análisis posteriores indicaron que $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ no tuvo grandes efectos a nivel de expresión genética entre los dos tipos celulares. La conclusión de esta parte del proyecto fue que la herramienta bioinformática desarrollada inicialmente podía utilizarse para explorar y clarificar set de datos transcriptómicos e identificar mecanismos moleculares específicos para futuros estudios.

Después de demostrar que esta herramienta, con un eje central basado en PathVisio/ WikiPathways/ Cytoscape, puede analizar set de datos de expresión génica, el siguiente paso en nuestro

proyecto fue aplicar esta herramienta usando set de datos procedentes de diferentes modelos mieloides albergados en repositorios públicos. El principal objetivo de esta parte del proyecto fue realizar un análisis de rutas metabólicas en estos set de datos para proporcionar una nueva perspectiva del papel de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en determinados sistemas biológicos. En concreto nuestro interés se centró en estudiar las acciones de la vitamina D como regulador metabólico del sistema inmune. La comparación se realizó usando una serie de set de datos procedentes de experimentos realizados en modelos celulares mieloides, incluyendo monocitos, células dendríticas y líneas monocíticas celulares, que fueron tratados con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ usando PathVisio/ WikiPathways/ Cytoscape. Este estudio mostró una clara asociación entre la respuesta del sistema inmune innato a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ y una reprogramación completa del metabolismo celular. Se observó un claro incremento en la actividad de determinadas rutas metabólicas como glicólisis, cadena de transporte de electrones, fosforilación oxidativa y el ciclo de Krebs. Estos efectos descritos en este estudio son claramente diferentes a los clásicos roles de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ tales como en rutas anti-proliferativas, las cuales fueron reportadas en nuestro estudio en líneas células monocíticas pero no en modelos celulares primarios relacionados con monocitos y células dendríticas. La identificación de estas nuevas implicaciones por parte de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en la reprogramación metabólica celular en diferentes modelos celulares mieloides dió lugar al planteamiento de nuevas hipótesis que fueron la base de la parte final de este proyecto, la cual se basó en el uso de esta plataforma bioinformática para el diseño de nuevos experimentos moleculares.

Explorando el papel de la vitamin D en el inmuno-metabolismo en células dendríticas

Es bien sabido que la vitamina D puede regular el desarrollo *in vitro* de las células dendríticas dando lugar a un fenotipo anti-inflamatorio y tolerogénico. Sin embargo, el mecanismo molecular por el cual $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ logra estos efectos no está totalmente claro. El principal objetivo de la última parte de este proyecto de PhD fue estudiar este último punto usando los resultados obtenidos en **Capítulos 3 y 4** para diseñar experimentos moleculares usando nuestro propio modelo celular: células dendríticas procedentes de sangre periférica. El resultado de este trabajo, descrito en el **Capítulo 5**, se llevó a cabo para investigar la hipótesis de que **los efectos teratogénicos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ se basan en una reprogramación metabólica en células dendríticas**. Este estudio se centró en testar esta hipótesis estudiando los efectos directos de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en células dendríticas tolerogénicas inmaduras (del inglés, *itoIDC*) que fueron tratadas con $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en ausencia de estimuladores inmunogénicos. De esta manera, nos centramos en mostrar las respuestas directas a $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ en lugar de la habilidad de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ de contrarrestar otros moduladores de células dendríticas tales

como las acciones inmunogénicas de lipopolisacárido (LPS). Los primeros experimentos fueron llevados a cabo para confirmar qué genes involucrados en la cadena de transporte de electrones y ciclo de Krebs eran favorablemente regulados en itoIDC comparados con células dendríticas no expuestas a 1,25(OH)₂D3. Posteriores estudios funcionales mostraron que existe un incremento en el consumo de oxígeno por parte de itoIDC. Este efecto fue observado en células dendríticas por el tratamiento de 1,25(OH)₂D3 durante un período largo de tiempo y no en células que fueron expuestas a LPS para generar células dendríticas maduras, ni en células dendríticas expuestas por un periodo corto de tiempo a 1,25(OH)₂D3.

Los resultados de los **Capítulos 3 y 4** también mostraron que 1,25(OH)₂D3 promueve rutas metabólicas centradas en la glucosa. En posteriores estudios moleculares empleamos ¹³C₆-glucosa para rastrear el metabolismo de la molécula en itoIDC. Estos experimentos se realizaron usando espectrometría de masas para confirmar que, a nivel funcional, la actividad en las rutas metabólicas de glicólisis y el ciclo de Krebs son positivamente reguladas por 1,25(OH)₂D3 en itoIDC. En estos estudios de rastreo molecular también se empleó ¹³C₅-glutamina para determinar si sustratos del ciclo de Krebs pudieran estar alterados por 1,25(OH)₂D3 en itoIDC. A pesar de ello, este último experimento solo demostró que no hubieron apenas cambios metabólicos en el ciclo de Krebs por parte de 1,25(OH)₂D3, confirmando que el metabolismo de la glucosa es el principal punto de regulación por parte de 1,25(OH)₂D3 en células dendríticas. Finalmente, a pesar de que los experimentos de rastreo de metabolitos demostraron una potente respuesta metabólica en células dendríticas tras el tratamiento con 1,25(OH)₂D3, estos resultados sólo mostraron datos de homeostasis de metabolitos polares. El análisis de estos mismos experimentos basados en el trazado del consumo ¹³C₆-glucosa pero centrados en análisis de metabolitos lipofílicos no-polares, revelaron una significativa incorporación de ¹³C en palmitato, sugiriendo que 1,25(OH)₂D3 promueve un remodelado metabólico que va dirigido a la síntesis de ácidos grasos en itoIDC.

De manera colectiva, los resultados de los experimentos moleculares confirmaron los análisis bioinformáticos en modelos celulares mieloides, específicamente en células dendríticas, que la respuesta inmune a 1,25(OH)₂D3 se basa en una reprogramación metabólica. Además, los experimentos basados en el trazado de ¹³C₆-glucosa indicaron que la glicólisis y el ciclo de Krebs son importantes rutas metabólicas influenciadas por 1,25(OH)₂D3. Finalmente, estos mismos experimentos indicaron que 1,25(OH)₂D3 es un potente regulador positivo de la síntesis de ácidos grasos en itoIDC. Tras estos resultados, propusimos una nueva hipótesis que plantea que **la síntesis de ácidos grasos es esencial para promover los efectos tolerogénicos de 1,25(OH)₂D3 en células dendríticas**. Para testar esta hipótesis bloqueamos la ruta

metabólica de síntesis de ácidos grasos en itoIDC para estudiar sus efectos en el fenotipo y función en estas células. Los resultados indicaron que esta inhibición altera la morfología de itoIDC y reprime la expresión de CD14 y IL-10 en estas células. Estos resultados sugieren que la capacidad de $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ para inducir el fenotipo tolerogénico en DC es dependiente de una reprogramación metabólica que da lugar a un incremento de síntesis de ácidos grasos.

Conclusión

Los datos presentados en esta tesis demuestran que un análisis optimizado de set de datos de gran escala y la visualización de estos resultados usando herramientas bioinformáticas puede ayudar a identificar nuevos mecanismos moleculares de la vitamina D en un modelo celular - en este caso células dendríticas - que previamente ha sido estudiado. Así pues, el empleo de estas herramientas, capaces de hacer un análisis de rutas metabólicas y generación de redes biológicas en set de datos transcriptómicos, ha permitido dar una nueva perspectiva a la función de la vitamina D en el sistema inmune. Además, con el uso de estas herramientas para analizar set de datos de otros grupos de investigación, hemos podido ayudar a la investigación del papel de la vitamina D en determinados modelos celulares. Gracias al análisis de rutas metabólicas, hemos generado una serie de resultados que, tras su interpretación, nos ha permitido diseñar nuestros propios experimentos moleculares e investigar con mayor precisión nuestras hipótesis de partida. En este proyecto de doctorado, los experimentos moleculares fueron llevado a cabo en los dos últimos años de su duración. Sin embargo, gracias a que pudimos identificar las rutas metabólicas de interés con mayor eficacia, pudimos optimizar el tiempo de diseño experimental. Este hecho es particularmente importante en el campo de investigación del metabolismo donde técnicas, como la de análisis de trazado de metabolitos, son costosas tanto a nivel económico como en tiempo. Con las dificultades que supone encontrar fondos económicos para la investigación, es importante para el futuro la incorporación de análisis bioinformáticos de set de datos que preceden al trabajo de laboratorio. La conclusión general de este proyecto de doctorado es que la reprogramación metabólica es una interacción crucial entre la vitamina D y el sistema inmune, y es necesario investigar este campo en mayor detalle para mejorar el uso de la vitamina D como terapia en enfermedades inflamatorias autoinmunes.