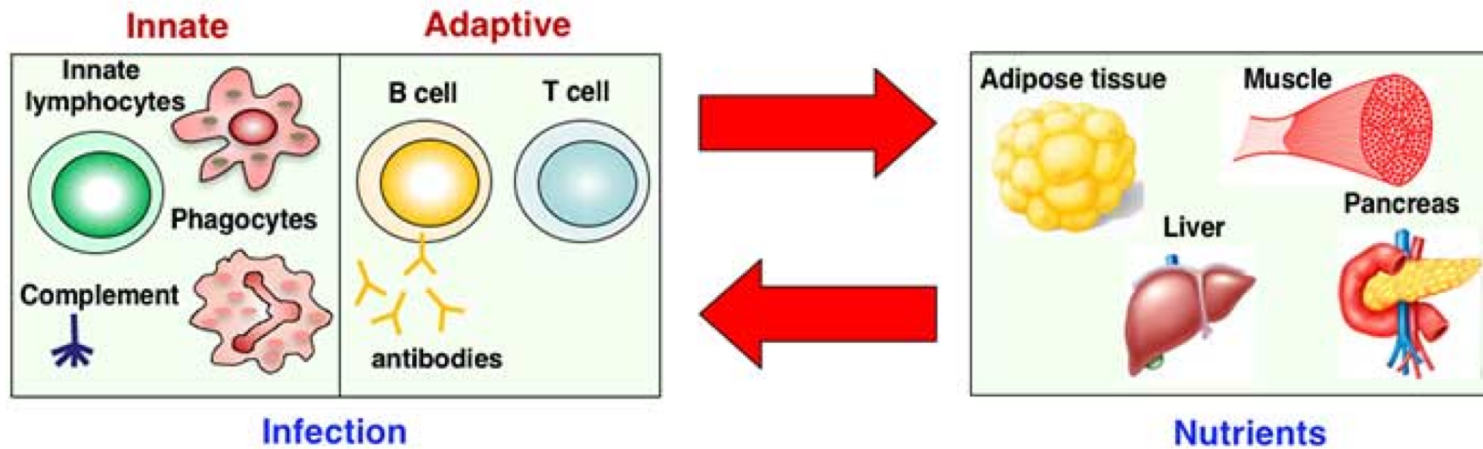


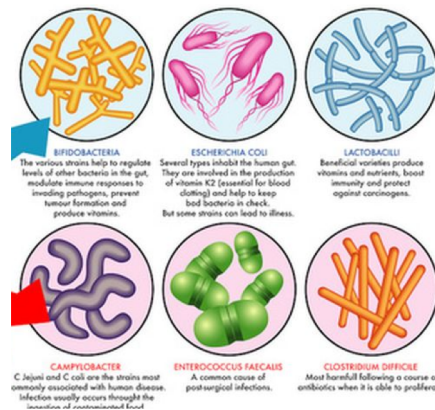
# Immuno-metabolism

## Immunity

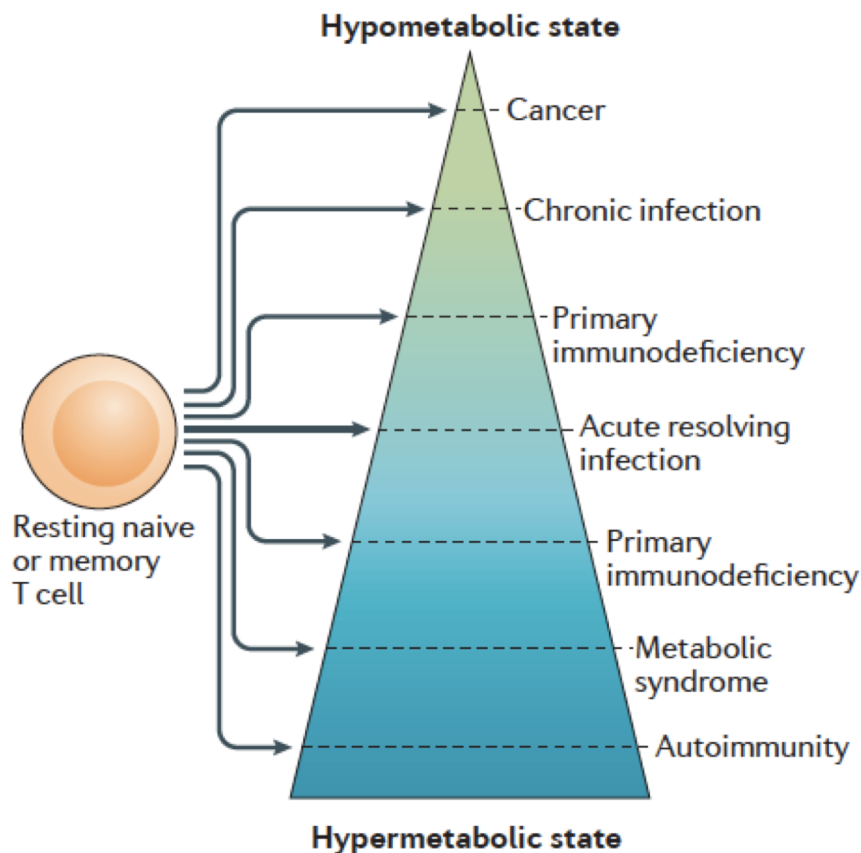
## Metabolism



## Microbiota



# Overview degli stati metabolici delle cellule T in diverse condizioni patologiche



L'omeostasi metabolica dei linfociti T in condizioni fisiologiche e di riprogrammazione metabolica (es in seguito ad infezione acuta) riflette lo spettro e le dinamiche dell'immunometabolismo guidato dall'evoluzione.

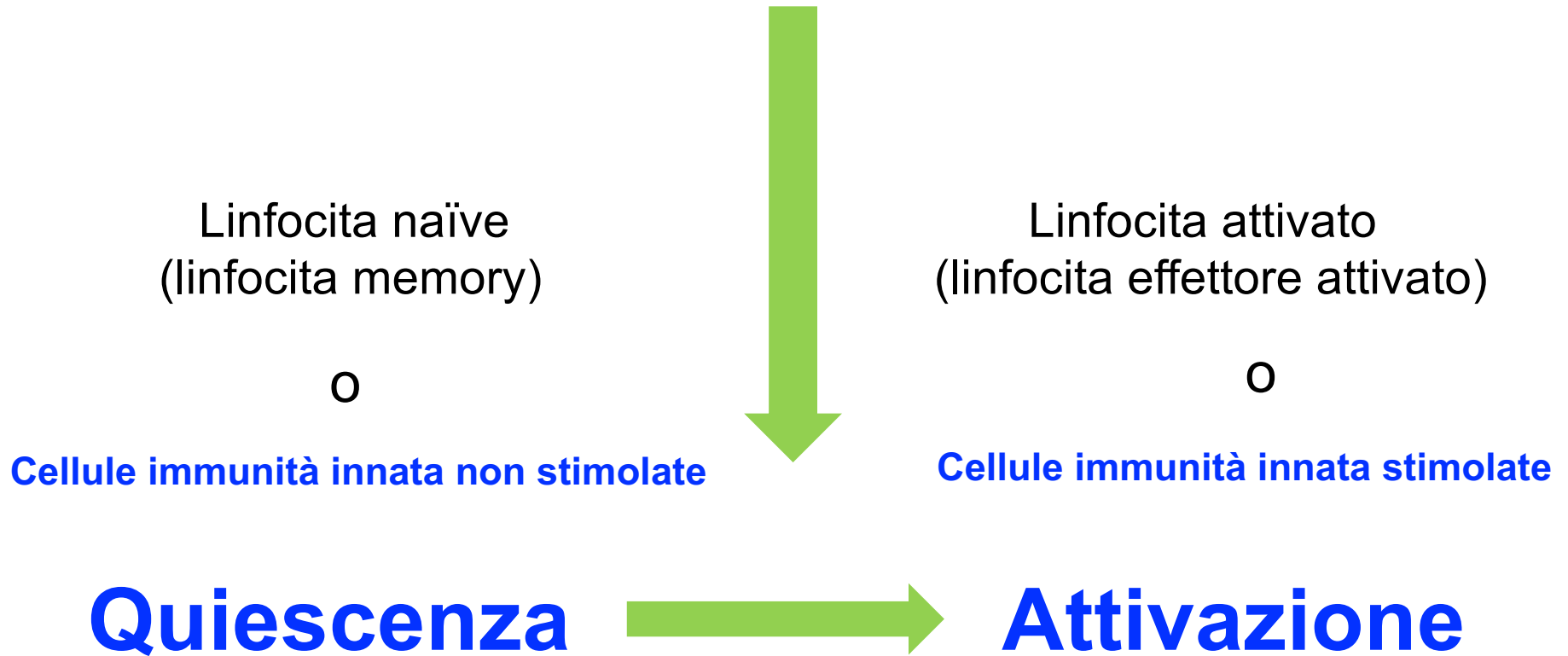
I linfociti T naive e *memory* quiescenti si basano principalmente sul catabolismo del glucosio e degli *acidi grassi*, rispettivamente, per mantenere le funzioni "housekeeping", la generazione di energia e la sopravvivenza. Le cellule T effettrici attivate aumentano rapidamente sia le vie anaboliche che cataboliche per supportare l'aumento delle richieste energetiche e biosintetiche. I **linfociti T convenzionali** sono caratterizzati da **flessibilità metabolica**, cioè utilizzano più fonti di "biocarburante" in nicchie ricche o prive di nutrienti in una vasta gamma di stati infiammatori sistemici e locali.

Deviazioni nella magnitudo e flessibilità metaboliche delle cellule T effettrici, per fattori intrinseci o estrinseci, per periodi prolungati possono essere definite come stati ipermetabolici o ipometabolici.

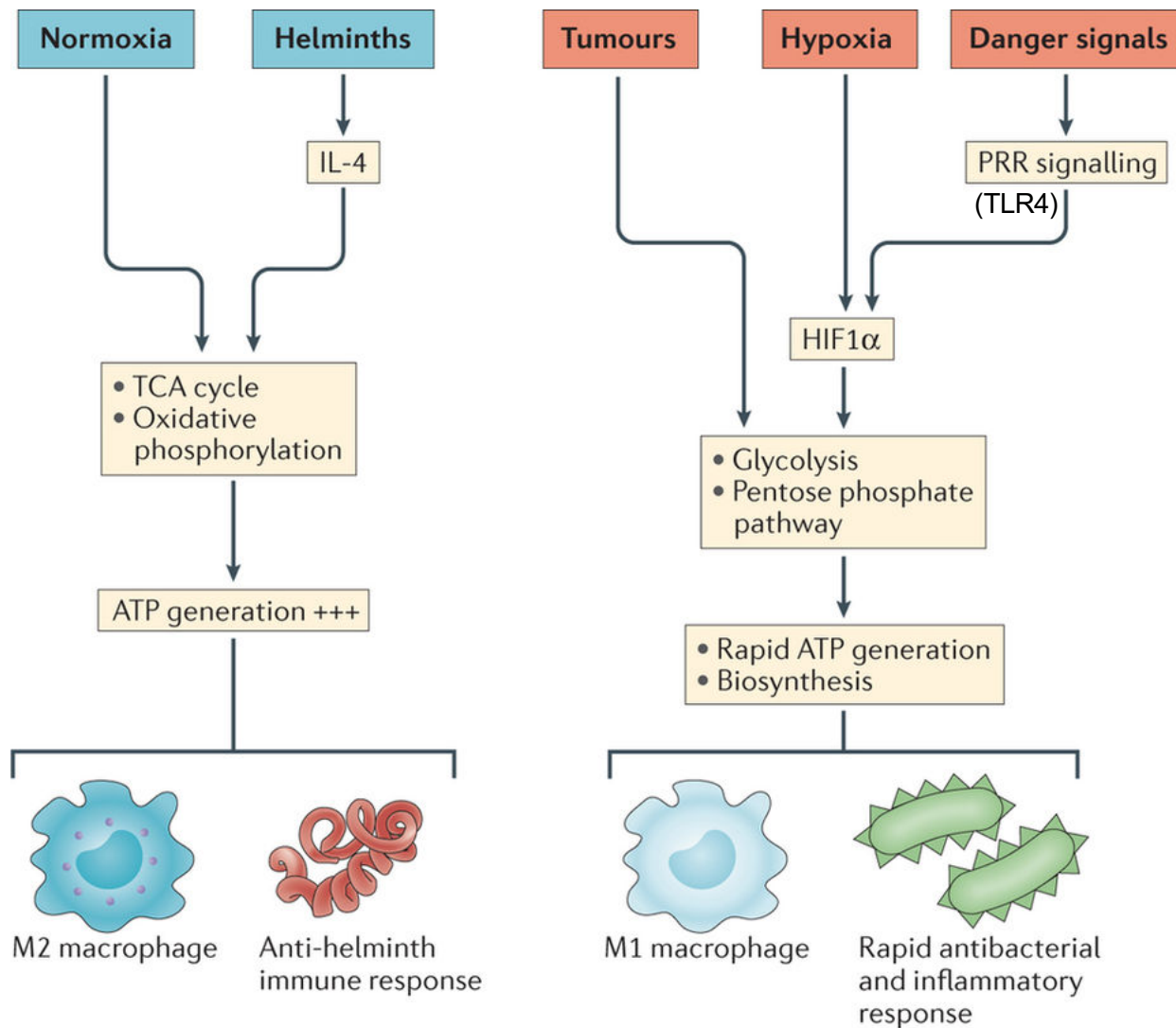
Lo **stato ipermetabolico** copre uno spettro di malattie in cui il metabolismo delle cellule T patogene è sbilanciato verso un maggiore consumo di "biocarburante" e biosintesi, **in parte a causa dell'aumentata disponibilità di nutrienti e dei deficit nelle vie tollerogeniche**.

Al contrario, lo **stato ipometabolico** copre una serie di malattie in cui le cellule T effettrici hanno un accesso limitato alle vie metaboliche essenziali per le loro funzioni. Ciò è in parte dovuto alla mancanza di disponibilità di nutrienti o all'attivazione disregolata dei meccanismi di checkpoint immunitario che si traduce in una riduzione della flessibilità metabolica delle cellule T.

# Riprogrammazione metabolica



# Immunometabolismo



Le cellule immunitarie con diverse funzioni effettrici utilizzano vari pathways metabolici per generare livelli adeguati di **energia** per la sopravvivenza e per produrre numerosi **intermedi biosintetici** che consentono la crescita e la proliferazione cellulare.

In seguito ad attivazione, meccanismi molecolari intrinseci ed estrinseci convergono per riprogrammare il metabolismo cellulare al fine di:

1. **generare rapidamente ATP** per mantenere lo stato energetico;
2. **aumentare la biosintesi** delle macromolecole;
3. **mantenere un adeguato stato redox cellulare**

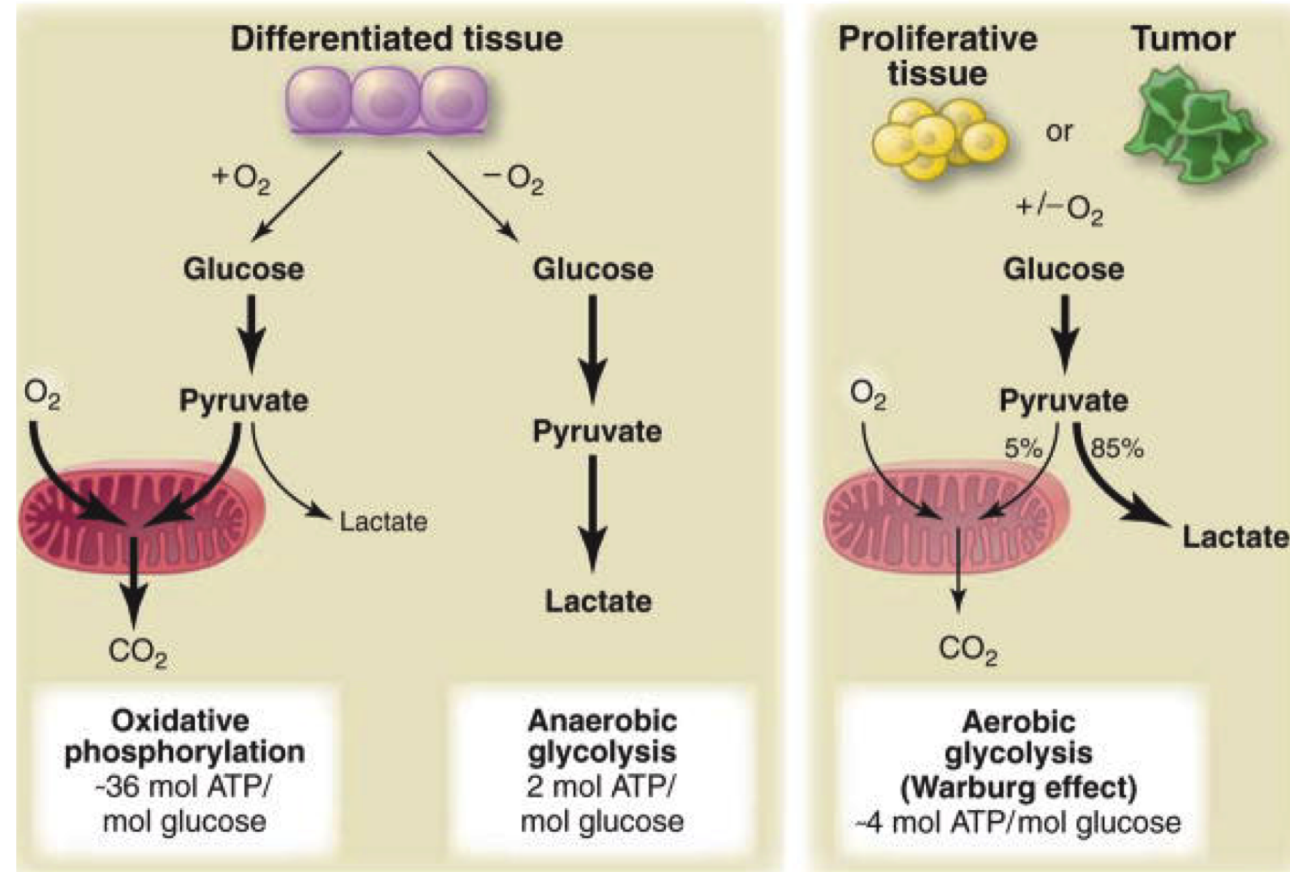
# Effetto Warburg o glicolisi aerobica

Passaggio dalla **fosforilazione ossidativa** alla **glicolisi aerobica o aerobia** anche a concentrazioni di **ossigeno normali (normossia)**, al fine di generare meno energia ma preservare e produrre le basi per la biosintesi degli organelli cellulari per la proliferazione e le risposte funzionali.

## Glicolisi aerobica o aerobia

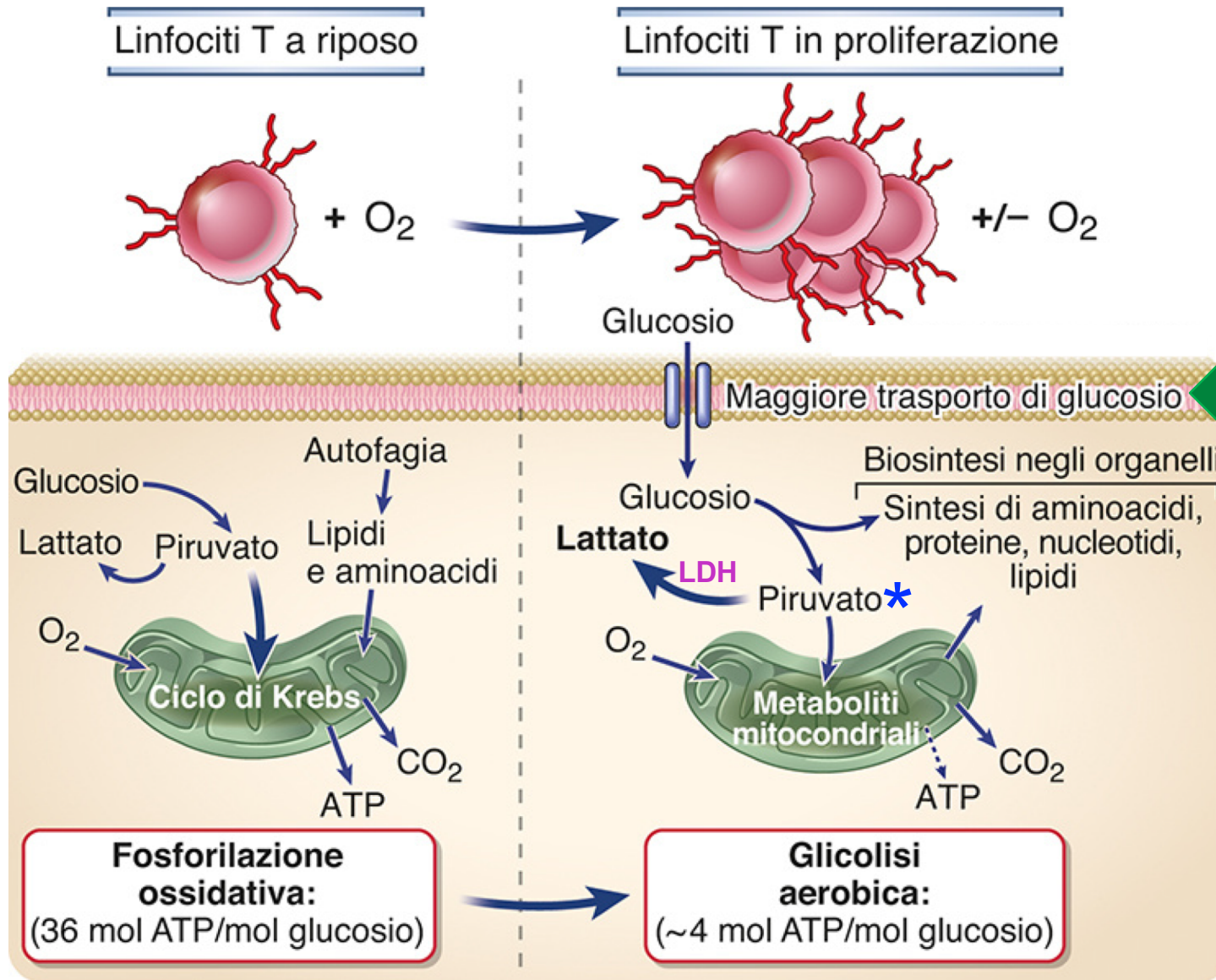
**Vantaggi:** produzione **più rapida** di ATP e aumento della produzione di **intermedi** per la sintesi di macro-molecole (aminoacidi e nucleotidi)

**Svantaggi:** meno efficiente in termini di ATP generato per unità di glucosio consumato (4 mol vs 36 mol). Diverse cellule immunitarie potenziano la glicolisi.

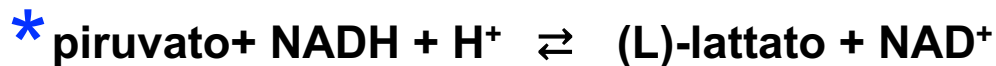


(Otto Warburg medico e fisiologo tedesco, vince il premio Nobel per la Medicina nel 1931 per aver descritto per la prima volta il processo della glicolisi aerobica nelle cellule tumorali)

# Variazioni metaboliche durante l'attivazione dei linfociti T



Nei linfociti T a riposo (resting) la via principale per generare ATP è la fosforilazione ossidativa mitocondriale. Invece i linfociti attivati usano la glicolisi aerobica che genera meno energia ma preserva e produce le basi per la biosintesi degli organelli cellulari necessaria per la proliferazione e le risposte funzionali.



LDH  
(lattato deidrogenasi)

**1 molecola di glucosio** → **GLICOLISI** → **2 molecole di ATP**

**1 molecola di glucosio** → **FOSFORILAZIONE  
OSSIDATIVA** → **36 molecole di ATP**

## **Rapido aumento della glicolisi nei:**

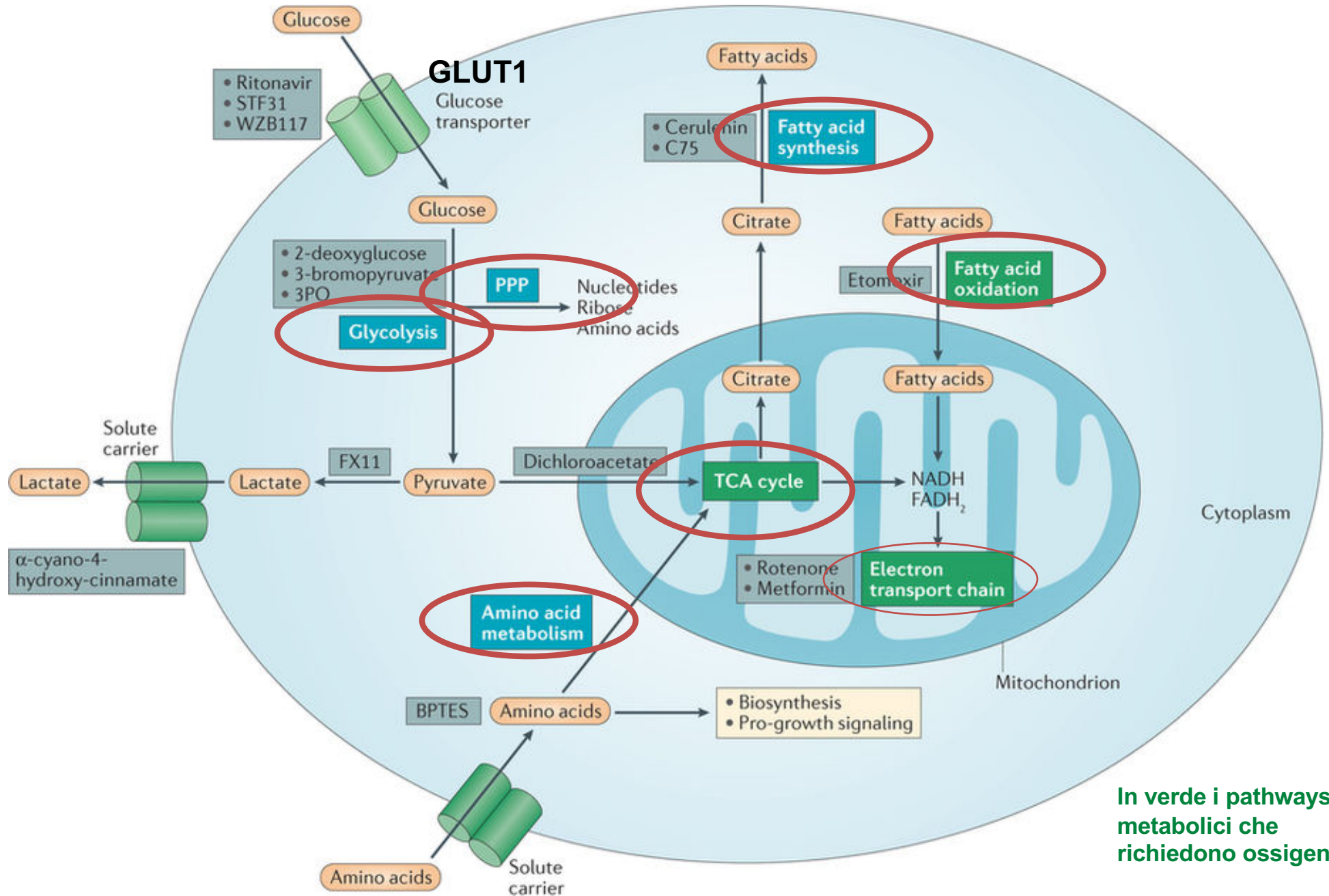
- Macrofagi e cellule dendritiche (DC) attivati da LPS
- Linfociti Th effettori (Th1; Th17 e Th2) non è lo stesso per i Treg
- Cellule NK attivate
- Linfociti T CD8+ effettori

## **Glicolisi correla con una rapida attivazione**

**in risposta a stimolazione dei PRR, stimolazione antigenica e citochinica**

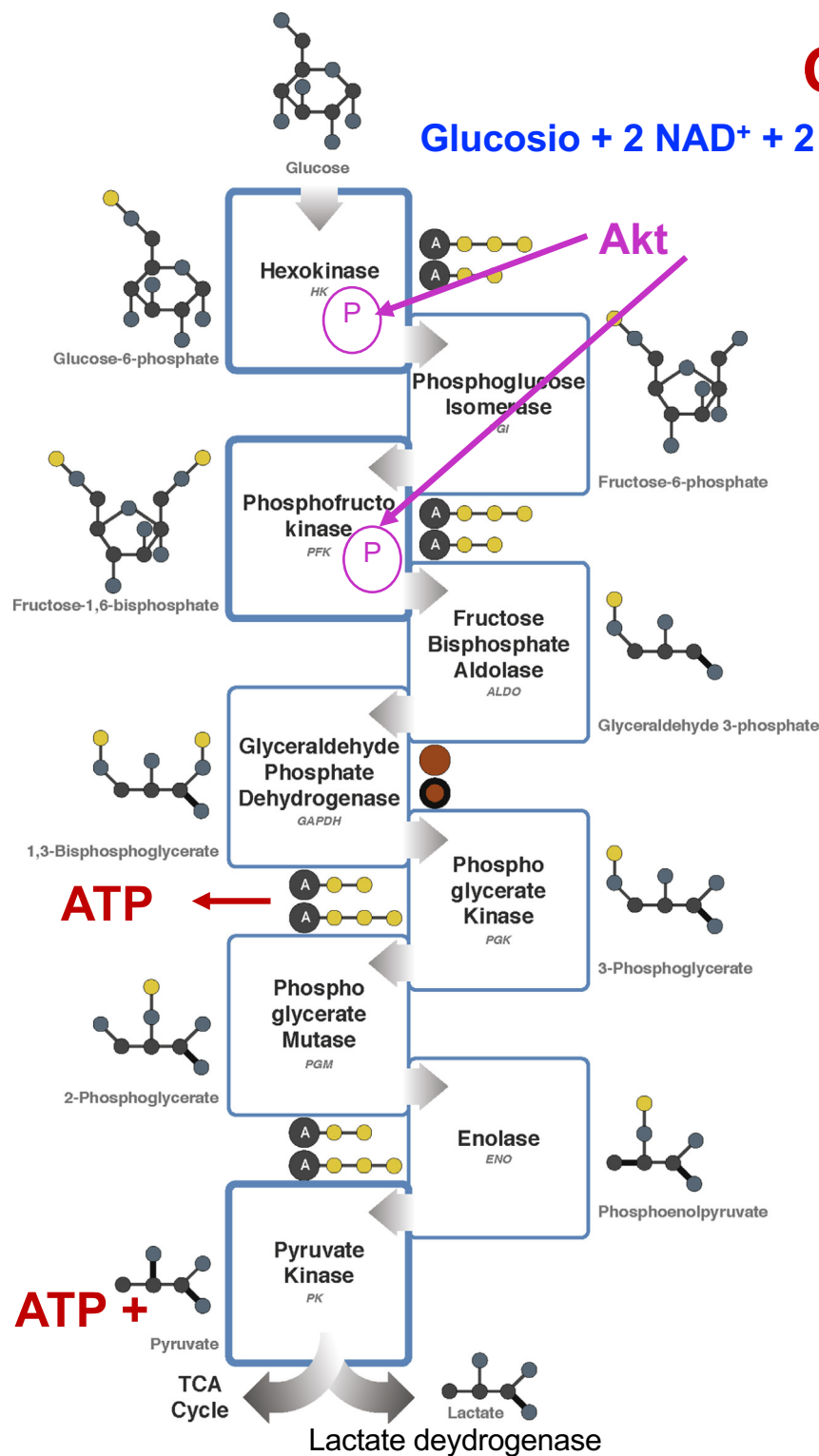


# I sei maggiori pathways metabolici



In verde i pathways metabolici che richiedono ossigeno

# Glycolysis

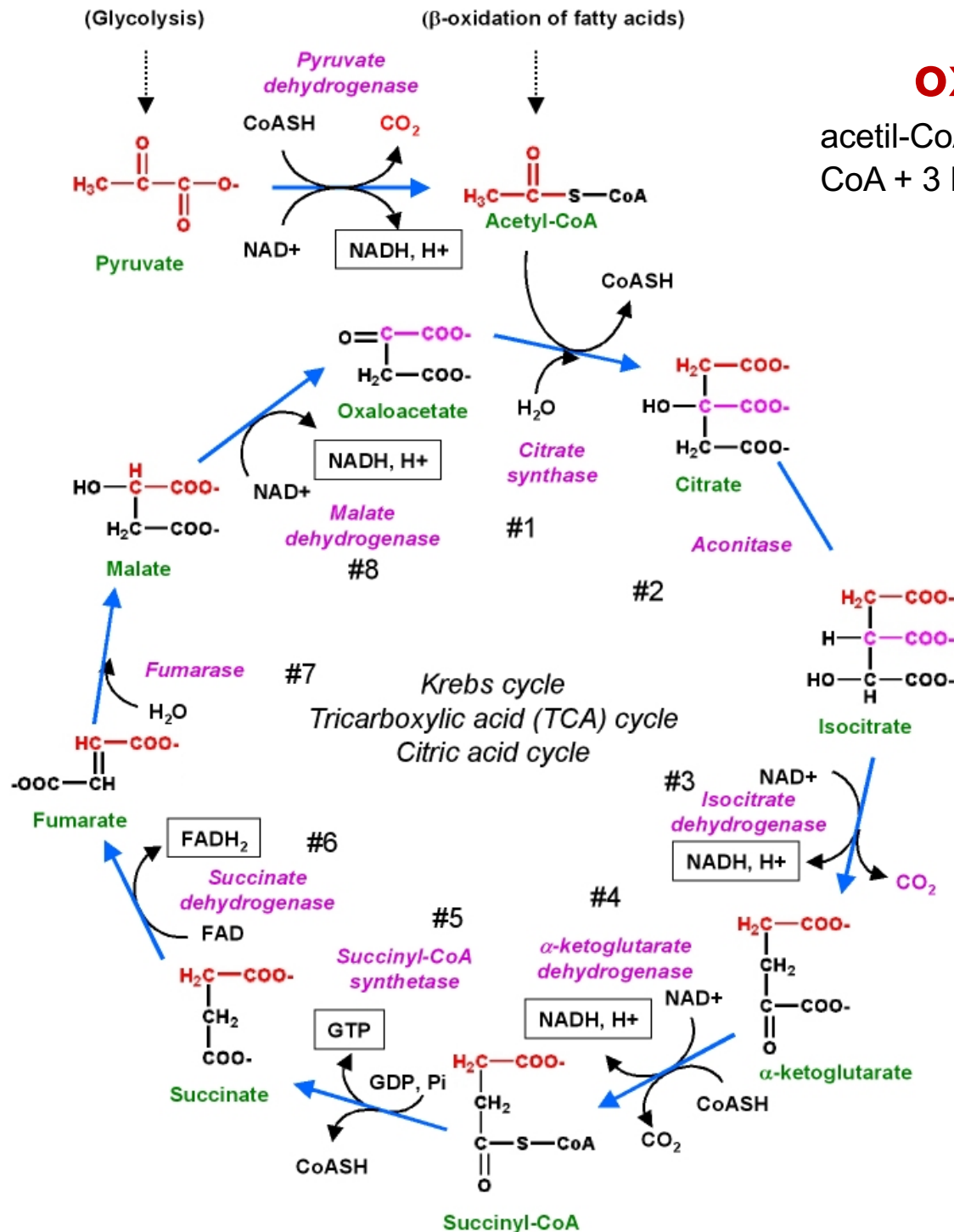
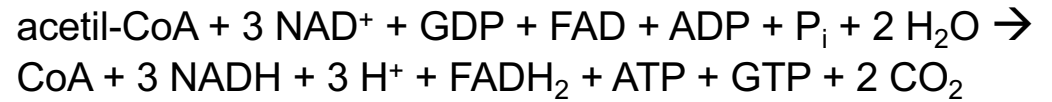


1. **Hexokinase (HK2)** phosphorylates **glucose** to glucose 6-phosphate that is converted to fructose 6-phosphate by phosphoglucose isomerase (PGI)
2. **Phosphofruktokinase (PFKFB3)** phosphorylates fructose 6-phosphate > fructose 1,6-bisphosphate that is converted to glyceraldehyde 3 phosphate by fructose biphosphate aldolase (ALDO)
3. **Glyceraldehyde 3 phosphate deydrogenase (GAPDH)** converts glyceraldehyde 3 phosphate to 1,3-bisphosphoglycerate that is phosphorylated by Phosphoglycerate kinase (PGK) > 3-phosphoglycerate
4. Phosphoglycerate mutase (PGM) converts 3-phosphoglycerate in 2-phosphoglycerate that is converted by **enolase (ENO)** to phosphoenolpyruvate
5. **Pyruvate Kinase (PK)** → **pyruvate**

## Pathway metabolico che genera:

- ATP (in modo inefficiente);
- NADH (cofattore per numerosi enzimi);
- Intermedi biosintetici che supportano processi anabolici di crescita.

# TCA (Krebs cycle) and oxidative phosphorylation



**Pyruvate dehydrogenase (PDH)** converts pyruvate in **Acetyl-CoA**

- **Acetyl-CoA** enters TCA that occurs in the matrix of the mitochondrion
- **Acetyl-CoA** is joined to oxaloacetate by citrate synthase to produce **citrate**
- Final step: resynthesis of oxaloacetate new **TCA**
- **Succinate, NADH and FADH<sub>2</sub>** → **oxidative phosphorylation** in the inner mitochondrial membrane.

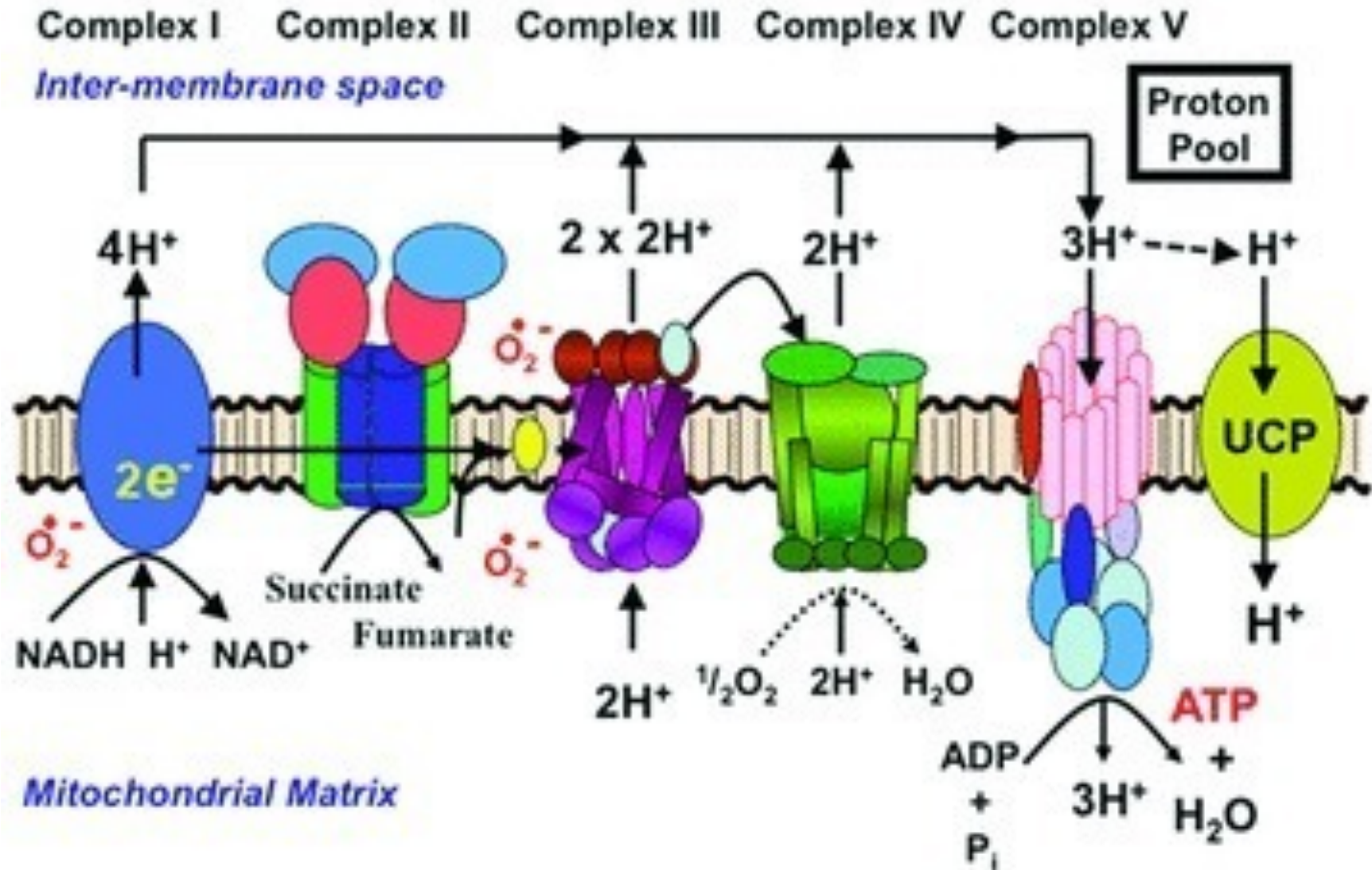
**Pathway principale per cellule quiescenti (non proliferanti) che genera:**

- ATP
- NADH
- FADH<sub>2</sub>

**Associato ad energia e longevità**

# Oxidative Phosphorylation

Succinate, NADH and FADH<sub>2</sub> are further oxidated in mitochondria (cytochrome c oxidase complex)

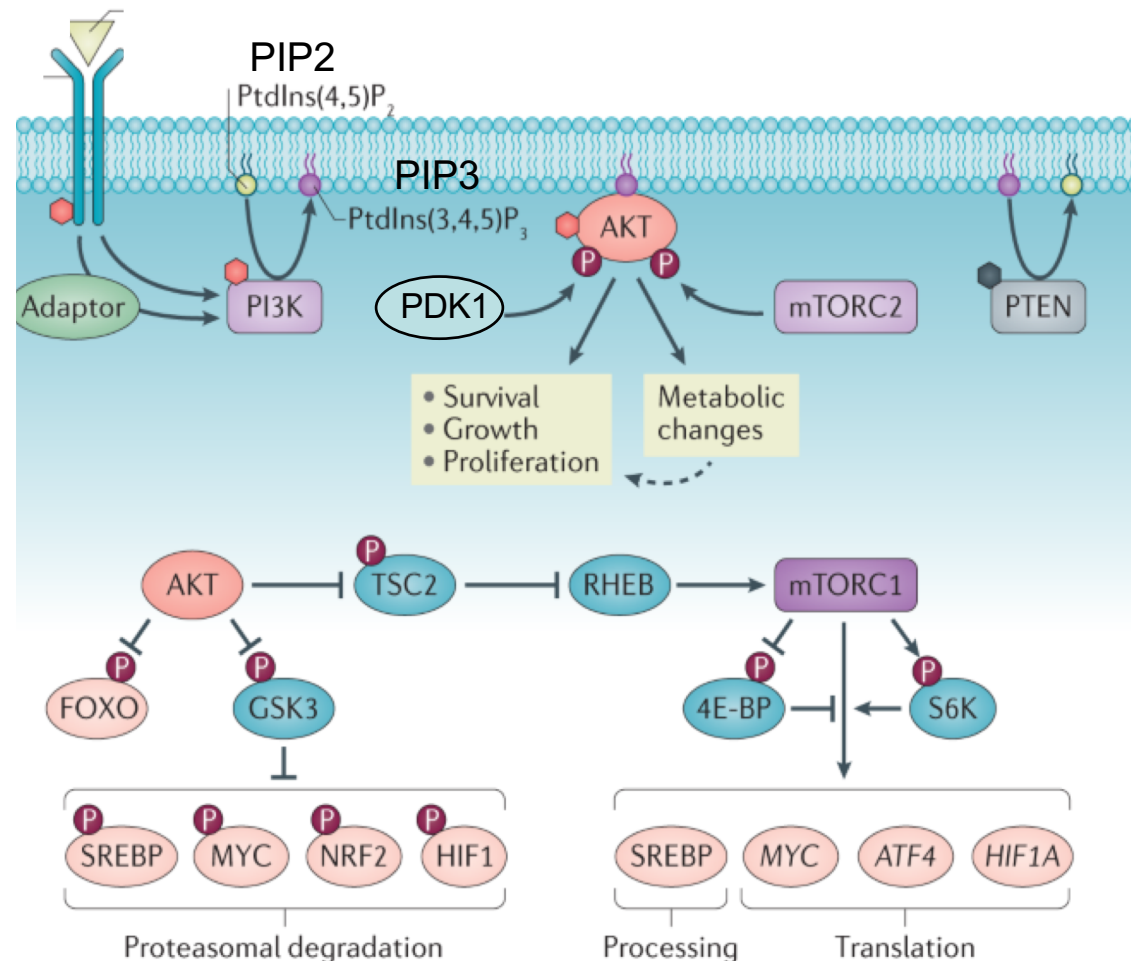


# PI3K-Akt e glicolisi

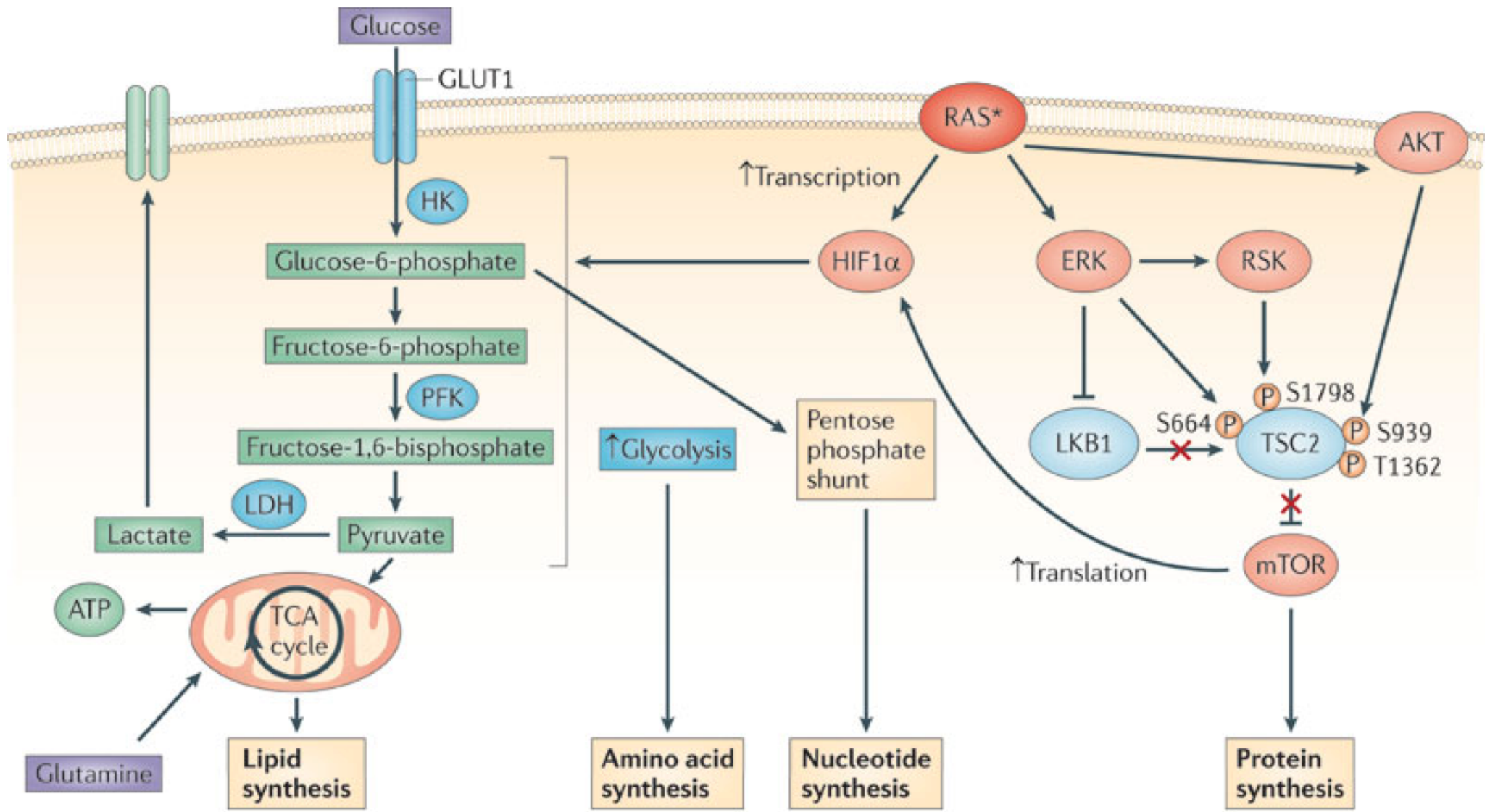
**PI3K-Akt** è una delle vie di segnalazione più comunemente attivate da diversi recettori immunitari che attivando mTORC1 induce la biosintesi di proteine e lipidi e la crescita cellulare in risposta a condizioni nutritive ed energetiche sufficienti

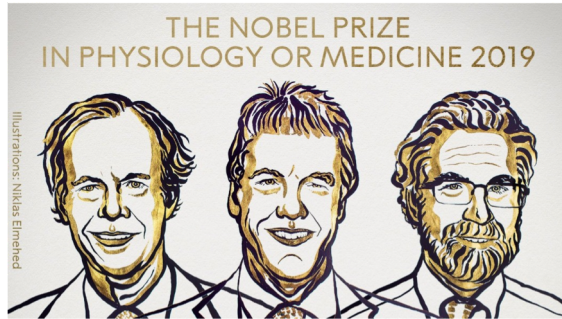
## Akt stimola la glicolisi:

1. Fosforilando esochinasi (HK2) e fosfofruttochinasi (PFKFB3) (**enzimi della glicolisi**) ne aumenta la loro attività
2. inducendo il fattore 1 inducibile dall'ipossia (**HIF1**)
3. Inducendo indirettamente l'espressione e la traslocazione di membrana dei trasportatori del glucosio (**GLUT1**)



# Regolazione del metabolismo del glucosio



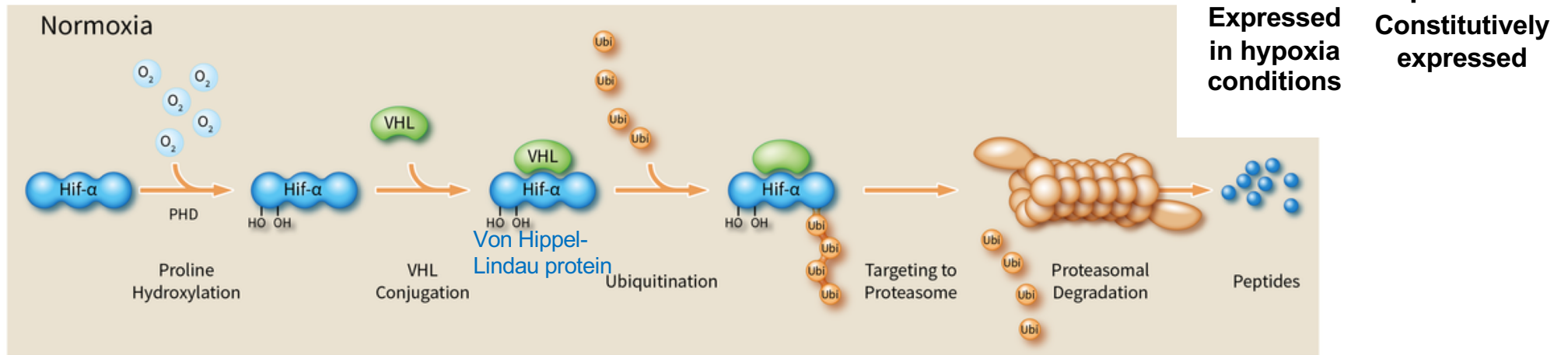


awarded to William G. Kaelin, Sir Peter J. Ratcliffe and Gregg L. Semenza

# Nobel Prize in physiology and medicine 2019:

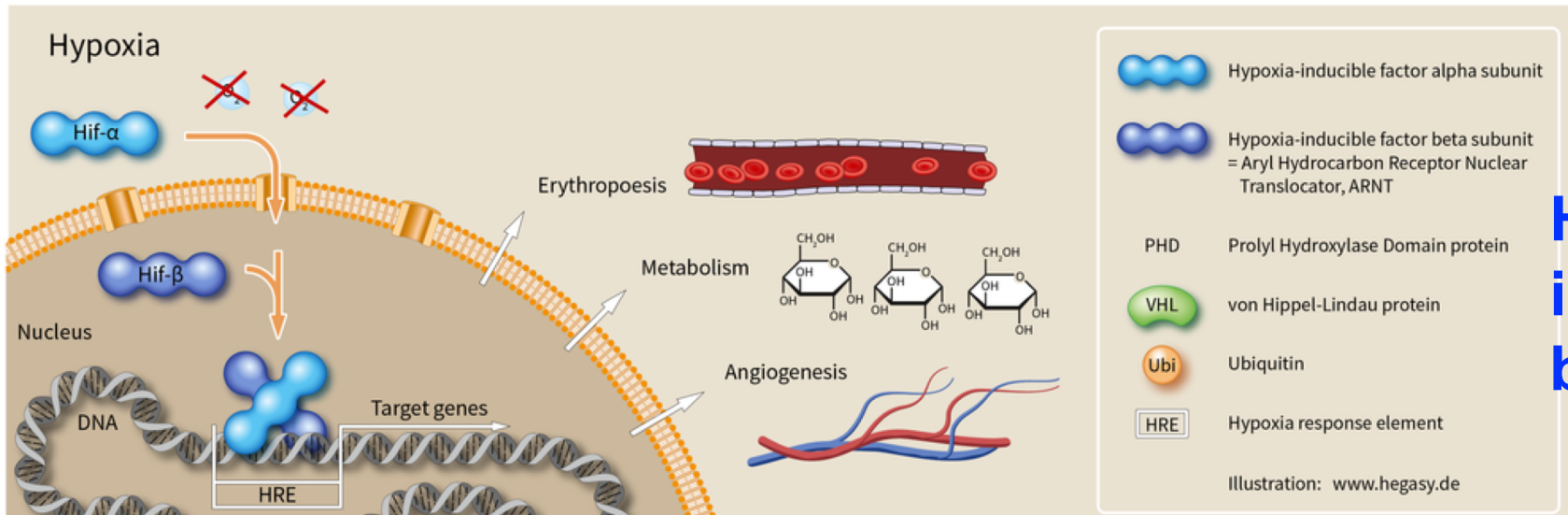
How cells sense and adapt to oxygen availability

KEY FACTOR = the transcription factor **HIF1** (**HIF1 $\alpha$**  + **HIF1 $\beta$** )



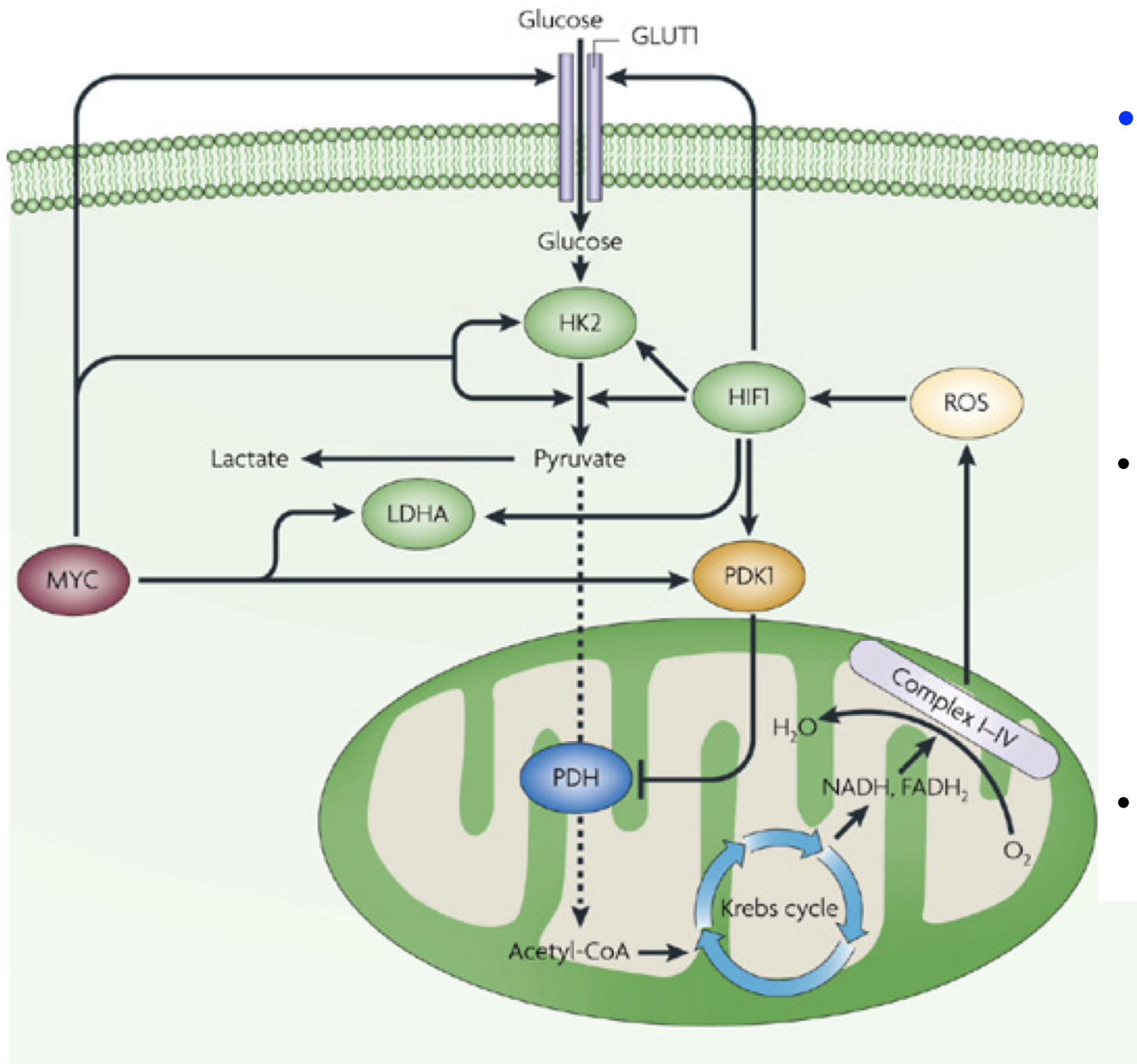
Expressed in hypoxia conditions

Constitutively expressed



**HIF1 is induced by hypoxia**

# HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) e glicolisi

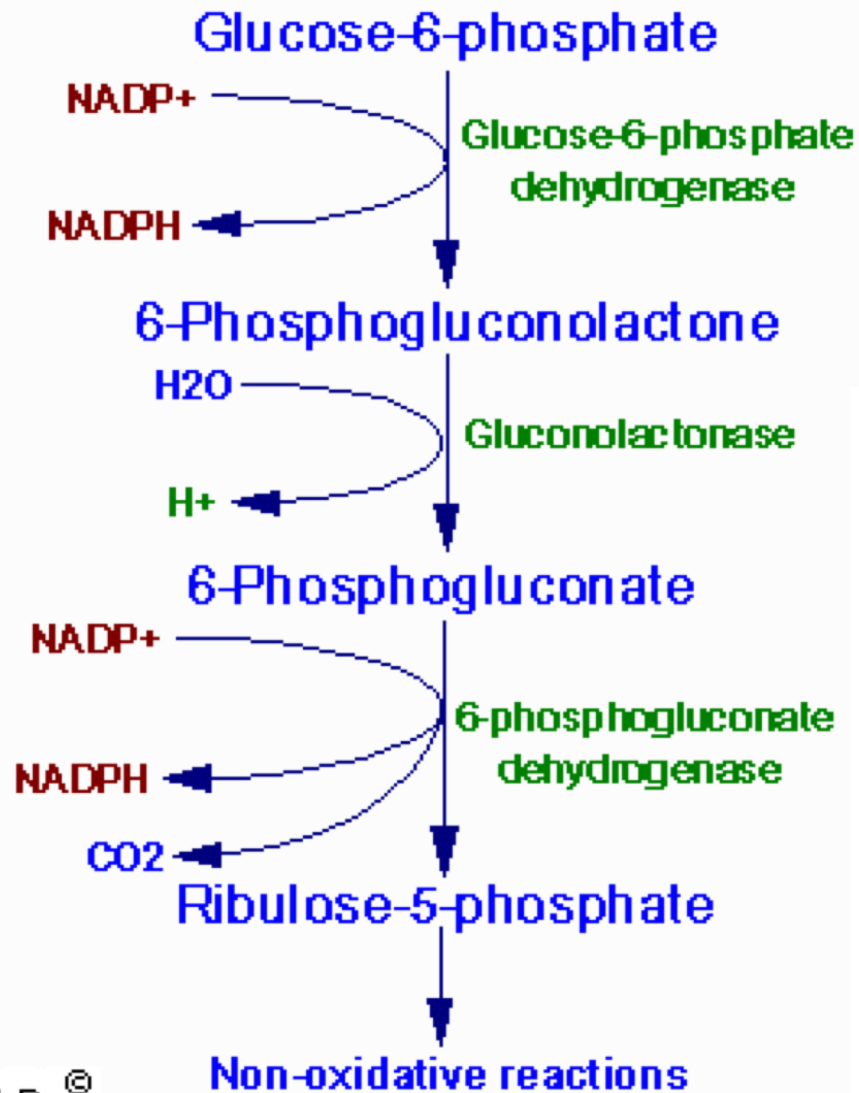


- **HIF1** amplifica la trascrizione dei trasportatori del glucosio (es GLUT1 e 3) e degli enzimi glicolitici (es. HK2);
- Induce la piruvato deidrogenasi chinasi (PDKs) e **riduce** il flusso del piruvato derivato dal glucosio nel **ciclo acido tricarbossilico (TCA)**;
- induce lattato deidrogenasi (LDH-A)



# Pentose Phosphate Pathway (PPP)

Oxidative stages of PPP



M.D. ©

**Due importanti effetti della via dei pentoso fosfati:**

**1.** conversione degli zuccheri esosi (a 6 atomi di carbonio) in **pentosi** per la produzione di nucleotidi (**DNA, RNA**)

**2.** Produzione **NADPH**

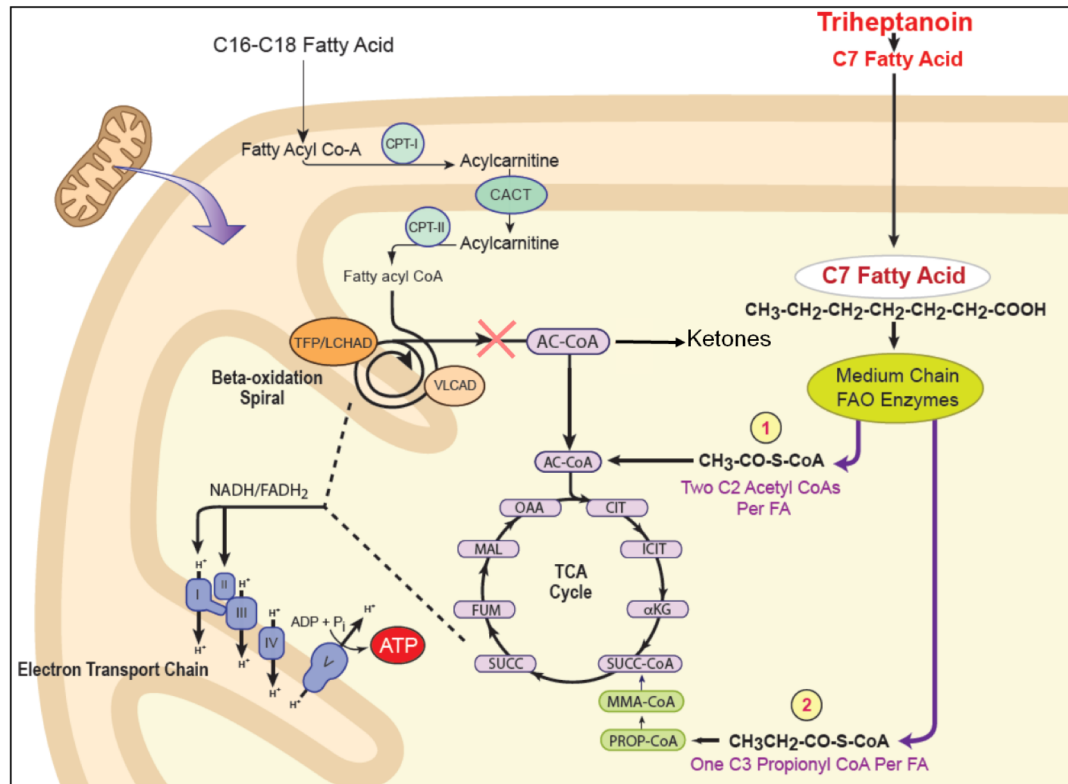
**NADPH:** Cofattore cruciale che fornisce **potere riducente** in molte reazioni enzimatiche per la biosintesi macromolecolare.

Antiossidante cruciale, nei confronti delle specie reattive dell'ossigeno (**ROS**) prodotte durante la rapida proliferazione cellulare.

Potere riducente per i sistemi del **glutatione** (GSH) e della **tiorredossina** (TRX) che eliminano i ROS e riparano i danni da essi indotti.

NADPH ossidasi utilizza NADPH per generare specie reattive dell'ossigeno (ROS) durante il burst respiratorio, ma per controbilanciare viene anche utilizzato per generare glutatione ridotto e altri antiossidanti.

# Fatty acid oxidation



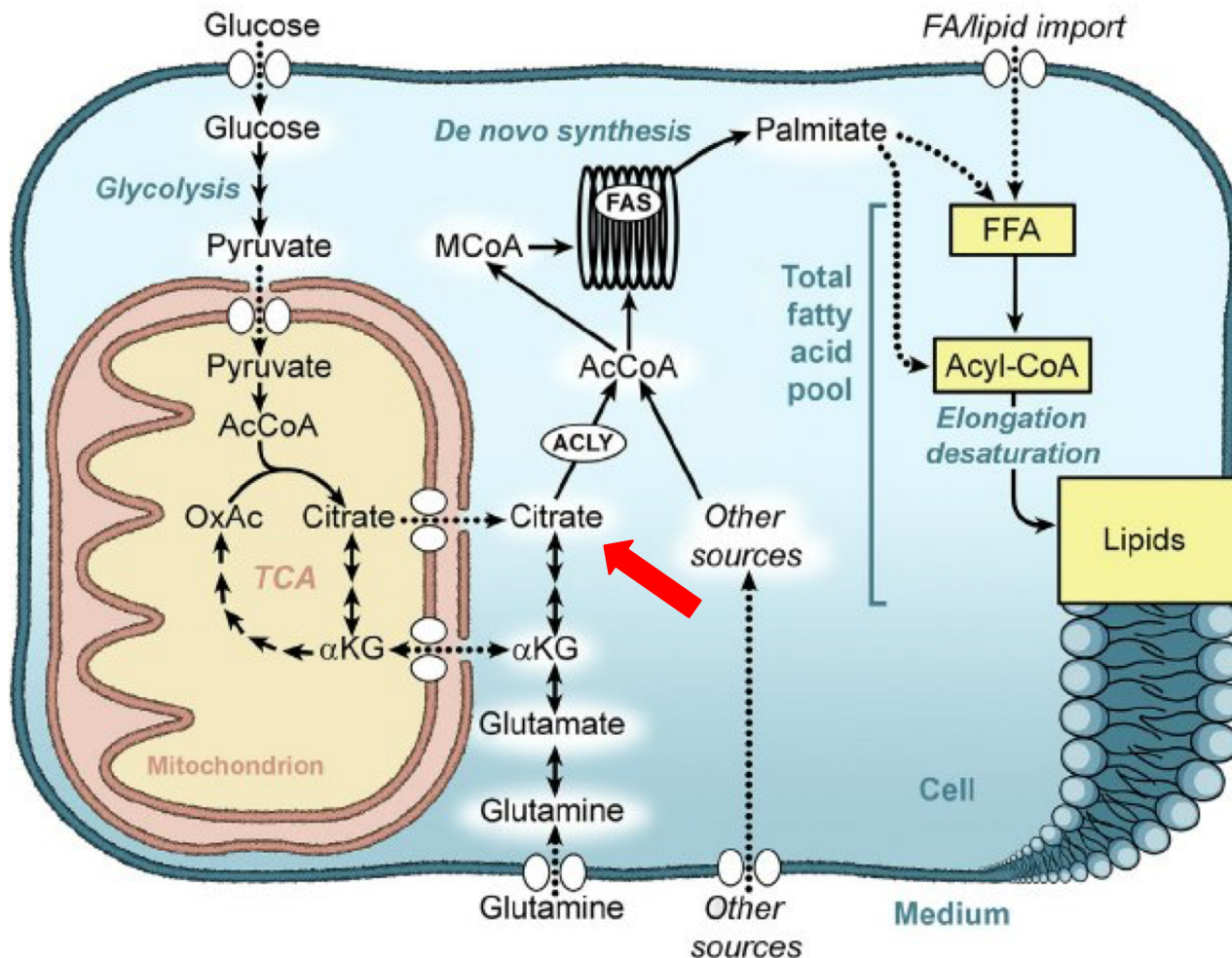
Il **pathway di ossidazione degli acidi grassi** consente la loro conversione nel **mitocondrio** in numerosi prodotti che la cellula può usare per produrre:

- Energia (**acil-CoA** inclusa)
- **NADH**
- **FADH<sub>2</sub>**

- Attivazione dell'acido grasso nel citosol tramite una reazione mediata da enzimi con ATP per generare infine un acido grasso acil-CoA. Gli **acidi grassi a catena corta**, meno di sei atomi di carbonio nella coda alifatica, sono in grado di diffondere passivamente nei mitocondri.
- Gli acidi grassi a catena media e lunga devono essere prima coniugati alla carnitina tramite la carnitina palmitoil transferasi I (CPT1). L'acil-carnitina viene trasportata nei mitocondri dove viene riconvertita in un acido grasso acil-CoA attraverso la rimozione della carnitina da parte della carnitina palmitoil transferasi II (CPT2). La  $\beta$ -ossidazione dell'acido grasso acil-CoA genera grandi quantità di **acetil-CoA, NADH e FADH<sub>2</sub>** che vengono ulteriormente utilizzati nel ciclo TCA e nella catena di trasporto degli elettroni per generare ATP.

# Sintesi degli acidi grassi

Il pathway di sintesi degli acidi grassi permette di generare i lipidi necessari alla crescita e proliferazione cellulare. I precursori di questa sintesi derivano dalla glicolisi, dal ciclo TCA e dal PPP.

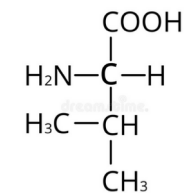


La sintesi di acidi grassi a catena lineare utilizza prodotti derivati dal ciclo dei TCA.

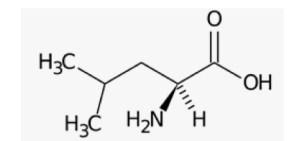
1. Il **citrato** derivato dal ciclo TCA può essere esportato dai mitocondri nel citosol dove l'ATP citrato liasi lo converte in acetil-CoA.
2. Il derivato dell'acetil-CoA è carbossilato dall'acetil-CoA carbossilasi in malonil-CoA.
3. La sintasi degli acidi grassi allunga la catena nascente degli acidi grassi fino a produrre prodotti come l'acido palmitico.

4. Gli acidi grassi con lunghezze di catena alternative possono essere sintetizzati utilizzando **acido palmitico** come substrato per l'allungamento.

Gli acidi grassi a catena ramificata richiedono aminoacidi come la **valina** e la **leucina** come substrati per l'allungamento. Inoltre, gli acidi grassi possono essere condensati con glicerolo derivato dalla glicolisi.



valina



leucina

## Metabolismo degli aminoacidi

I singoli aminoacidi possono svolgere ruoli specifici nelle vie metaboliche.

- La **valina** e la **leucina** possono agire come precursori per la sintesi *de novo* di acidi grassi a catena ramificata.
- La **glutammina** e l'**aspartato** sono necessari per la sintesi *de novo* di **purine e pirimidine**.
- La **glutammina** può essere utilizzata nelle cellule che proliferano attivamente come input alternativo per il ciclo TCA dove può essere utilizzata per supportare la produzione di ATP o come fonte di citrato per la **sintesi degli acidi grassi**.
- **Arginina** e **triptofano** vengono metabolizzati attraverso varie vie metaboliche per supportare la **proliferazione cellulare e la crescita anabolica**.

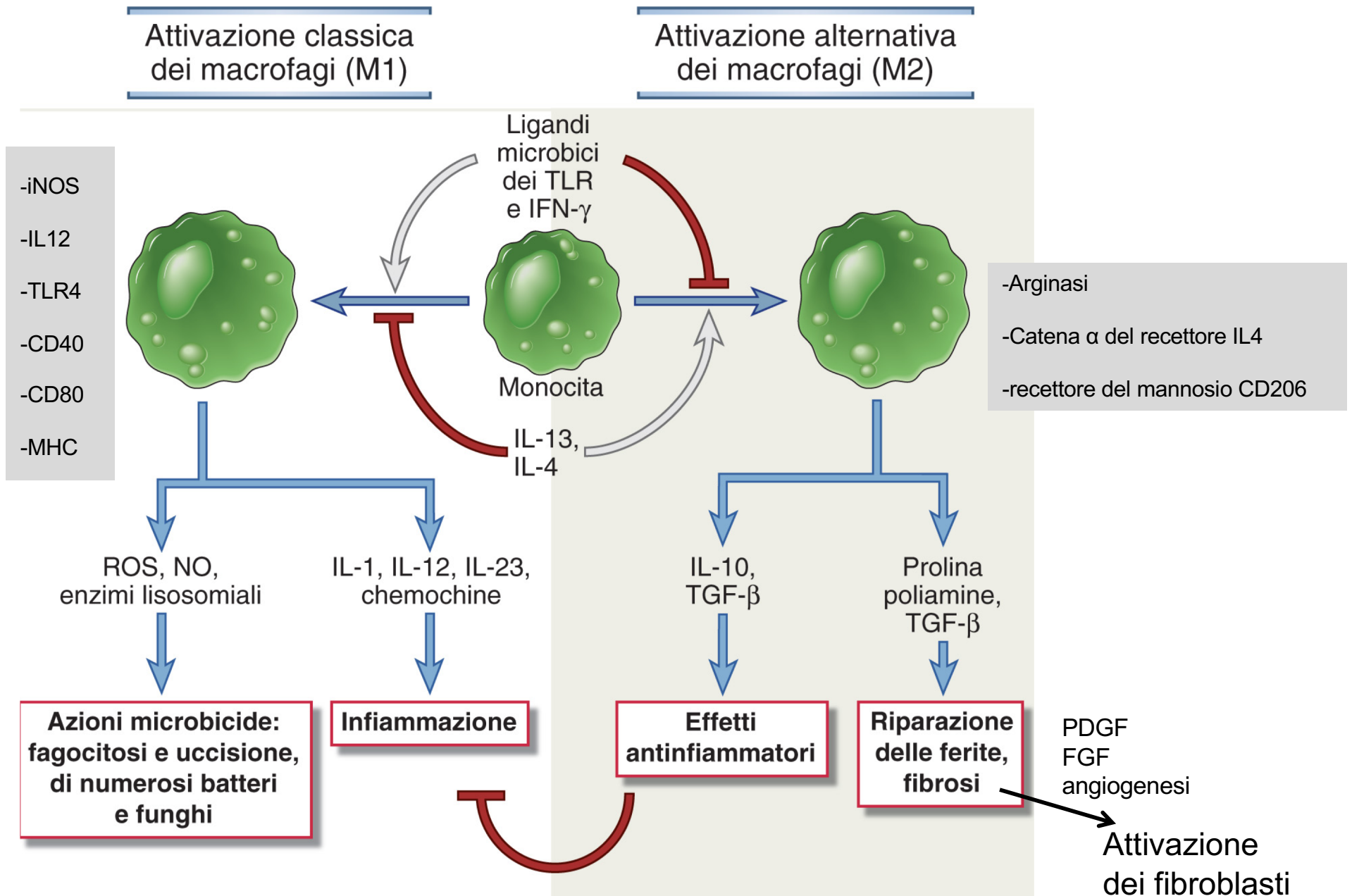
## **Rapido aumento della glicolisi nei:**

- **Macrofagi** e cellule dendritiche (DC) **attivati da LPS**
- Linfociti T effettori (Th1; Th17 e Th2) non è lo stesso per i Treg
- NK cells attivate
- Linfociti T CD8+ effettori attivati

## **Glicolisi correla con una rapida attivazione**

**in risposta a stimolazione dei PRR, stimolazione antigenica e citochinica**

# Attivazione dei macrofagi: classica vs alternativa



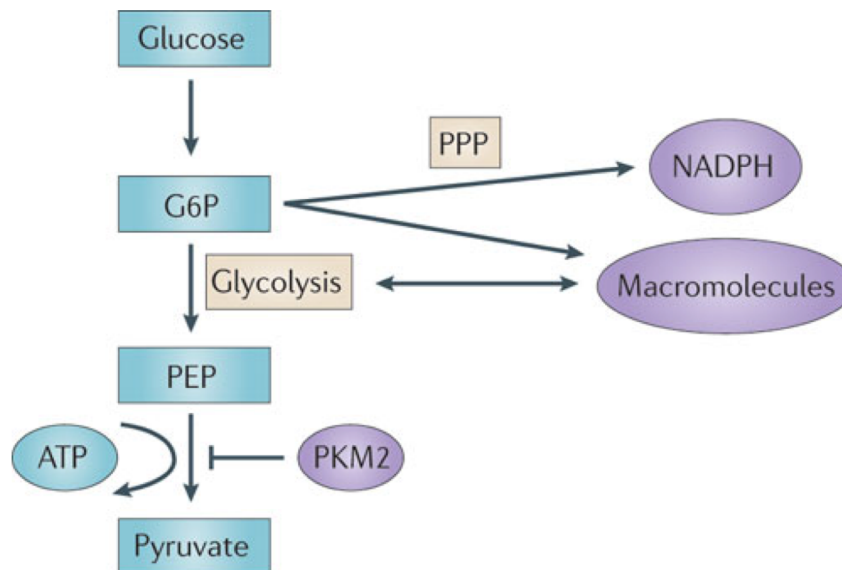


## Glicolisi nei macrofagi M1

**LPS** che polarizza i macrofagi M1 può:

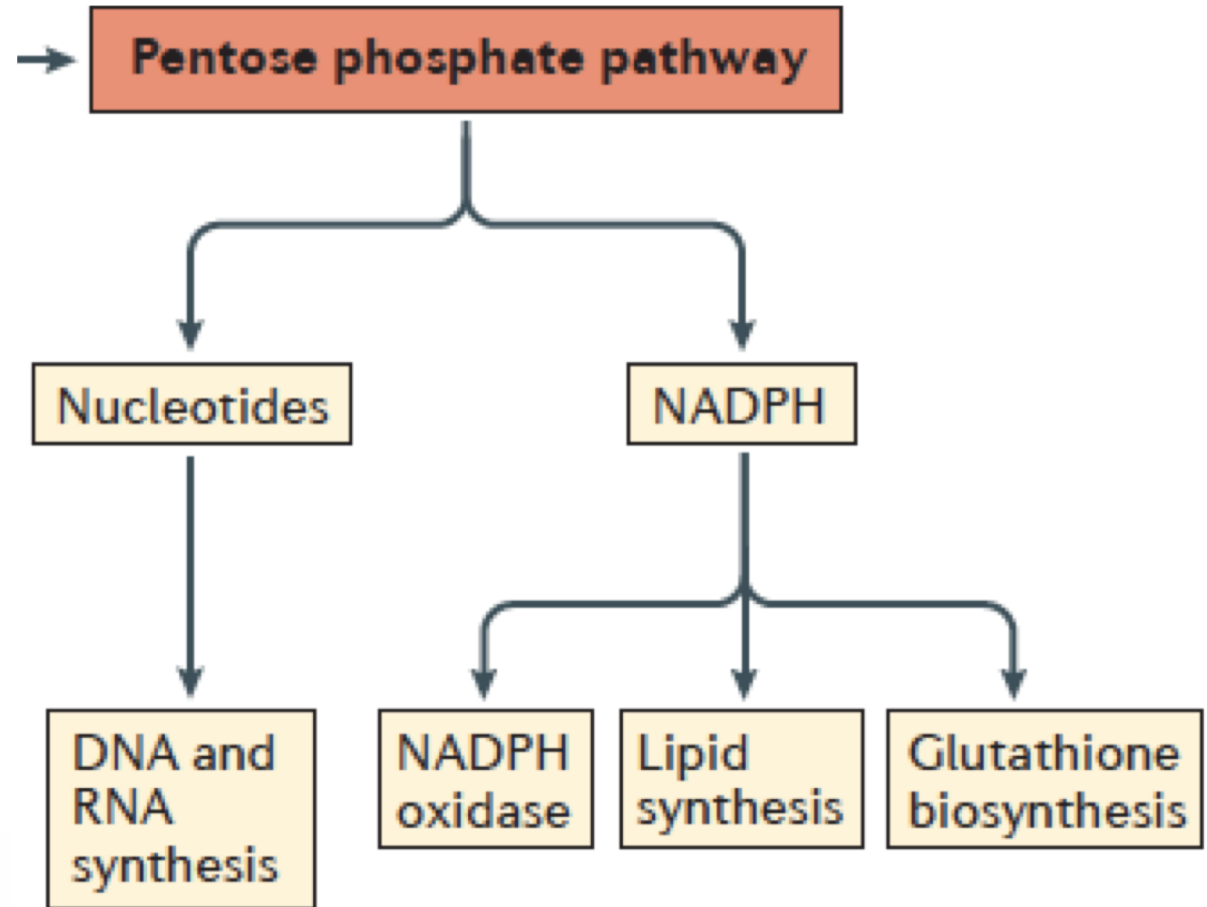
- favorire l'attivazione di **HIF1 $\alpha$**  che a sua volta induce gli "HIF1 $\alpha$ -dependent genes" inclusi enzimi glicolitici e fattori pro-infiammatori, come IL-1 $\beta$ .
- induce l'attivazione di **NF- $\kappa$ B**, che ha come bersaglio trascrizionale la **fosfofruttochinasi - 2** (uPFK2), che è fondamentale per la regolazione della glicolisi.
- Induzione dell'isoenzima M2 della piruvato chinasi (**PKM2**) rallenta il flusso glicolitico e consente la deviazione degli intermedi glicolitici verso altri percorsi biosintetici e coopera con HIF1 $\alpha$  inducendo geni proinfiammatori.

Pathways used:	
Glycolysis	Supports phagocytosis and inflammatory cytokine production
TCA cycle	Redirected to produce citrate to promote fatty acid synthesis
Pentose phosphate pathway	Supports nucleotide and ROS production
Fatty acid synthesis	Supports proliferation and inflammatory cytokine production
Amino acid metabolism	Supports proliferation and nitric oxide production

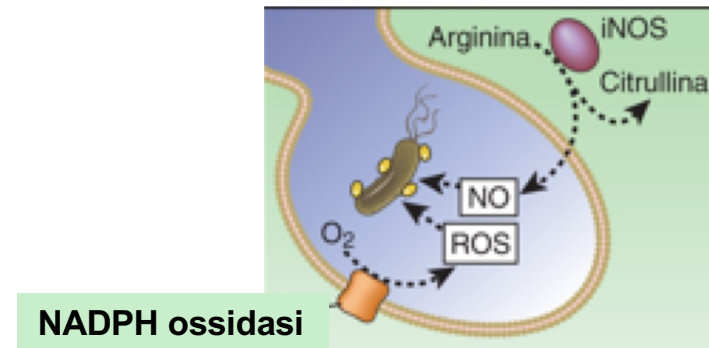
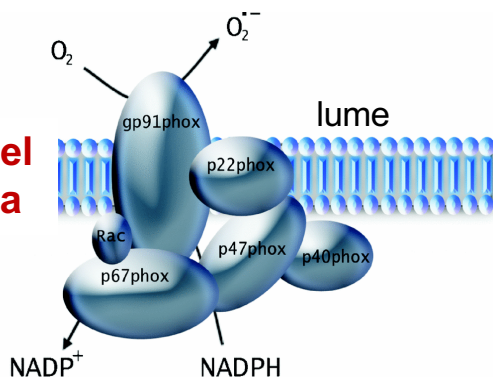


# PPP nei fagociti

- I **macrofagi (M1)** e **neutrofili** richiedono entrambe le funzioni dipendenti dal **NADPH**: rapida produzione di **ROS** per eliminare l'agente infettivo seguita dall'induzione di antiossidanti per prevenire danni eccessivi ai tessuti.
- Anche le **cellule dendritiche** utilizzano NADPH e poi la sintesi dei lipidi per supportare la sintesi del reticolo endoplasmatico, necessaria per l'attivazione e la secrezione di citochine.

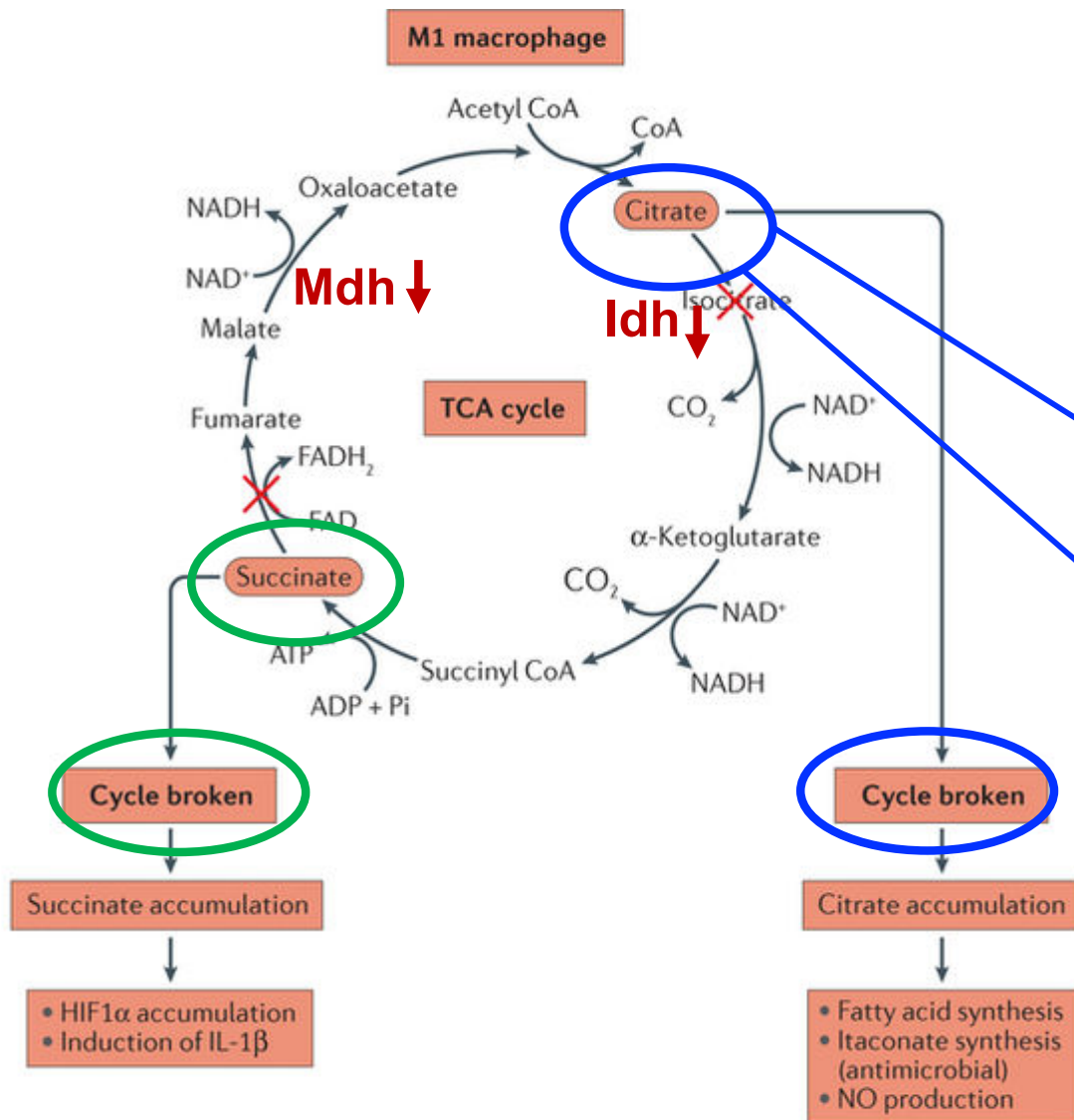


## Membrana del fagolisosoma





# TCA interrotto nei macrofagi M1

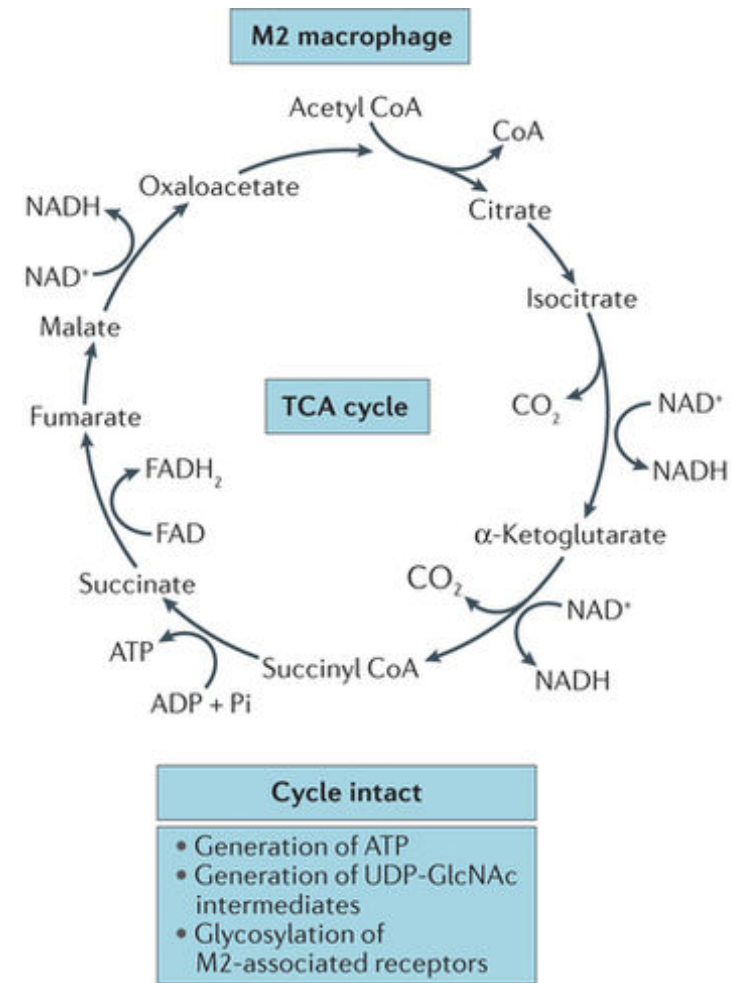


- Il **ciclo di Krebs** viene interrotto **dopo il citrato** (riduzione dell'isocitrato deidrogenasi, Idh) e **dopo succinato** (riduzione della malato deidrogenasi, Mdh).
- Il **citrato** si accumula nei macrofagi M1, viene esportato dai mitocondri tramite il trasportatore del citrato e utilizzato per la **produzione di acidi grassi**, che a loro volta vengono utilizzati per la **biogenesi delle membrane** (rilevante anche per le DC attivate).
- Il **citrato** è importante anche per generare **NO** e **prostaglandine**.
- Il **succinato** che si accumula nei macrofagi M1 stabilizza **HIF1α** e sostiene la **produzione di IL-1β**

# TCA nei macrofagi M2 non è interrotto



Pathways used:	
TCA cycle	Supports oxidative phosphorylation
Fatty acid oxidation	Promotes M2 phenotype by inhibiting inflammatory signals
Amino acid metabolism	Supports arginase pathway activity

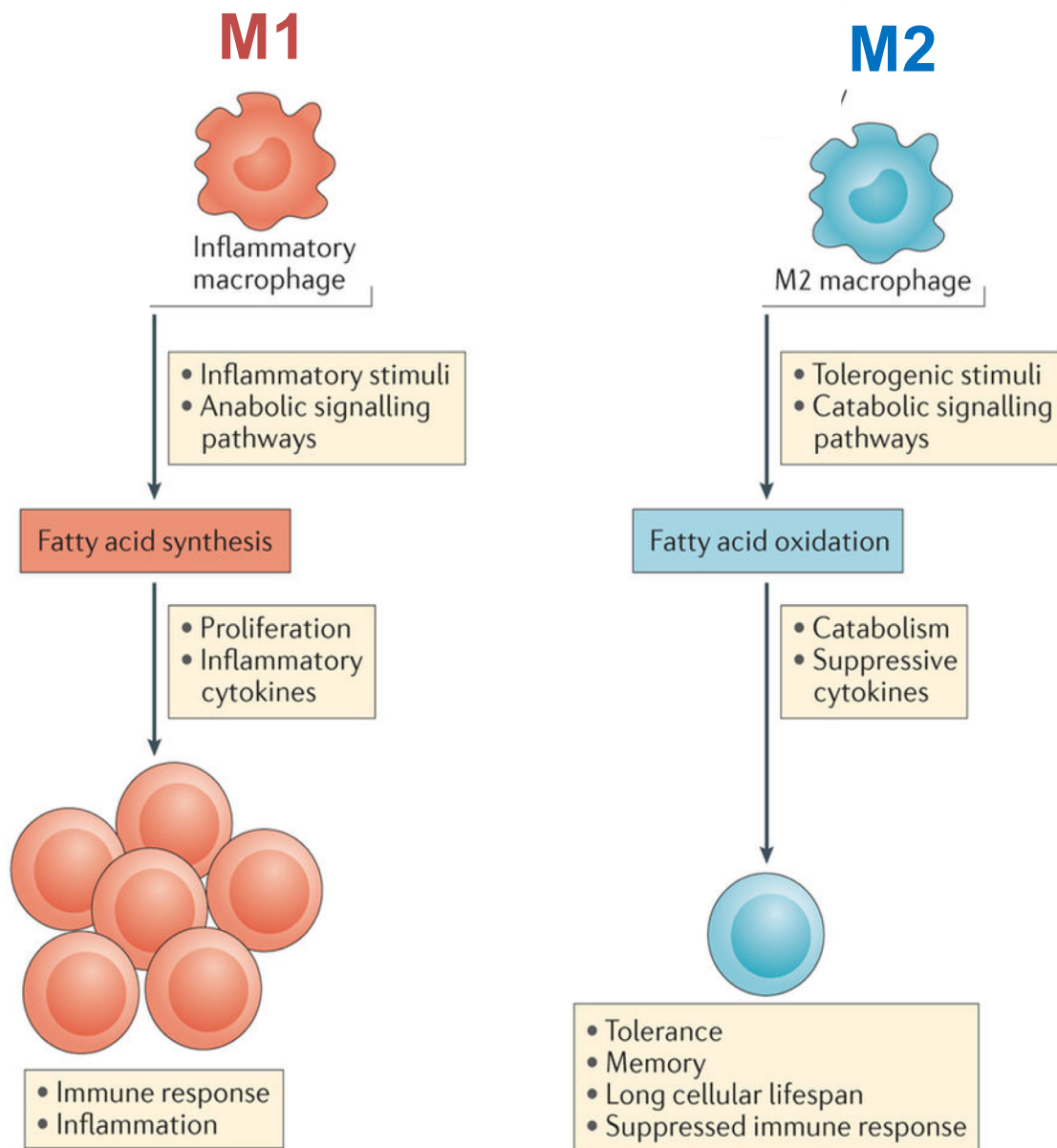


- Il **ciclo di Krebs è intatto** e si accoppia alla fosforilazione ossidativa ed è completo fornendo ATP (36 ATP).
- Intermedi (N-acetilglucosamina) necessari per la **glicosilazione dei recettori** associati a M2, come il **recettore del mannosio**.

L'**ossidazione degli acidi grassi** è utilizzata in molti tipi cellulari che **non** hanno una **natura pro-infiammatoria** e/o esibiscono **maggiore sopravvivenza**:

- macrofagi M2
- T regolatorie
- cellule T della memoria

# Metabolismo degli acidi grassi nei macrofagi

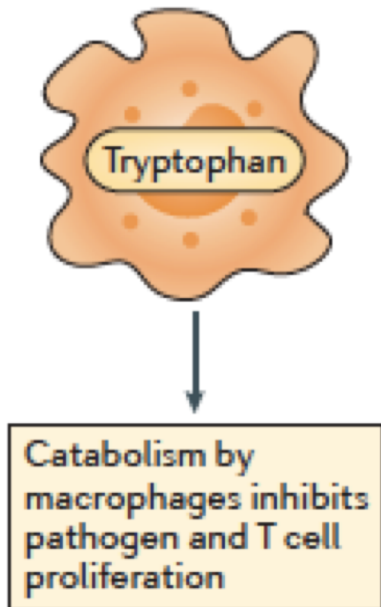


L'ossidazione degli acidi grassi è utilizzata preferenzialmente dai macrofagi M2 non infiammatori mentre la sintesi degli acidi grassi è caratteristica dei macrofagi M1 infiammatori.

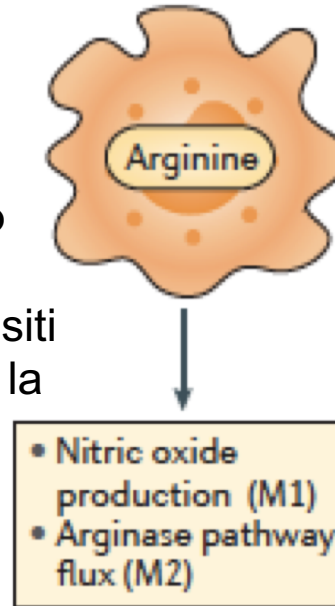
I macrofagi M2 si basano su un programma di ossidazione degli acidi grassi promosso da STAT6 attivato dalla IL-4 che induce inibizione delle funzioni infiammatorie.

I macrofagi M1 si basano sulla sintesi di acidi grassi che agiscono positivamente sulle funzioni pro-infiammatorie.

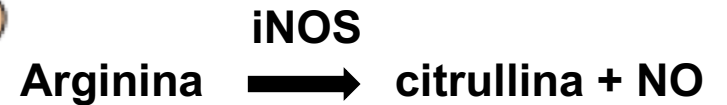
# Metabolismo degli aminoacidi nei macrofagi



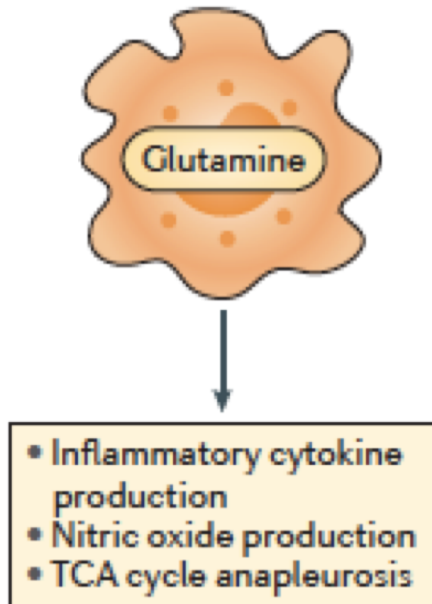
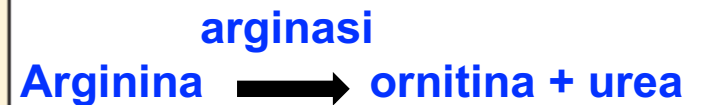
I **Macrofagi** producono l'enzima indoleamina-2,3-diossigenasi (**IDO**) che catabolizzando il **triptofano** in kinurenina previene crescita batterica e di parassiti patogeni ma inibisce anche la proliferazione dei linfociti T.



Nei macrofagi infiammatori **M1**:



Nei macrofagi tollerogenici **M2**



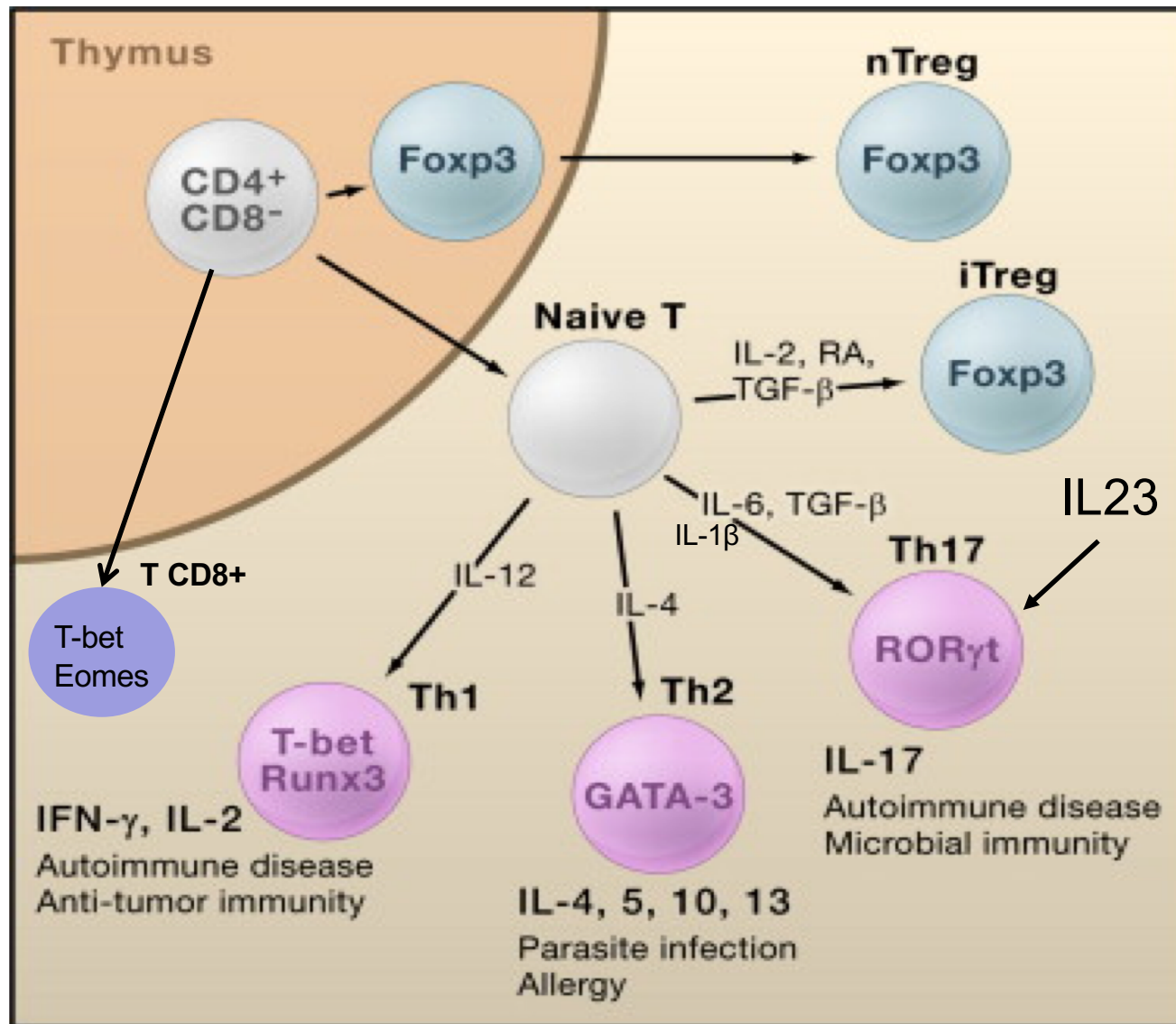
**Macrofagi M1: IL-1 $\beta$  e NO**

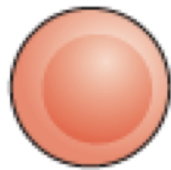
**M2 macrophages:** la glutamina entra nel **TCA** e favorisce la polarizzazione M2 indotta dalla IL4.

Il metabolismo degli aminoacidi ha un ruolo importante per la funzionalità del sistema immunitario innato e adattativo. Nei macrofagi, gli aminoacidi glutamina e arginina sono fondamentali per le funzioni immunitarie compresa la produzione di citochine e ossido nitrico.

Il destino dell'arginina nei macrofagi è assolutamente distinto tra i fenotipi cellulari infiammatori (M1) e tollerogenici (M2). Il metabolismo del triptofano dei macrofagi può sopprimere l'attività del sistema immunitario adattativo.

# Subset linfocitari T





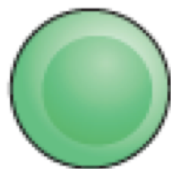
Effector T cell

Pathways used:	
Glycolysis	Supports proliferation and inflammatory cytokine production
Fatty acid synthesis	Promotes proliferation and regulates cytokine production
Amino acid metabolism	Promotes proliferation and effector cell differentiation



Regulatory T cell

Pathways used:	
TCA cycle	Associated with suppressive function
Fatty acid oxidation	Promotes generation of T <sub>reg</sub> cells and linked to tolerogenic stimuli



Memory CD8<sup>+</sup> T cell

Pathways used:	
TCA cycle	Associated with memory cell phenotype
Fatty acid oxidation	Promotes memory cell generation and survival

## Metabolismo nelle cellule T

Le cellule T effettrici rapidamente proliferanti, tra cui T helper: **Th1**, **Th17** e cellule **T CD8+ citotossiche**, utilizzano la **glicolisi**, la **sintesi degli acidi grassi** e il **metabolismo degli amminoacidi** per promuovere la proliferazione e la produzione di citochine.

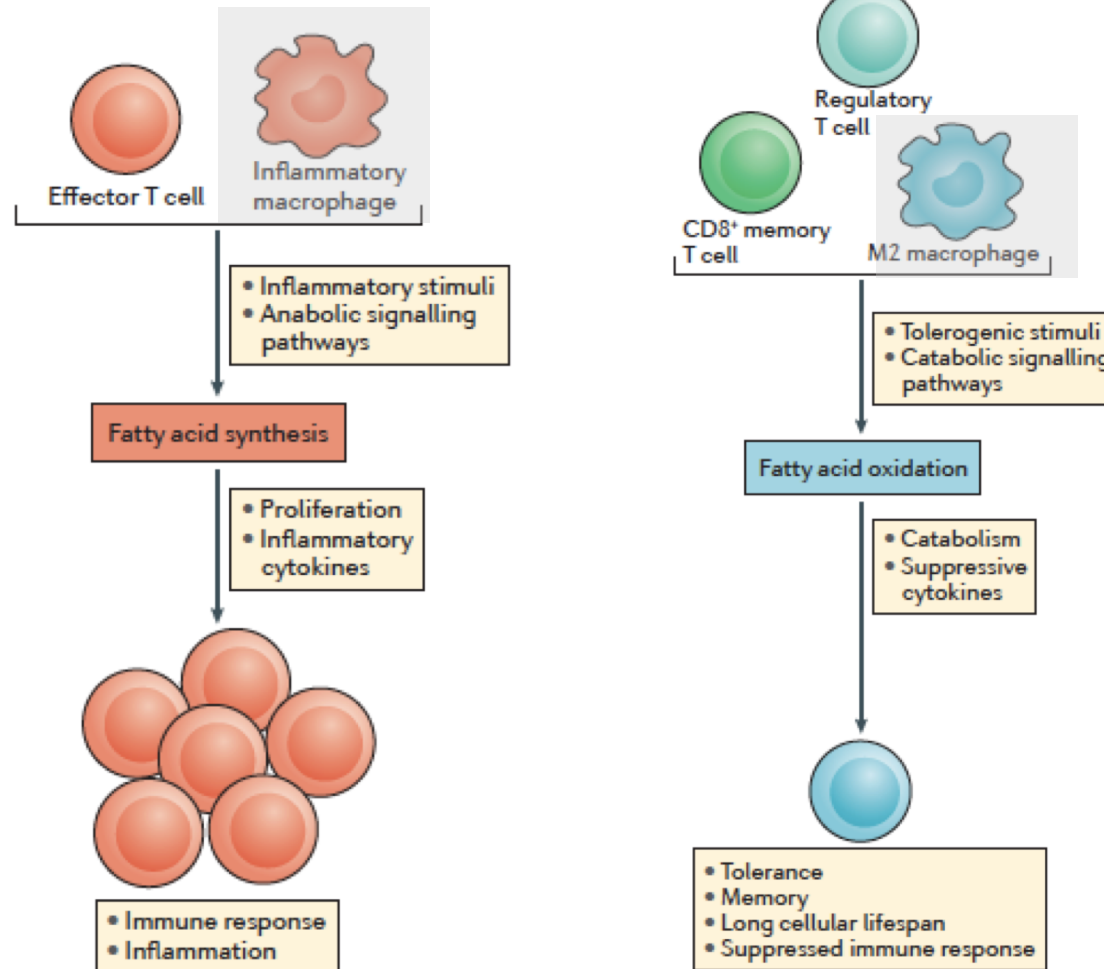
Le cellule T regolatorie(**Treg**) immunosoppressive utilizzano il ciclo TCA e l'ossidazione degli acidi grassi.

Allo stesso modo, anche **le cellule T CD8+ di memoria** richiedono l'uso del ciclo TCA e l'ossidazione degli acidi grassi per promuovere una maggiore sopravvivenza della cellula.

# Sintesi vs ossidazione degli acidi grassi

L'equilibrio tra linfociti T effettori e regolatori è influenzato dalla **sintesi degli acidi grassi**.

La sintesi degli acidi grassi è necessaria per una corretta differenziazione dei linfociti Th ma non per la generazione e la funzione delle cellule Treg.



I segnali infiammatori guidano la sintesi degli acidi grassi, importanti per la proliferazione delle c. immunitarie e la produzione di citochine infiammatorie. Al contrario, gli stimoli tollerogenici del s. immunitario guidano l'ossidazione degli acidi grassi, necessaria per la produzione di citochine soppressive che portano alla tolleranza e all'inibizione dell'infiammazione. I linfociti T effettori mostrano una maggiore sintesi di acidi grassi necessari per la loro crescita. Le cellule T di memoria effettuano l'ossidazione degli acidi grassi, che limita la loro crescita e consente loro di persistere.

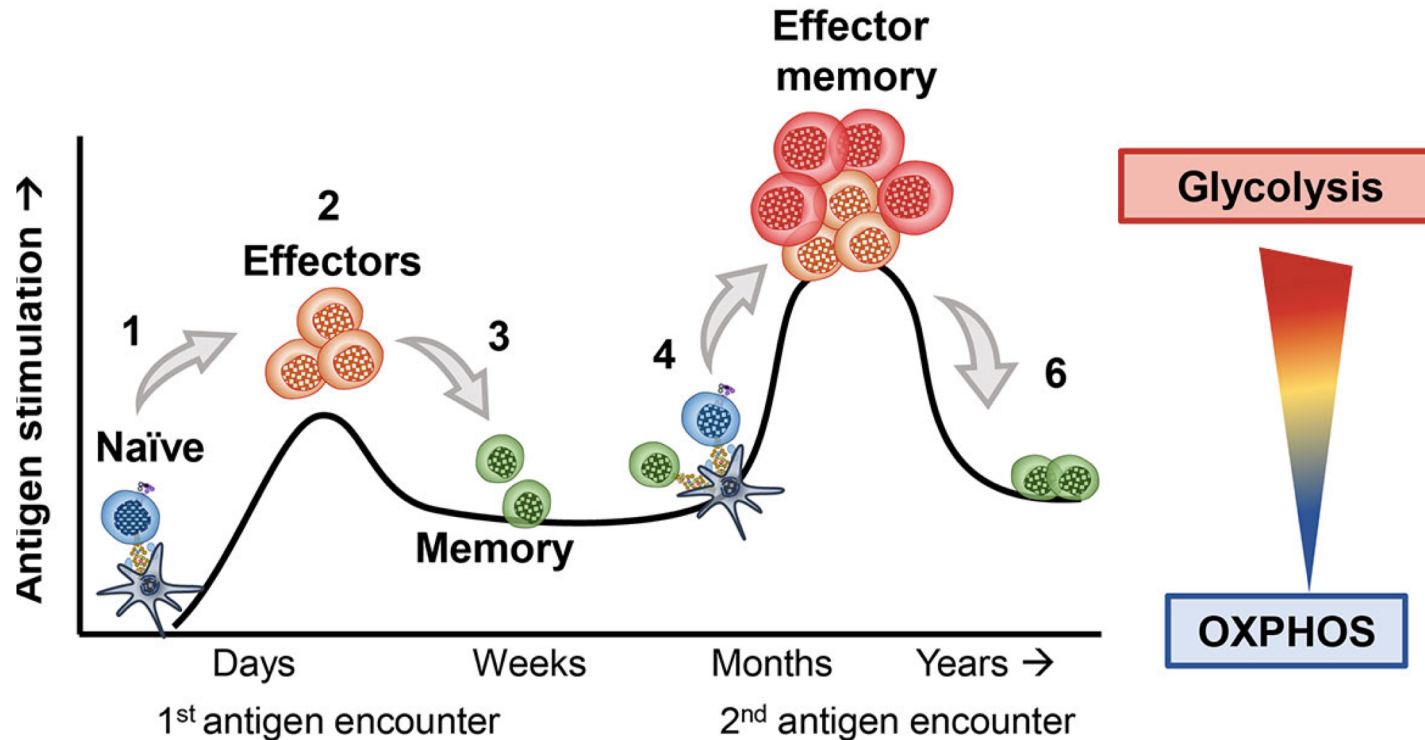
L'ossidazione degli acidi grassi regola l'equilibrio tra i linfociti T effettori pro-infiammatori e i Treg soppressori.

L'ossidazione degli acidi grassi promuove la generazione di cellule Treg mentre inibisce la polarizzazione delle cellule T effettrici.

Anche l'ossidazione degli acidi grassi gioca un ruolo importante nella generazione e nel mantenimento di cellule T CD4 + e CD8 + di memoria a lunga vita.



# Metabolic requirements of T cells at various stages of differentiation



1) Naïve T cells breakdown glucose and efficiently break it down through the tricarboxylic acid (TCA) cycle and oxidative phosphorylation (OXPHOS) to survive, until they encounter their antigen. 2) Upon a primary exposure to antigen, naïve T cells differentiate into effector T cells. As effectors they shift towards the use of amino acids as well as glucose, both required for their proliferation and cytolytic activity. 3) After clearing their inciting antigen, many effector T cells die. However, a fraction of surviving T cells can form memory T cells, which adapt towards improved mitochondrial biogenesis and OXPHOS. 4) These memory T cells can survive for many months to years until they encounter a similar antigen. 5) If these memory T cells re-encounter the same antigen, they rapidly become effectors and more efficiently engage in glycolysis and amino acid usage to robustly proliferate and secrete cytokines. 6) The T cells that survive maintain their usage of OXPHOS to persist long-term within hosts.