

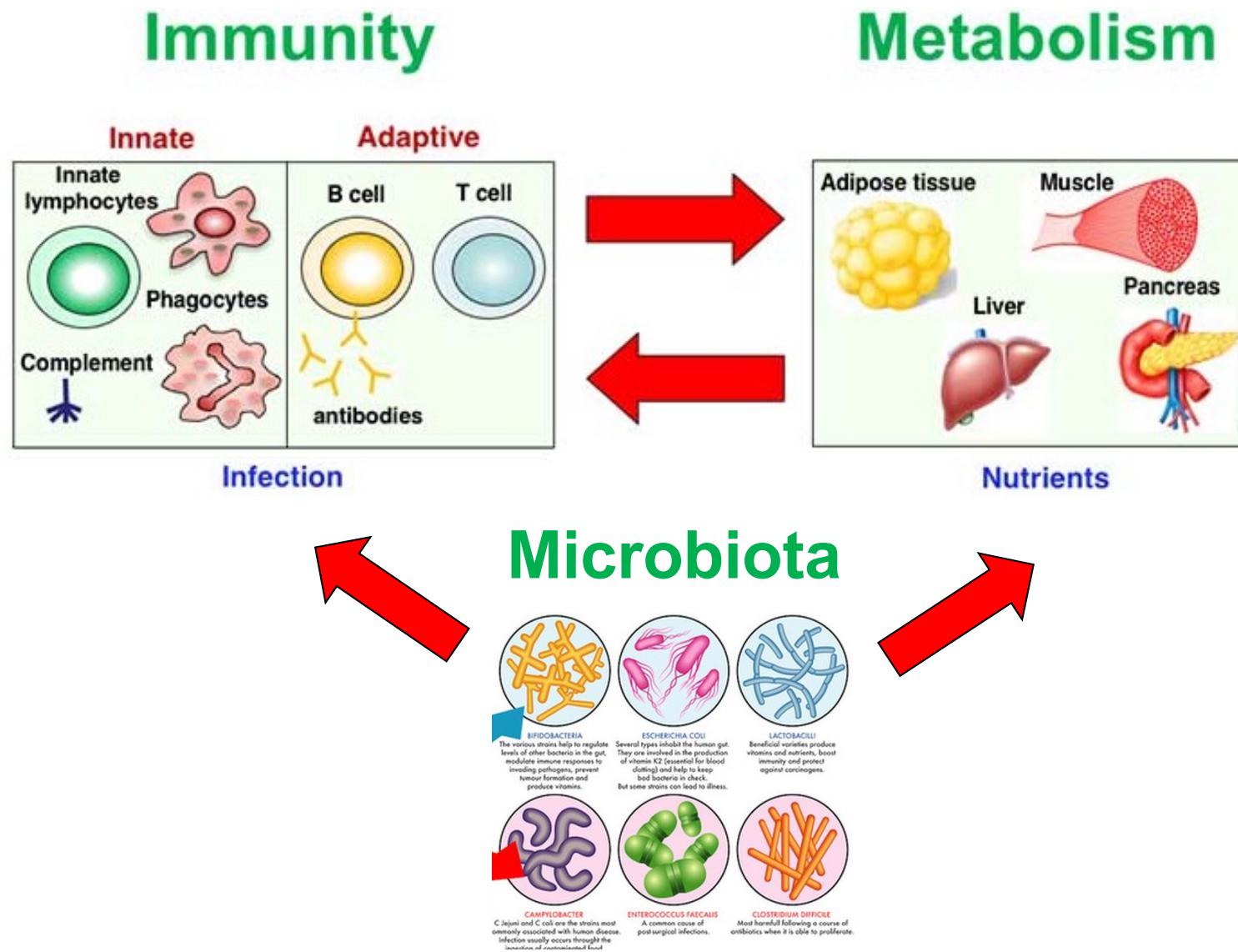
Codice OPIS 2024-25

**5BFXX9D8**

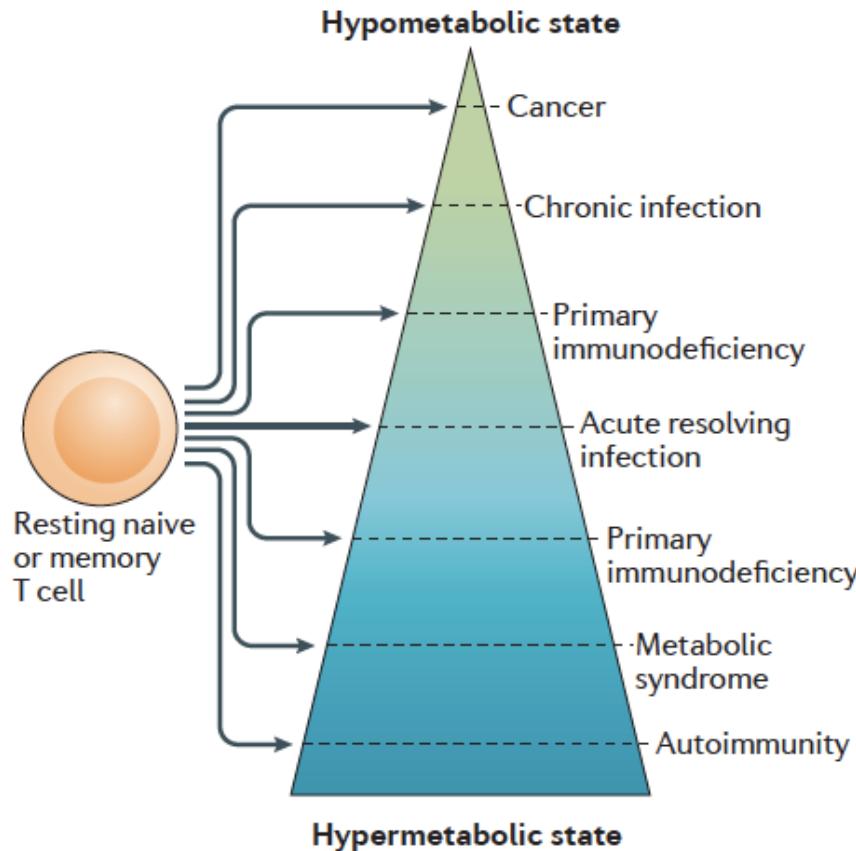
MECCANISMI CELLULARI E MOLECOLARI  
DELLA RISPOSTA IMMUNE (1047783)

SCIENZE BIOLOGICHE (30857)

# Immunometabolismo



# 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.

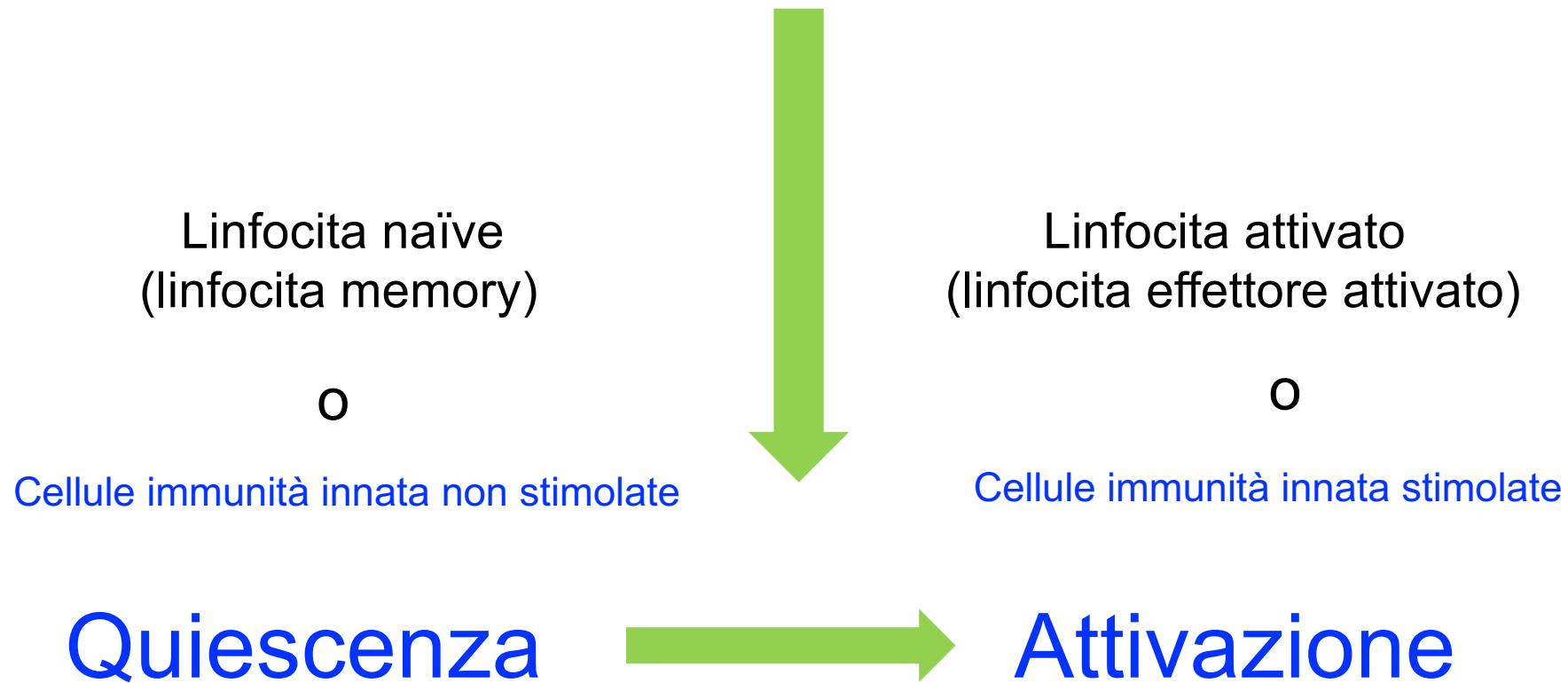
I linfociti T naive e *memory* quiescenti si basano principalmente sul catabolismo del glucosio e degli *acidi grassi*, rispettivamente, per mantenere le funzioni "housekeeping", la generazione di energia e la sopravvivenza. Le cellule T effettivi attivate aumentano rapidamente sia le vie anaboliche 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 sistematici e locali.

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

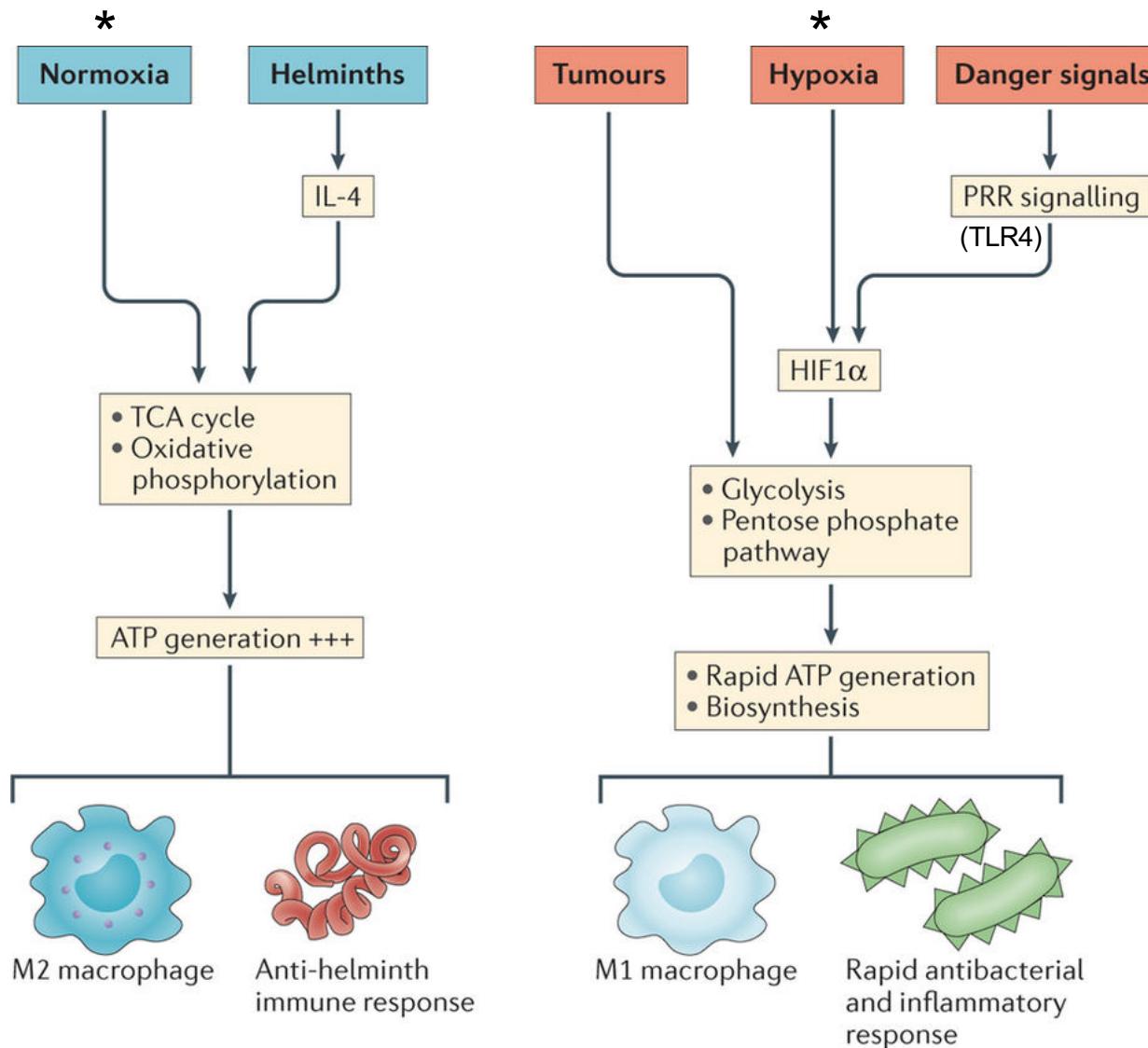
Lo **stato ipermetabolico** copre uno spettro di malattie in cui il metabolismo delle cellule T patogene è sbilanciato verso un maggiore consumo di "biocarburante" e biosintesi, **in parte a causa dell'aumentata disponibilità di nutrienti e dei deficit nelle vie tollerogeniche**.

Al contrario, lo **stato ipometabolico** copre una serie di malattie in cui le cellule T effettivi 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 disegolata 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 effettive 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**

HIF1 $\alpha$  = hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$

# Effetto Warburg o glicolisi aerobica

opzione metabolica caratteristica delle cellule tumorali

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.

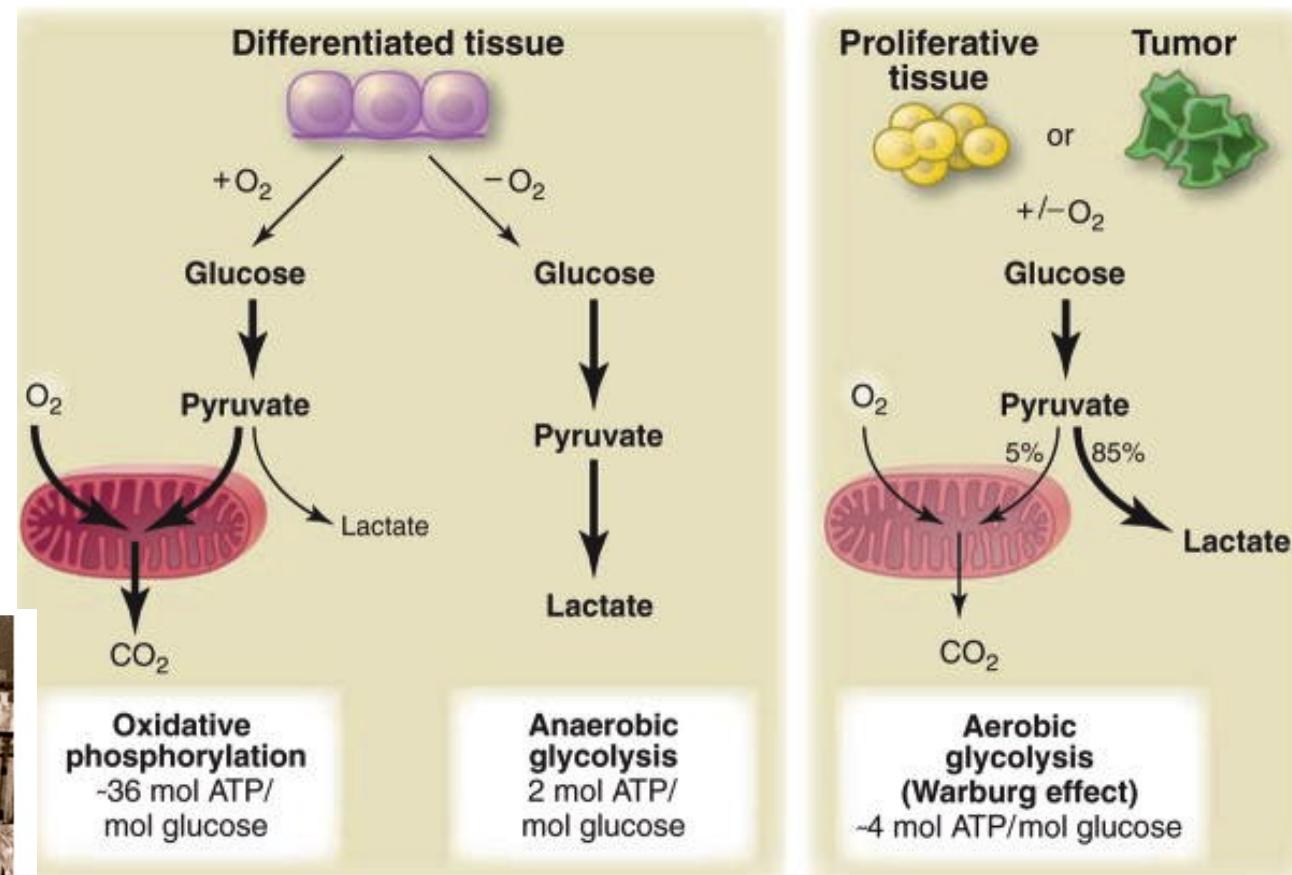
## Glicolisi aerobica o aerobia

**Vantaggi:** produzione più rapida di ATP e aumento della produzione di **intermedi** per la sintesi di macromolecole (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.

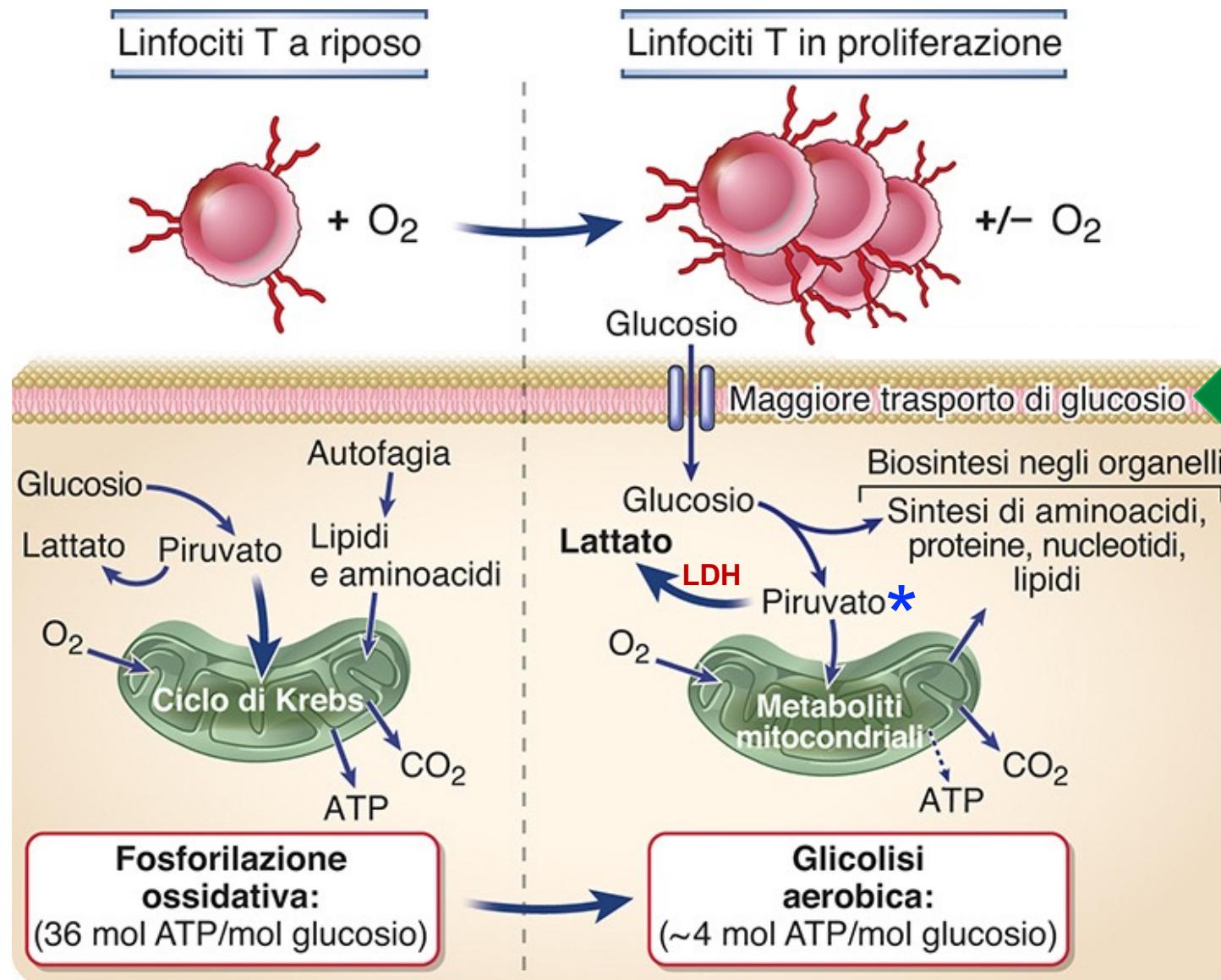


Nature Reviews | Cancer

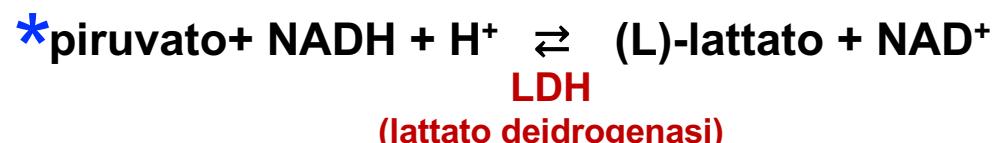


**Otto Warburg** medico e fisiologo tedesco, vince il premio Nobel per la Medicina nel 1931 per aver descritto per la prima volta il processo della glicolisi aerobica nelle cellule tumorali

# 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.



1 molecola di glucosio → GLICOLISI → 2 molecole di ATP

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

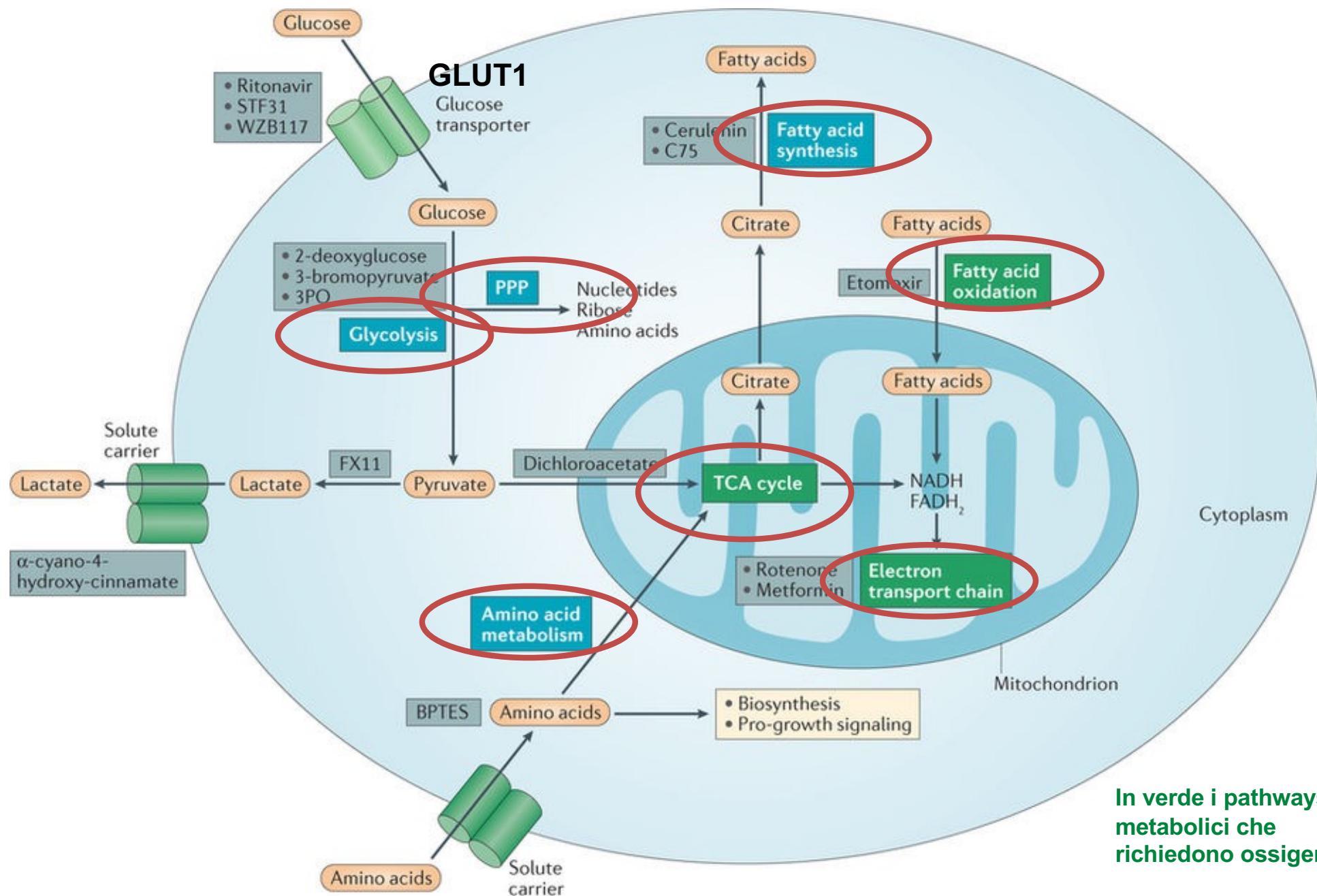
## Rapido aumento della glicolisi nei:

- Macrfagi e cellule dendritiche (DC) attivati da LPS
- Linfoцитi Th effettori (Th1; Th17 e Th2) **non** nei Treg
- Cellule NK attivate
- Linfoцитi T CD8+ effettori

**Glicolisi correla con una rapida attivazione**

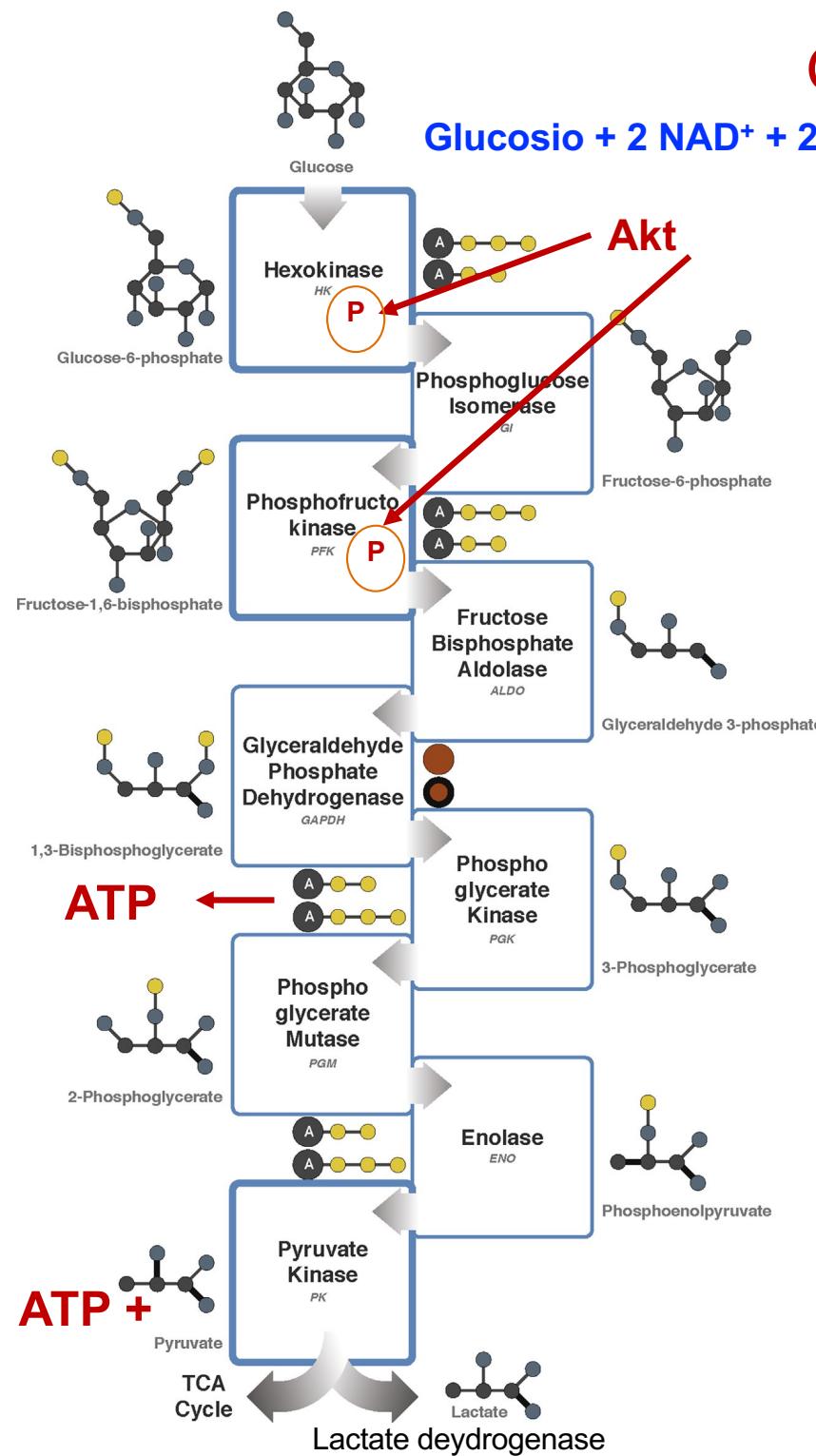
in risposta a stimolazione dei PRR, stimolazione antigenica  
e citochinica

# Maggiori pathways metabolici



In verde i pathways metabolici che richiedono ossigeno

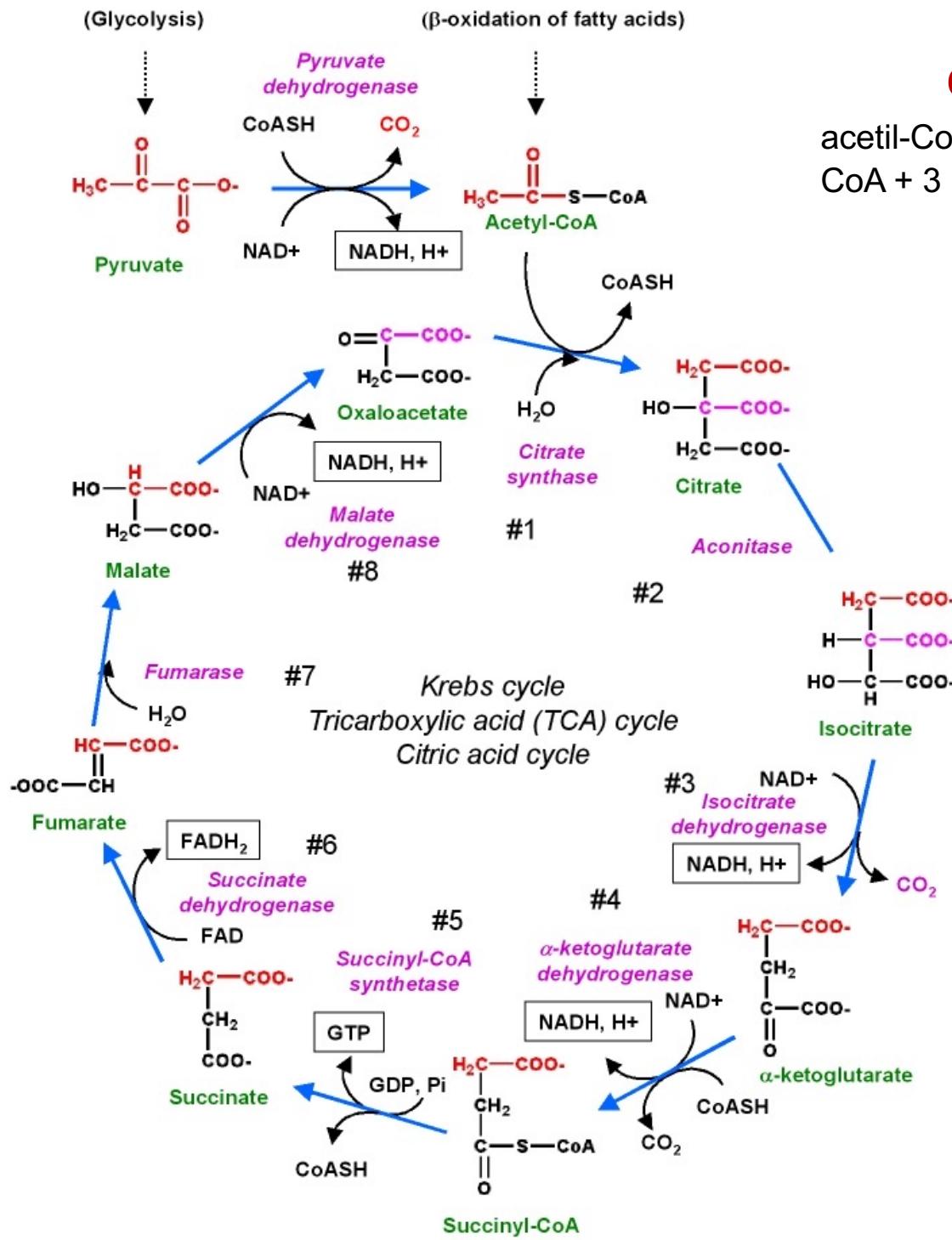
# Glycolysis



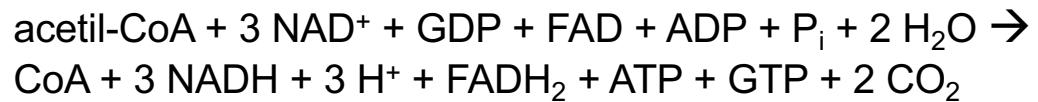
1. **Hexokinase (HK2)** phosphorylates **glucose** to glucose 6-phosphate that is converted to fructose 6-phosphate by phosphoglucomutase (PGM)
2. **Phosphofructokinase (PFKFB3)** phosphorylates fructose 6-phosphate > fructose 1,6-bisphosphate that is converted to glyceraldehyde 3 phosphate by fructose bisphosphate aldolase (ALDO)
3. **Glyceraldehyde 3 phosphate dehydrogenase (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.

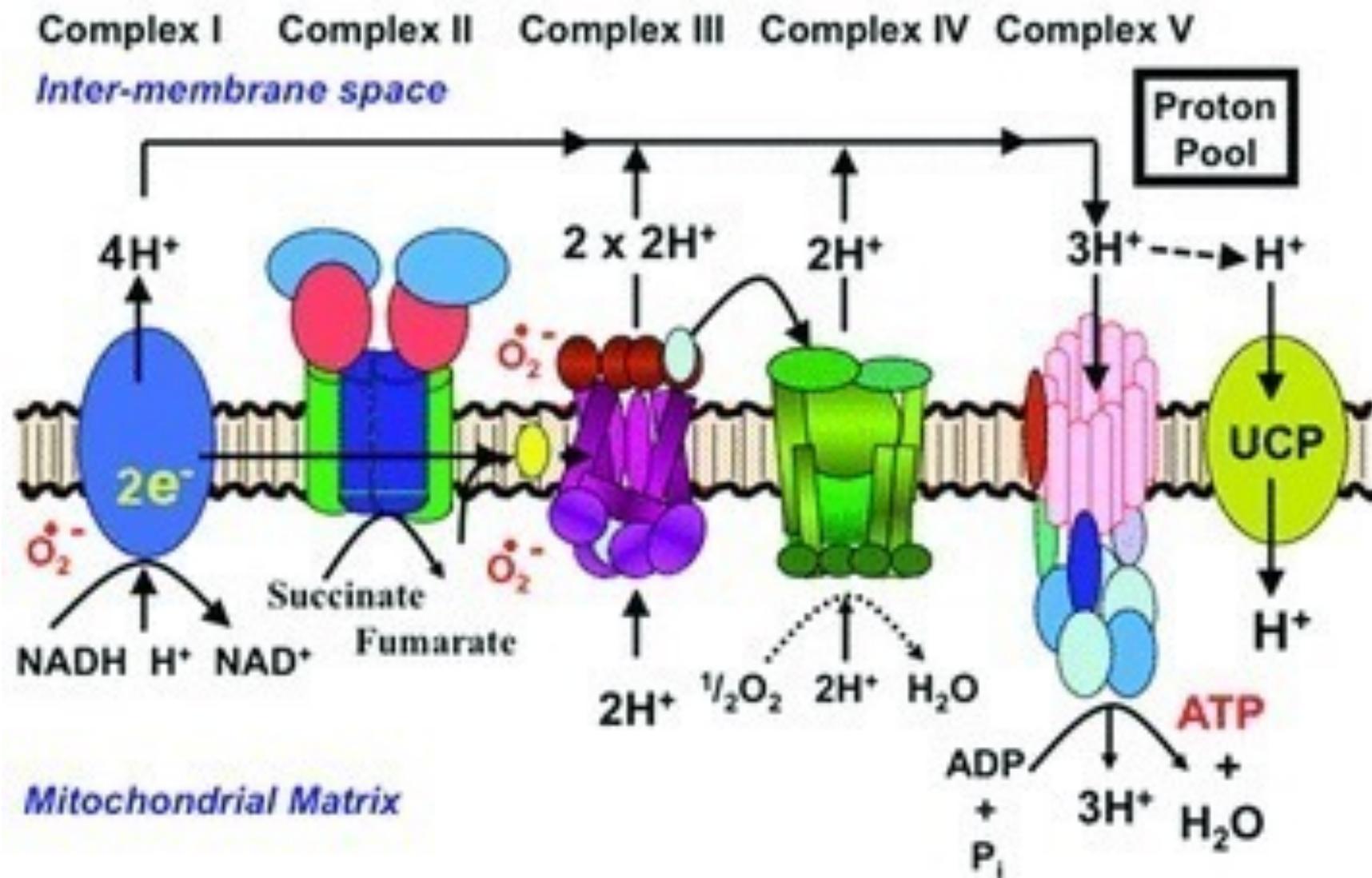
Pathway principale per cellule quiescenti (non proliferanti) che genera:

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

## Associato ad energia e longevità

# Oxidative Phosphorylation

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

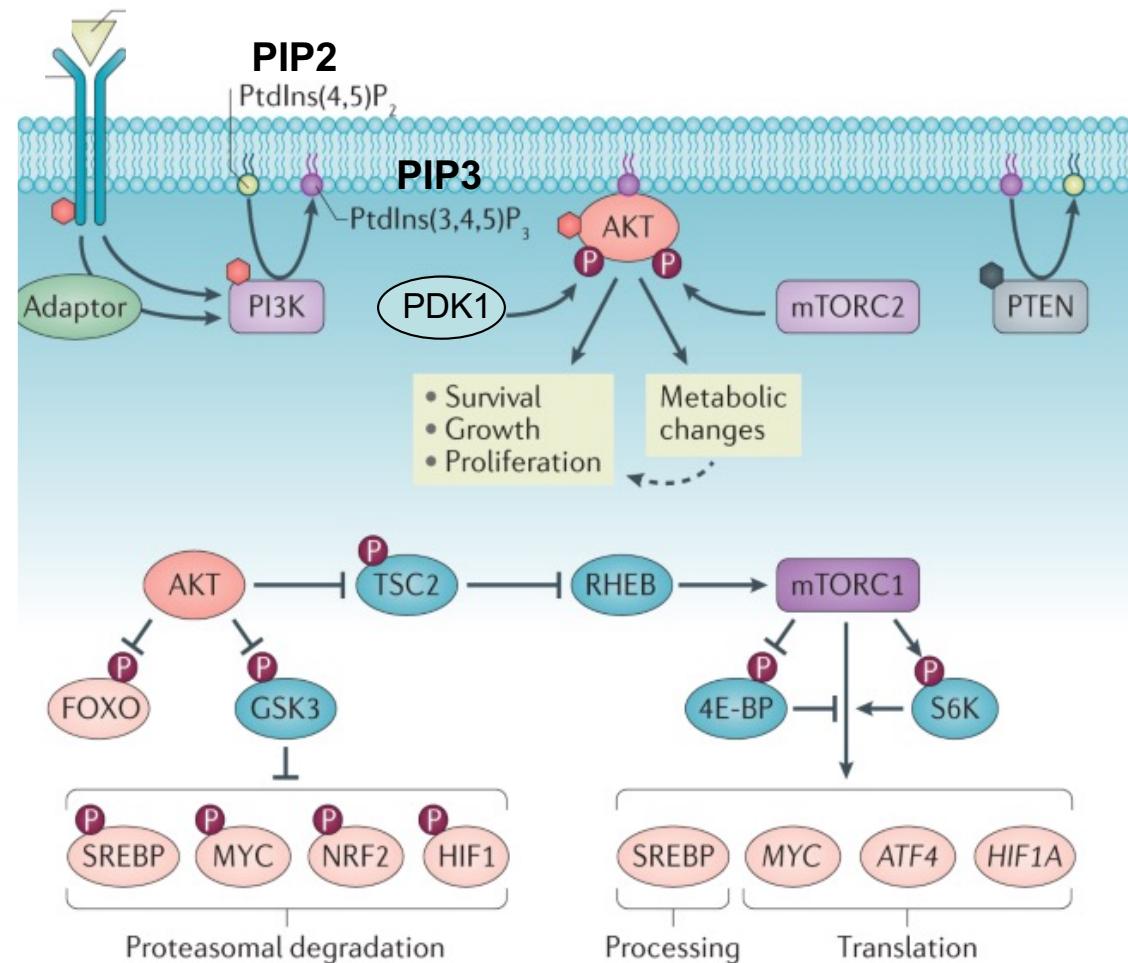


# PI3K-Akt e glicolisi

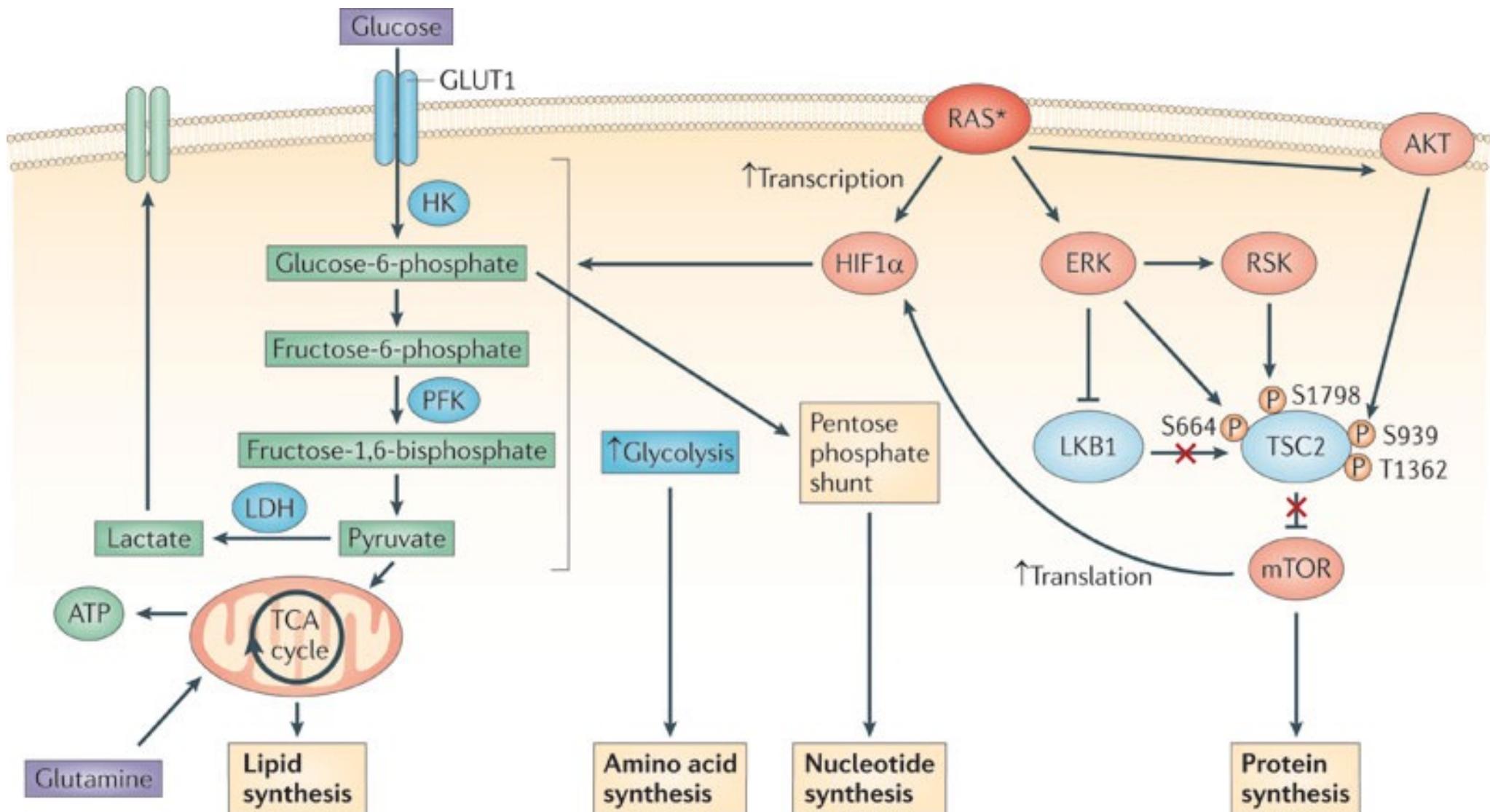
**PI3K-Akt** è una delle vie di segnalazione più comunemente attivate da diversi recettori immunitari che attivando **mTORC1** induce la biosintesi di proteine e lipidi e la crescita cellulare in risposta a condizioni nutritive ed energetiche sufficienti

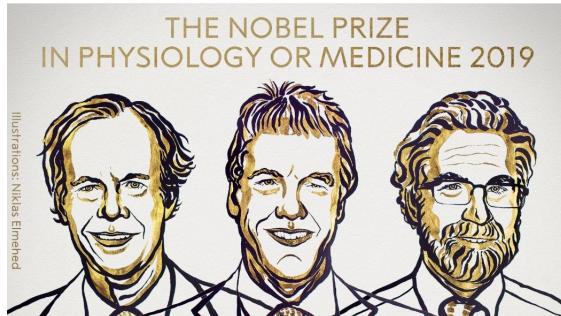
## Akt stimola la glicolisi:

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



# Regolazione del metabolismo del glucosio

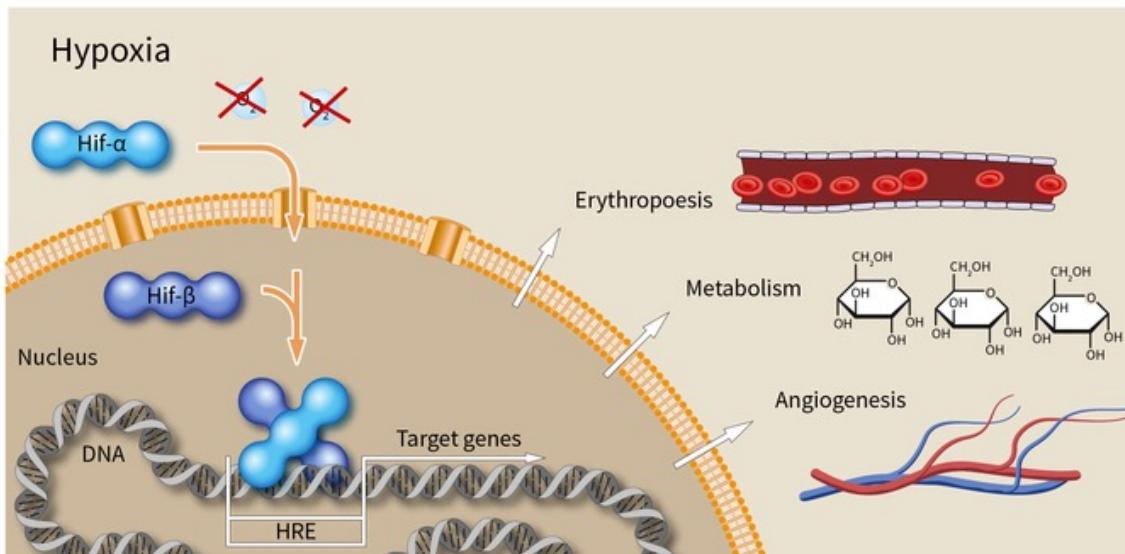
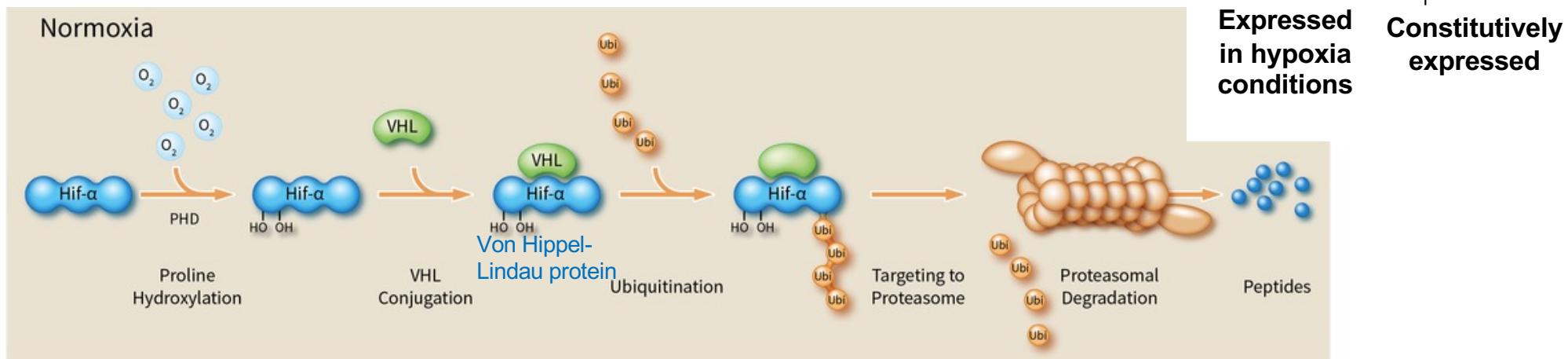




# Nobel Prize in physiology and medicine 2019:

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

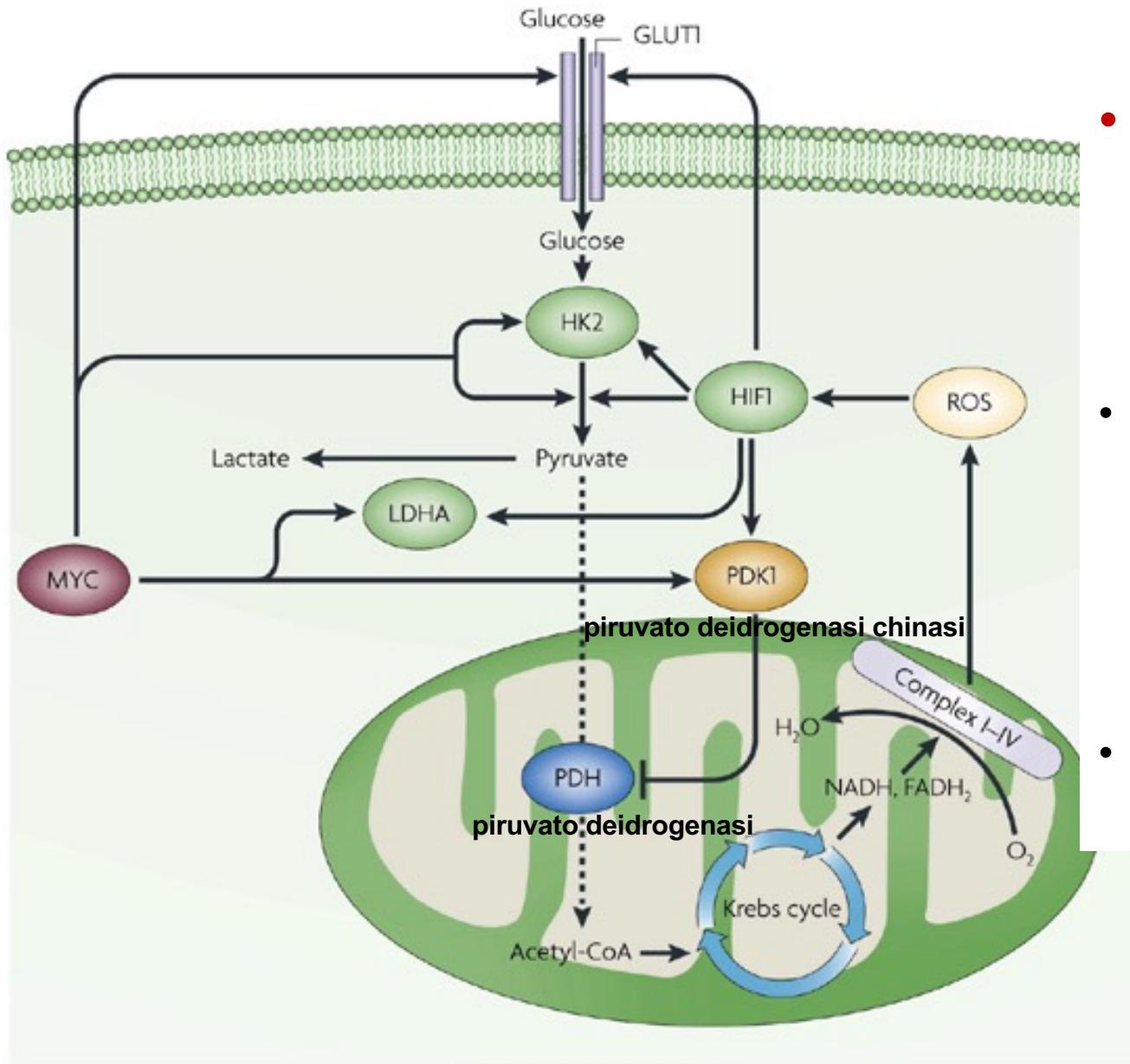
KEY FACTOR = the transcription factor **HIF1** (**HIF1 $\alpha$**  + **HIF1 $\beta$** )



- |   |  |
|---|--|
|  | Hypoxia-inducible factor alpha subunit   |
|  | Hypoxia-inducible factor beta subunit<br>= Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear<br>Translocator, ARNT |
| PHD   | Prolyl Hydroxylase Domain protein  |
|  | von Hippel-Lindau protein  |
|  | Ubiquitin  |
|  | Hypoxia response element   |

# HIF1 is induced by hypoxia

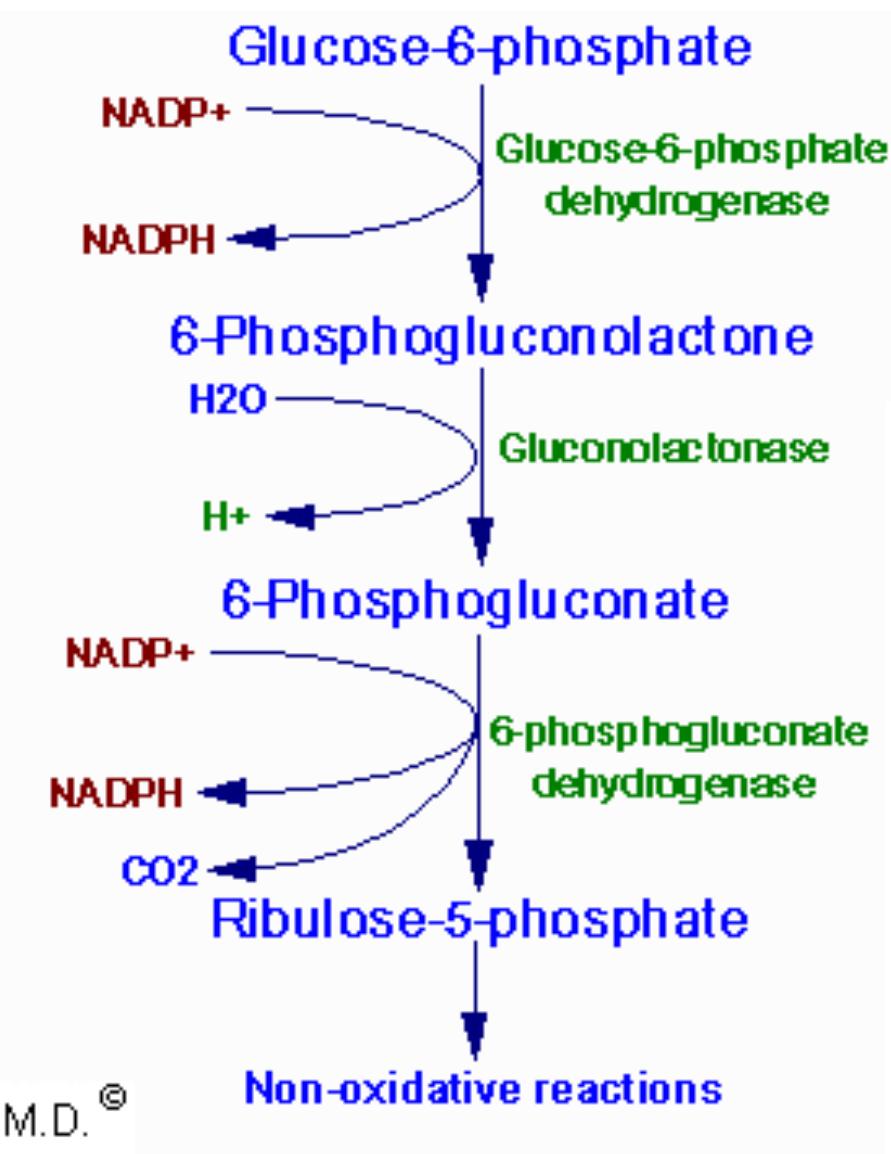
# HIF1 (hypoxia-inducible factor 1) potenzia la glicolisi



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

# Pentose Phosphate Pathway (PPP)

Oxidative stages of PPP



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**

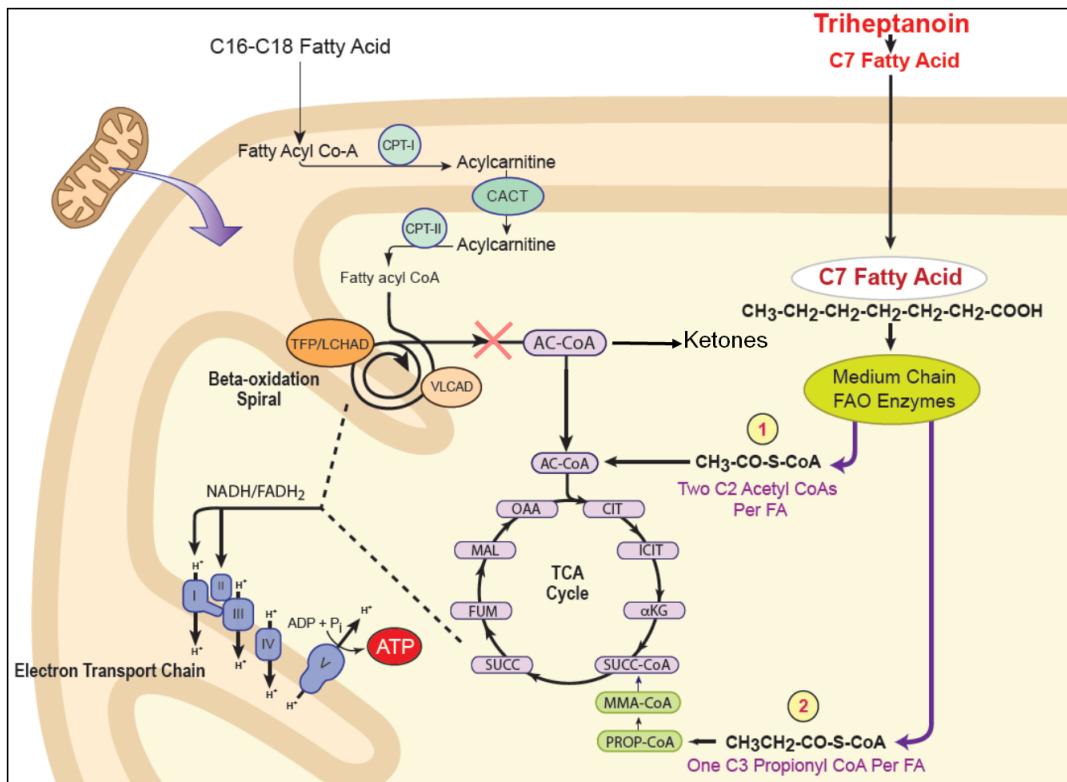
**NADPH:** Cofattore cruciale che fornisce **potere riduttore** in molte reazioni enzimatiche per la biosintesi macromolecolare.

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

Potere riduttore per i sistemi del **glutathione** (GSH) e della **tioridossina** (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 glutathione 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:

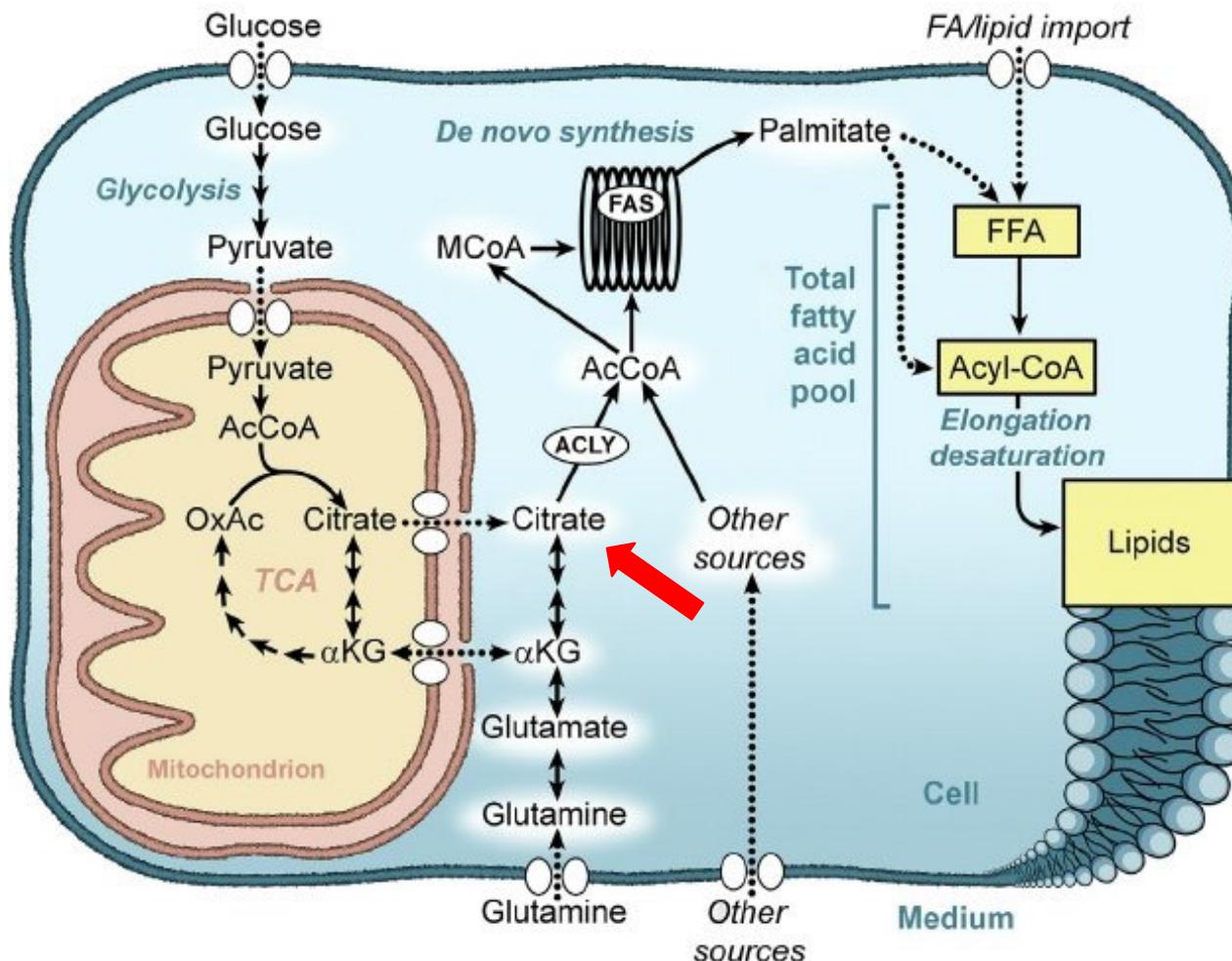
- Energia (**acil-CoA inclusa**)
- **NADH**
- **FADH<sub>2</sub>**

→ **ATP**

- 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.

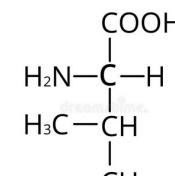


La sintesi di acidi grassi a catena lineare utilizza prodotti derivati dal ciclo dei TCA.

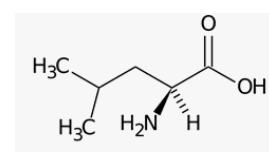
1. Il **citrato** derivato dal ciclo TCA può essere esportato dai mitocondri nel citosol dove l'ATP citrato liasi lo converte in acetil-CoA.
2. Il derivato dell'acetil-CoA è carbossilato dall'acetil-CoA carbossilasi in malonil-CoA.
3. La sintesi degli acidi grassi allunga la catena nascente degli acidi 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 amminoacidi 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 utilizzati attraverso varie vie metaboliche per supportare la **proliferazione cellulare e la crescita anabolica**.

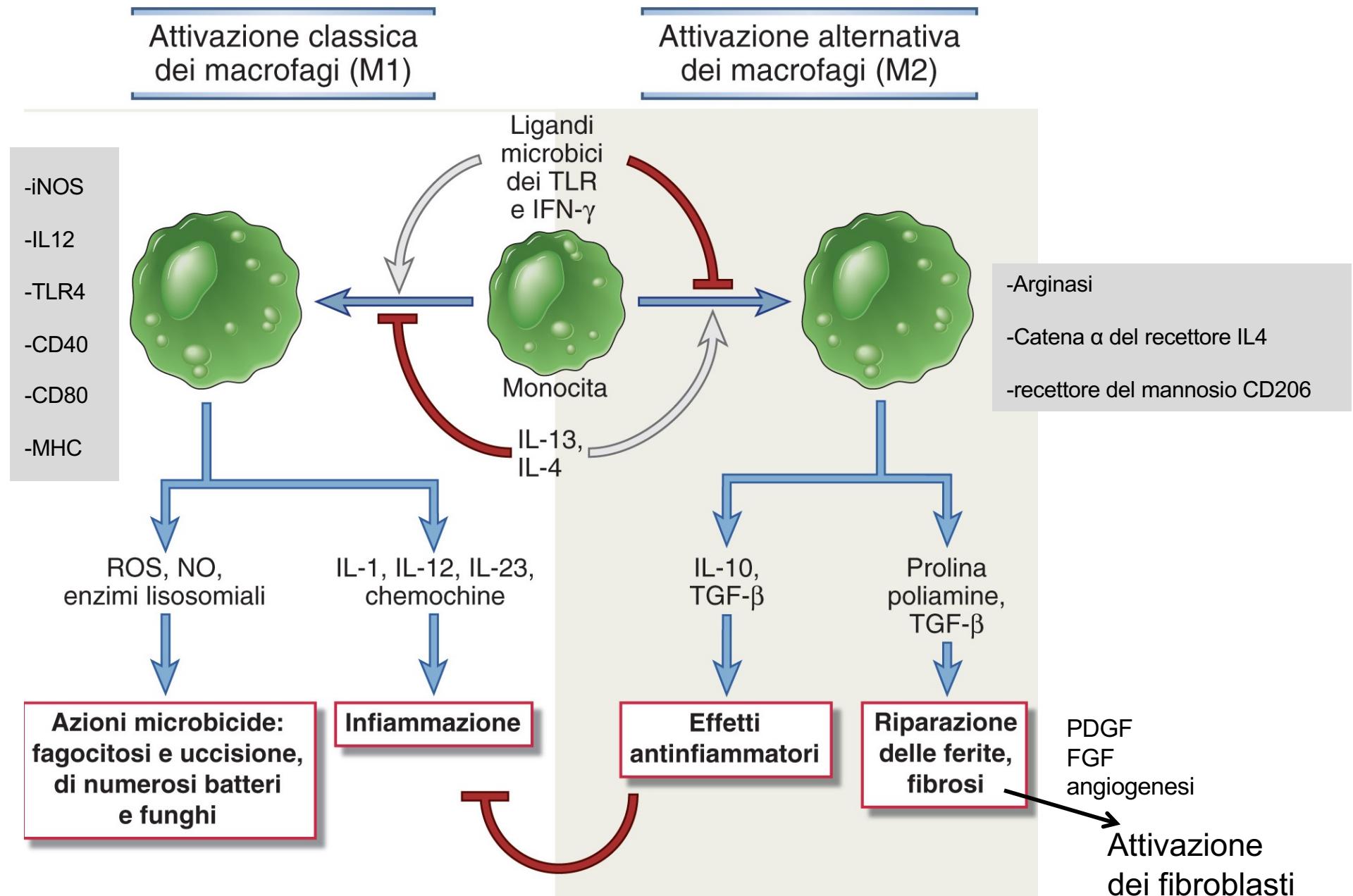
## Rapido aumento della glicolisi nei:

- Macrfagi e cellule dendritiche (DC) attivati da LPS
- Linfoцитi Th effettori (Th1; Th17 e Th2) **non** nei Treg
- Cellule NK attivate
- Linfoцитi T CD8+ effettori

**Glicolisi correla con una rapida attivazione**

in risposta a stimolazione dei PRR, stimolazione antigenica  
e citochinica

# Attivazione dei macrofagi: classica vs alternativa

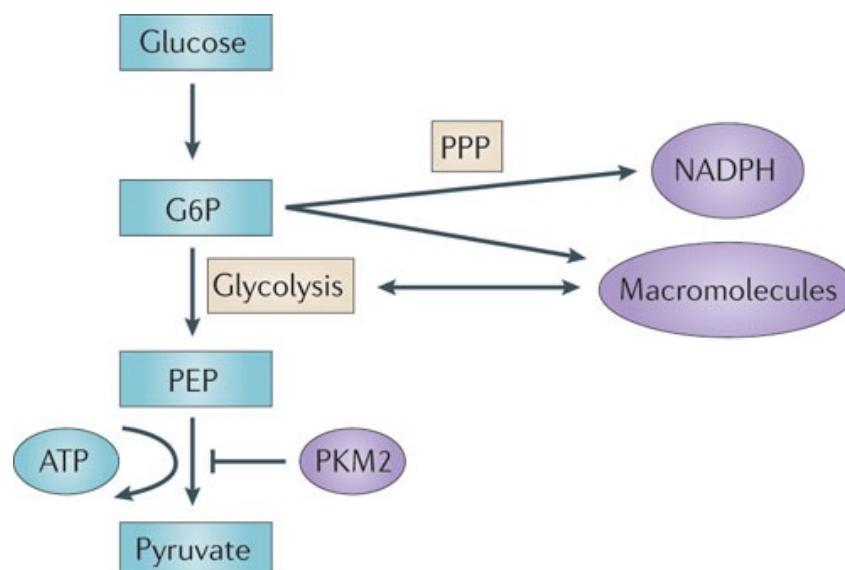




Inflammatory  
M1 macrophage

**Pathways used:**

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



**Macrofago M1  
attivato**

**glucosio**

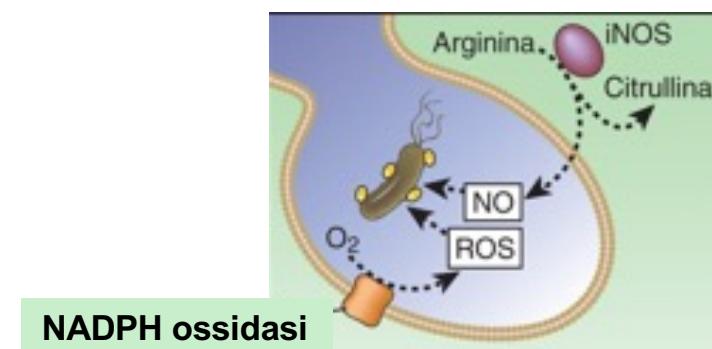
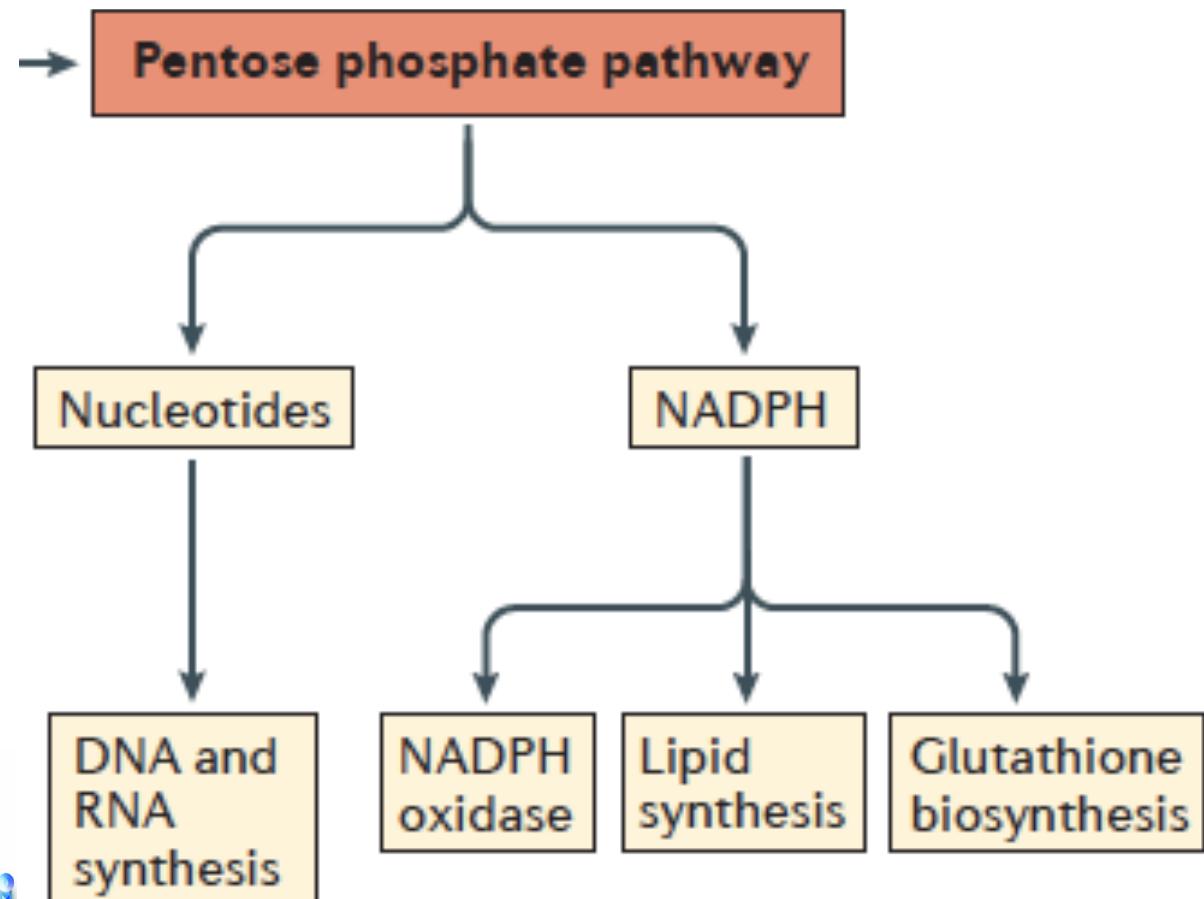
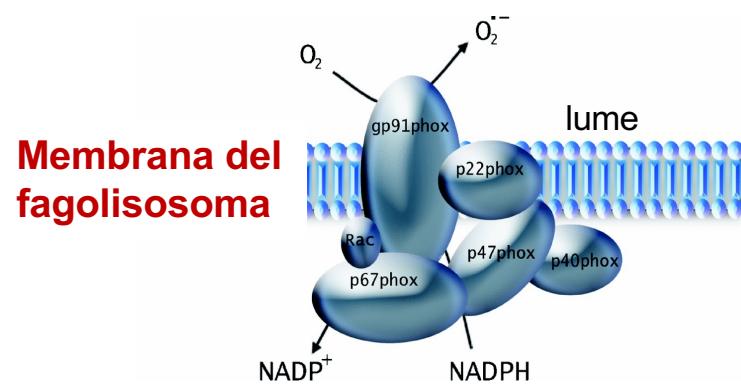
## Glicolisi nei macrofagi M1

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

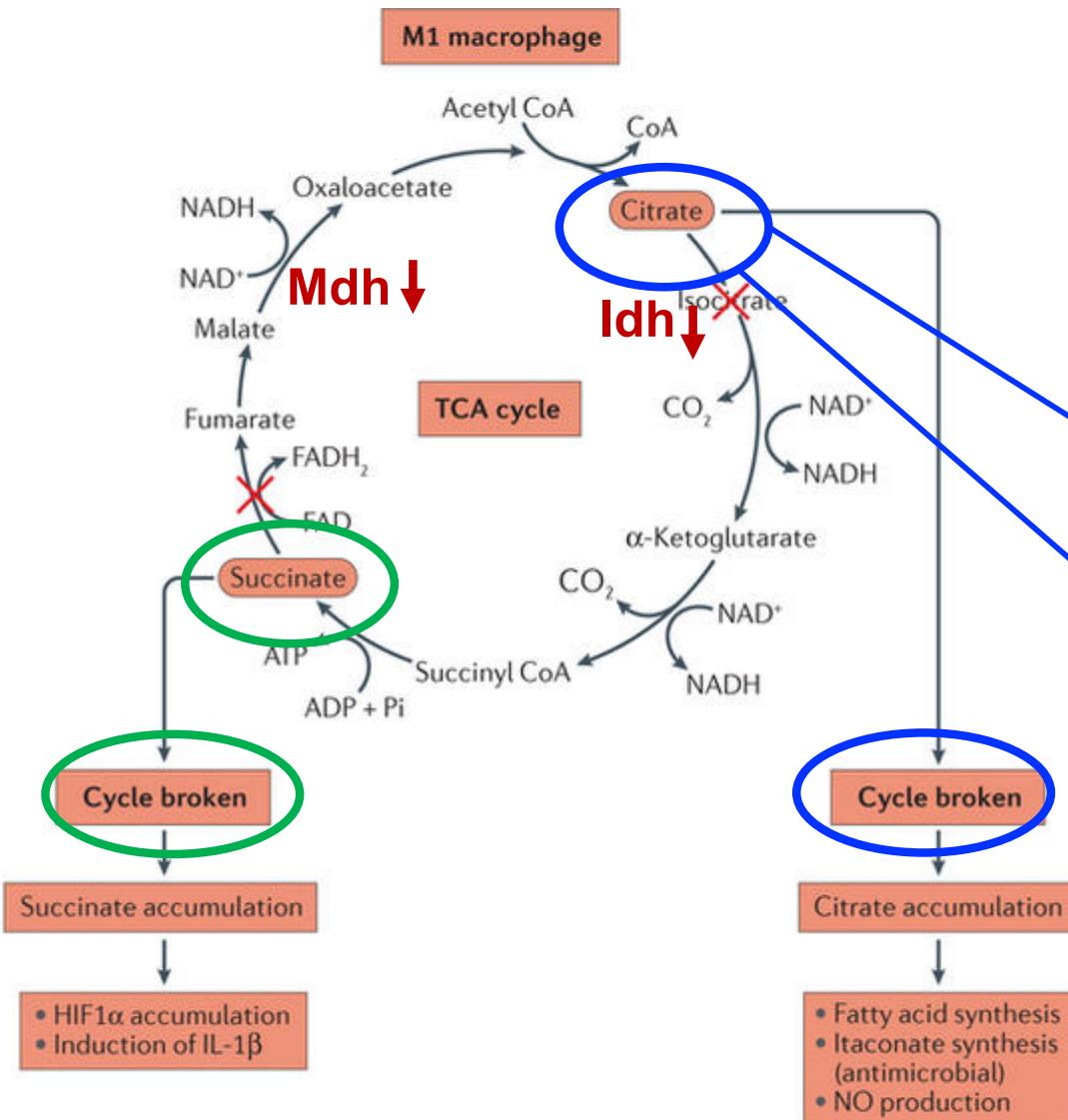
- favorire l'attivazione di **HIF1 $\alpha$**  che a sua volta induce gli **"HIF1 $\alpha$ -dependent genes"** inclusi enzimi glicolitici e fattori pro-infiammatori, come IL-1 $\beta$ .
- induce l'attivazione di **NF- $\kappa$ B**, che ha come bersaglio trascrizionale la **fosfofruttochinasi - 2**, che è fondamentale per la regolazione della glicolisi.

# PPP nei fagociti

- I **macrofagi (M1)** e **neutrofili** richiedono 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.

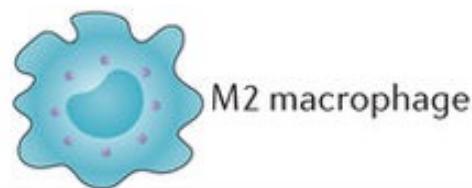


# TCA è interrotto nei macrofagi M1



- Il **ciclo di Krebs** viene interrotto **dopo il citrato** (riduzione dell'isocitrat 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

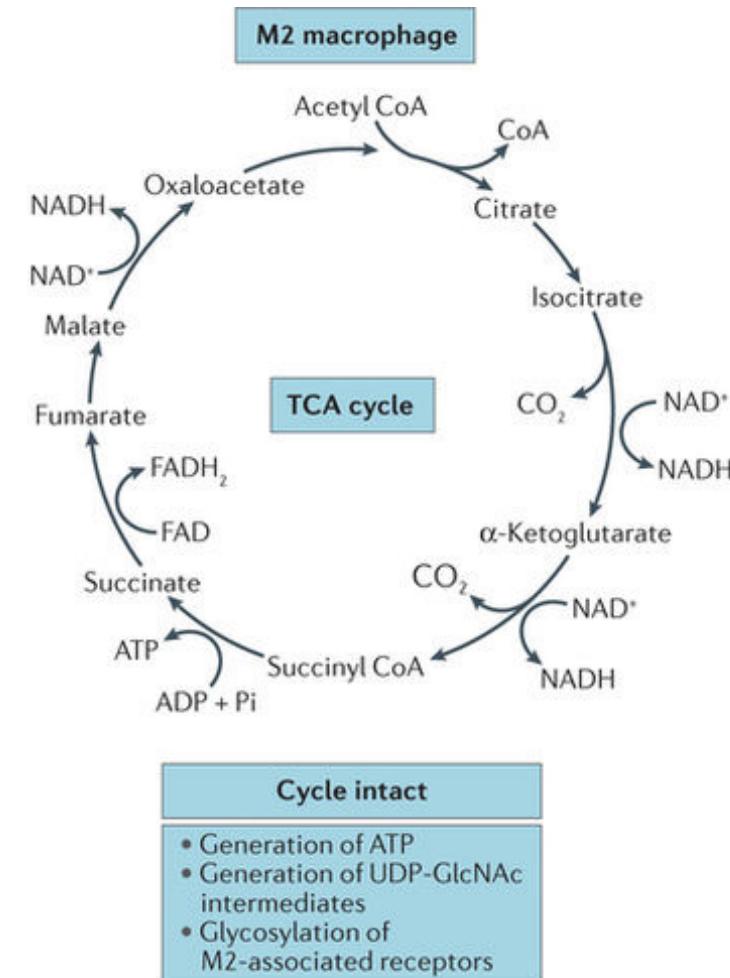


## Pathways used:

**TCA cycle** Supports oxidative phosphorylation

**Fatty acid oxidation** Promotes M2 phenotype by inhibiting inflammatory signals

**Amino acid metabolism** Supports arginase pathway activity

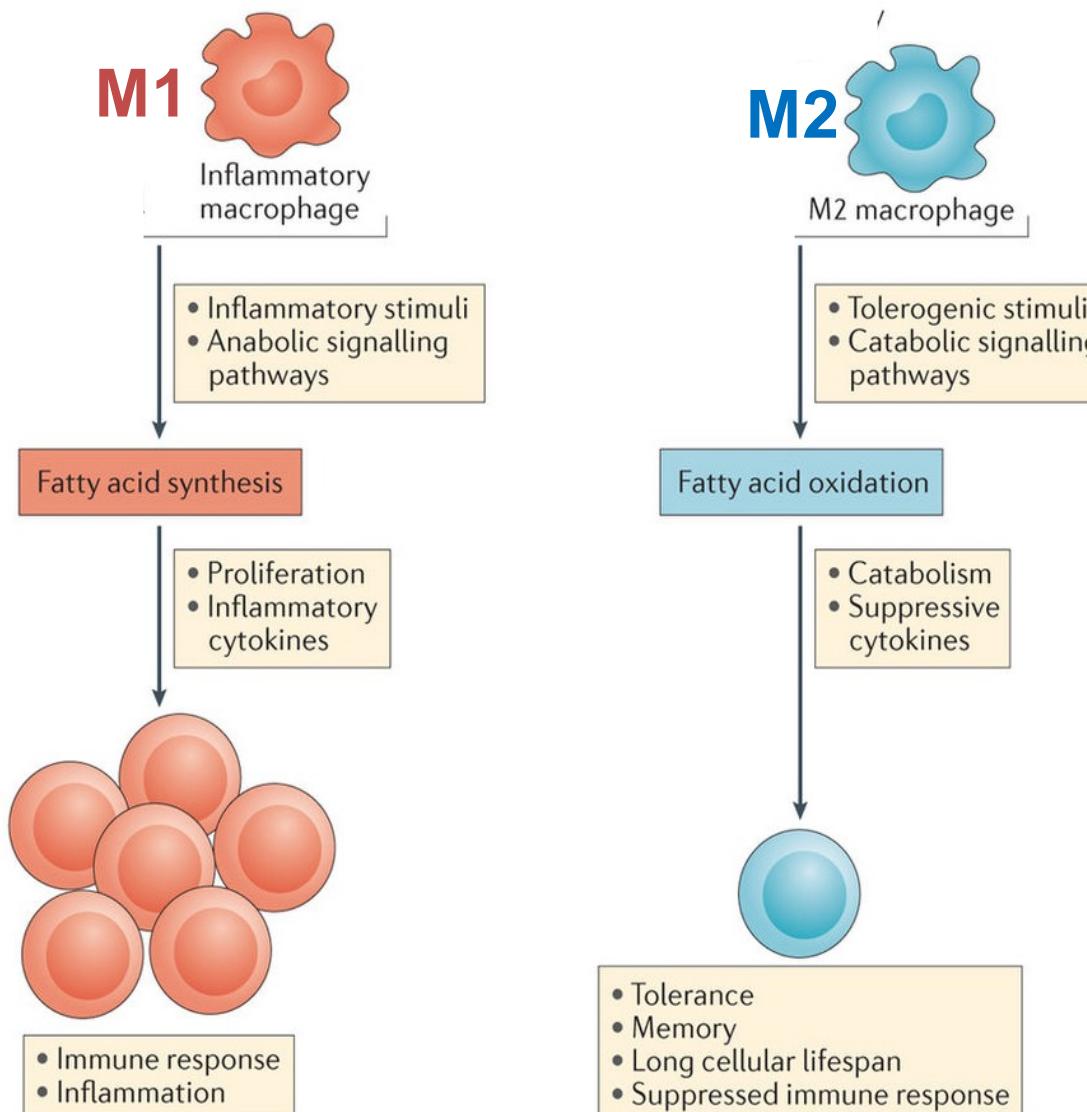


- Il **ciclo di Krebs è intatto** e si accoppia alla fosforilazione ossidativa ed è completo fornendo ATP (36 ATP).

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

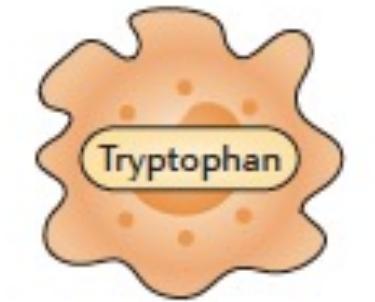


**L'ossidazione degli acidi grassi** è utilizzata preferenzialmente dai **macrofagi M2** non infiammatori mentre la **sintesi degli acidi grassi** è caratteristica dei **macrofagi M1 infiammatori**.

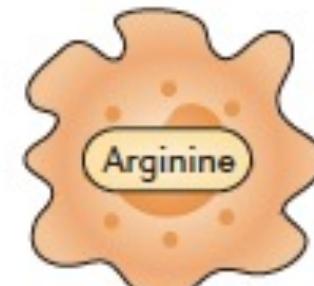
I macrofagi M2 si basano su un programma di ossidazione degli acidi grassi promosso da STAT6 attivato dalla IL-4 che induce inibizione delle funzioni infiammatorie.

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

# Metabolismo degli aminoacidi nei macrofagi



I **Macrfagi** 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.



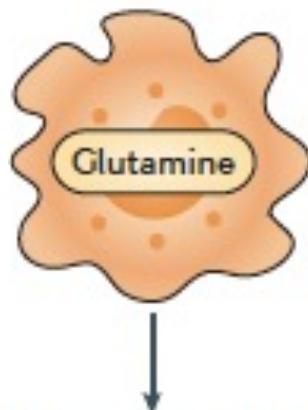
Nei macrofagi infiammatori M1:

iNOS



Nei macrofagi tollerogenici M2

arginasi



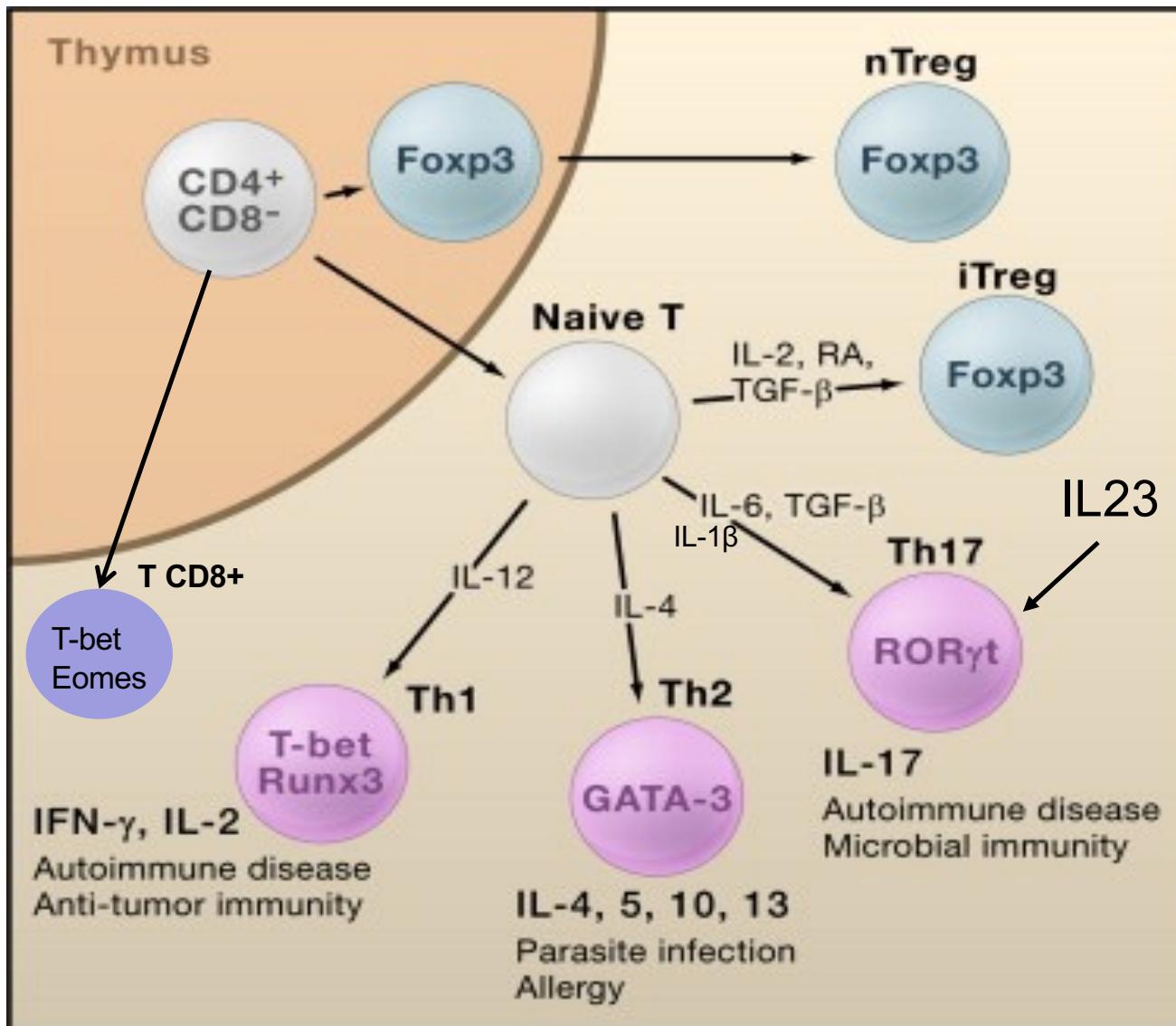
**Macrfagi M1: IL-1 $\beta$  e NO**

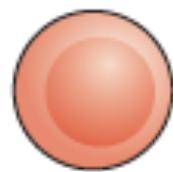
**Macrfagi M2 :** la glutammina entra nel TCA e favorisce la **polarizzazione M2** indotta dalla **IL4**.

Il metabolismo degli aminoacidi ha un ruolo importante per la funzionalità del sistema immunitario innato e adattativo. Nei macrofagi, gli amminoacidi glutammina 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

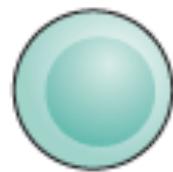




Effector T cell

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 $T_{reg}$ cells and linked to tolerogenic stimuli



Memory CD8+ T cell

Memory CD4+ T cells

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 effettive 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 aminoacidi** per promuovere la proliferazione e la produzione di citochine.

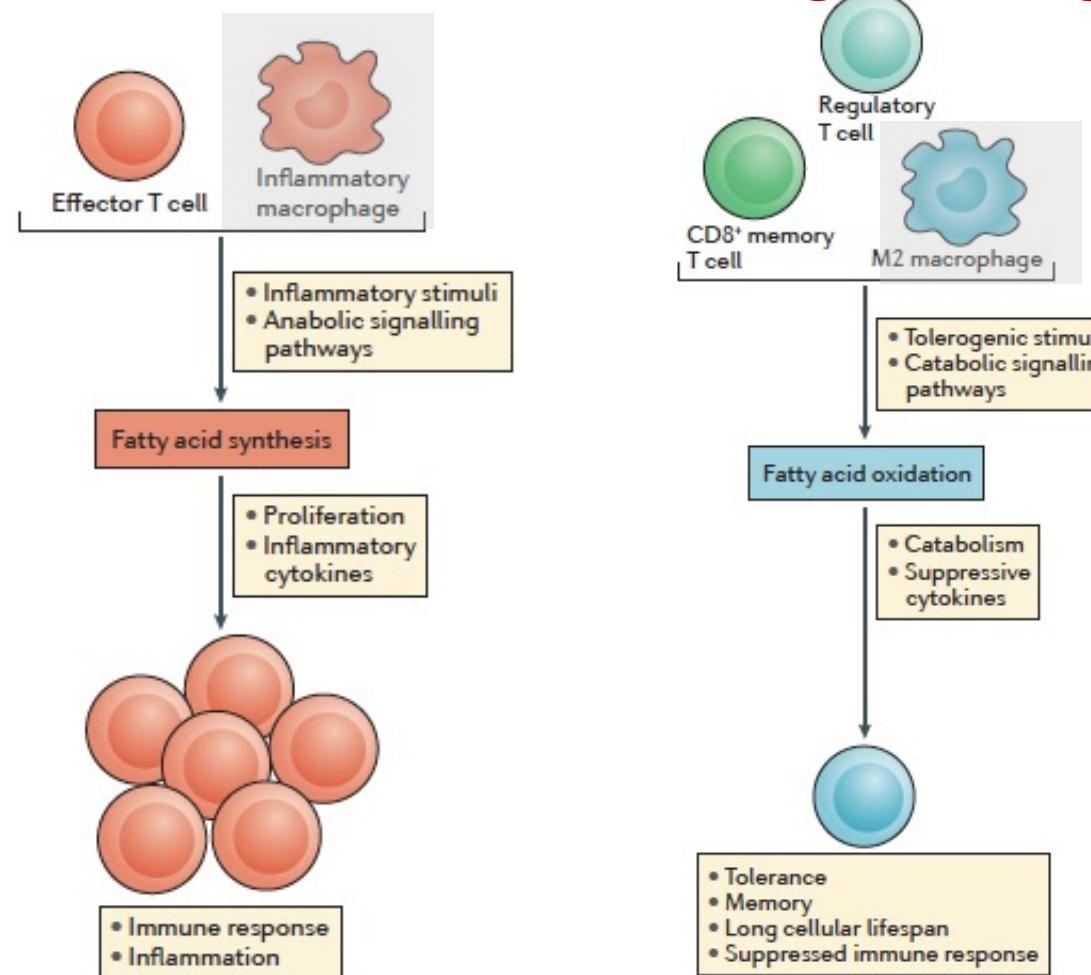
Le cellule T regolatorie (**Treg**) immunosoppressive utilizzano il ciclo TCA e l'ossidazione degli acidi grassi.

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.



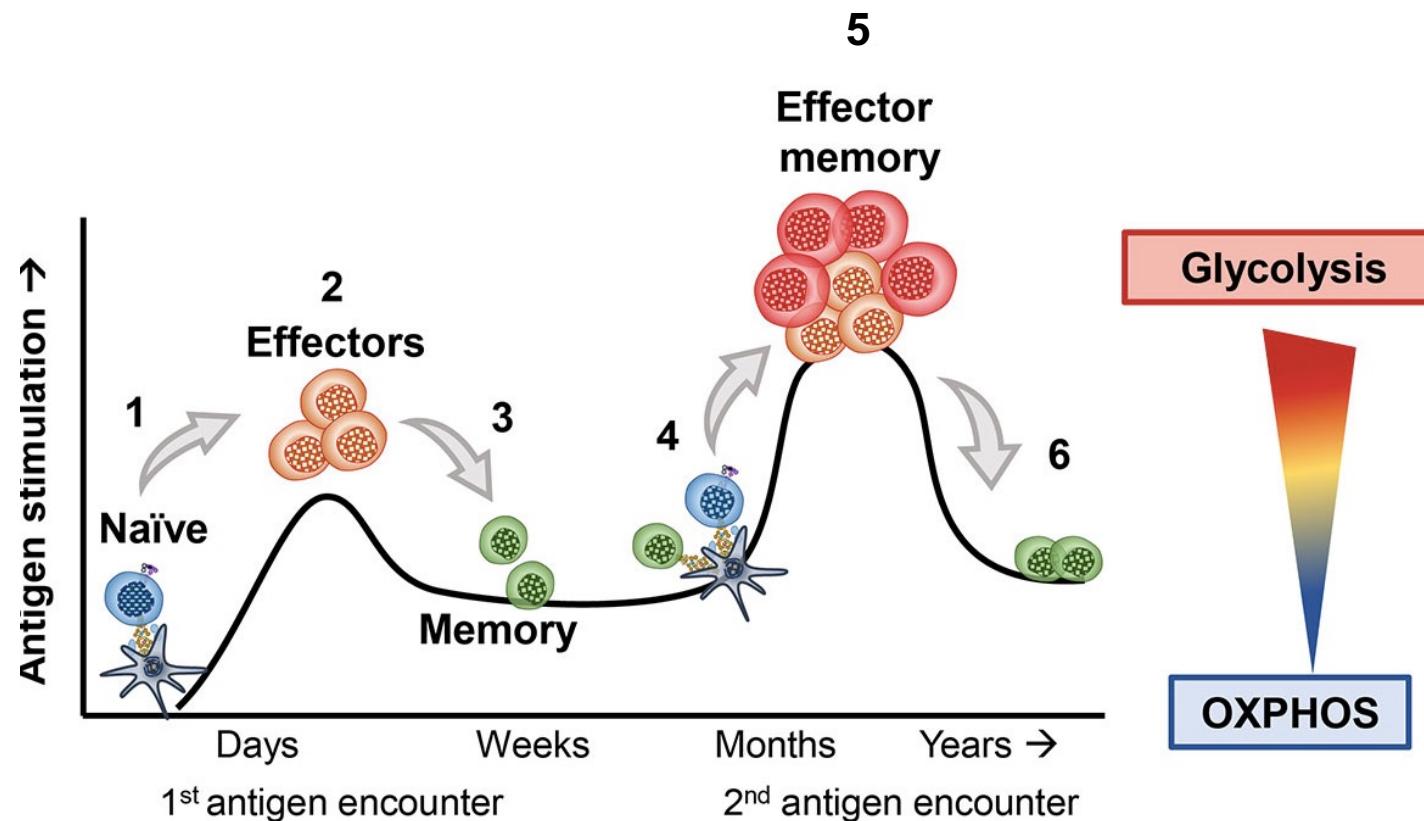
I segnali infiammatori guidano la sintesi degli acidi grassi, importanti per la proliferazione delle c. immunitarie e la produzione di citochine infiammatorie. Al contrario, gli stimoli tollerogenici del s. immunitario guidano l'ossidazione degli acidi grassi, necessaria per la produzione di citochine 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 effettive.

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) Naive 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.