

# “LA RIPROGRAMMAZIONE METABOLICA DEL CANCRO”

Project work a cura della Dott.ssa Milena Malvestiti, relatore Prof. Ivano Hammarberg Ferri

UNIVERSITA' DEGLI STUDI GUGLIELMO MARCONI

MASTER di II livello in ONCOLOGIA INTEGRATA

Direttore scientifico Prof. Massimo Fioranelli

1

Le cellule tumorali si contraddistinguono per la proliferazione perenne ed incontrollata, per il potenziale replicativo illimitato, per l'elusione della morte programmata tramite apoptosi, e per la capacità di invadere i tessuti e gli organi limitrofi e non, quindi di metastatizzare, anche in virtù della loro peculiarità di stimolare l'angiogenesi.

Per poter mantenere tutte queste peculiarità le cellule tumorali hanno bisogno di substrati energetici e di precursori biosintetici in continuo e a tale scopo inducono, attraverso la via di trasduzione di segnale PI3/Akt/mTOR, modulata anche da fattori infiammatori come TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) oltre che dall'insulina e dai fattori di crescita IGF1 e in grado di controllare l'espressione del fattore nucleare NF-kB, e attraverso il rilascio del fattore inducibile dall'ipossia HIF1 $\alpha$ , (Hypoxia Inducible Factor), modulato dal gene Myc, a sua volta sotto il controllo del pathway RAS/MAPK, cambiamenti nel metabolismo energetico di se stesse e delle cellule ad esse associate quali i fibroblasti associati al cancro (CAF Cancer Associated Fibroblasts).

Questa riprogrammazione metabolica si traduce, a livello sistemico, in un uptake anomalo di glucosio e in un aumentato fabbisogno di azoto, soprattutto in forma di glutammina, serina e arginina. A livello cellulare, l'alterato metabolismo tumorale comporta un'elevata richiesta biosintetica soddisfatta dagli intermedi della glicolisi e del ciclo di Krebs e l'attuazione dell'autofagia e di modalità opportunistiche di acquisizione dei nutrienti (macropinocitosi, entosi, macroautofagia) dall'ambiente extracellulare. A tutto ciò consegue una modulazione epigenetica mediata dagli stessi metaboliti cellulari, quali l'acetilCoA e l'acetato che può provenire sia dalla deacetilazione istonica che dall'attività fermentativa della microflora batterica intestinale il che mette in correlazione il metabolismo dell'intero organismo con quello del microbiota intestinale nell'eziopatogenesi del cancro. L'acetilCoA inoltre ha un ruolo essenziale come substrato per la biosintesi degli acidi grassi. Recenti studi in effetti hanno messo in luce il ruolo dell'acetil-CoA sintetasi (ACSS), che catalizza la conversione dell'acetato in acetil-CoA, nei carcinomi epatocellulari, nei glioblastomi e nel cancro del seno e della prostata.

Più nello specifico, le cellule tumorali, all'inizio della carcinogenesi, anche in virtù dell'eccesso di ROS, che innescano ipossia e alterazioni delle suddette vie di segnale, prediligono come via energetica la glicolisi anaerobia, 100 volte più veloce della fosforilazione ossidativa ma con una resa 18 volte inferiore.

Essa, conferendo vantaggio proliferativo, viene mantenuta anche in un secondo momento, pur avendo l'angiogenesi ripristinato l'afflusso di ossigeno, da cui la dicitura "glicolisi aerobia" o effetto Warburg dal nome del suo scopritore. Questo non è però la conseguenza di un'insufficienza nella catena respiratoria mitocondriale (ciclo di Krebs e fosforilazione ossidativa), come ritenuto per anni, ma piuttosto il risultato di uno straordinario adattamento legato alla compartimentalizzazione metabolica e all'eterogeneità della massa tumorale. Le cellule ricavano energia da una via o un'altra in base al loro posizionamento: se il tasso di diffusione del glucosio è basso e la sua distribuzione è irregolare, le cellule che si basano sulla fosforilazione ossidativa hanno un vantaggio perché possono raggrupparsi nei siti in cui le concentrazioni di glucosio sono più alte e, anche se in modo relativamente lento, convertirlo in ATP. L'effetto Warburg come tale è altamente espresso in cellule appartenenti al circostante microambiente tumorale stromale, dove l'ossigeno è più carente: i CAF. Si tratta in assoluto delle cellule "non tumorali" più abbondanti nella massa tumorale e si ritengono essere in rapporto quasi simbiotico con le cellule tumorali oltre che associati a una maggiore aggressività del tumore.

I CAF forniscono alle cellule tumorali adiacenti lattato, piruvato derivati dalla propria attività glicolitica eccessiva, corpi chetonici, amminoacidi quali la glutammina, e acidi grassi liberi. Inducono quindi a loro volta la fosforilazione ossidativa nelle cellule tumorali adiacenti, permettendo loro di produrre grandi quantità di ATP oltre a fornire macronutrienti necessari per la proliferazione. Questo modello di metabolismo tumorale a due compartimenti e l'interazione dinamica di simbiosi metabolica tra le cellule tumorali e i CAF è stato ridefinito come "effetto Warburg inverso". E in effetti la constatazione che i CAF proliferano a un tasso decisamente inferiore rispetto ai normali fibroblasti, nonostante l'incremento della glicolisi, conferma che i prodotti del loro catabolismo vengono usati dalle adiacenti cellule tumorali. Questo giustifica anche l'osservazione che un'alta attività mitocondriale e anche una dipendenza dal metabolismo mitocondriale - così come dalla glicolisi - sono essenziali per la rapida proliferazione delle cellule tumorali.

In merito all'aumentato fabbisogno di azoto, basti ricordare che gli aminoacidi sono i mattoni delle proteine e sono anche metaboliti intermedi che alimentano il ciclo TCA e la gluconeogenesi quando degradati in ossalacetato, fumarato, succinil-CoA,  $\alpha$ -chetoglutarato (a.a. glicogenetici) o alimentano la sintesi degli acidi grassi o la produzione di corpi chetonici quando degradati ad aceto-acetato o ad acetil-CoA. (a.a. chetogenici). Sono anche alla base della sintesi dei nucleotidi.

La glutammina, il secondo substrato più consumato dopo il glucosio, è un nutriente essenziale per la proliferazione cellulare: fornisce carbonio, quindi energia, entrando nel ciclo TCA dopo la sua trasformazione prima in glutammato poi in  $\alpha$ -chetoglutarato, ma soprattutto fornisce azoto necessario alla biosintesi dei nucleotidi purinici e pirimidinici, delle esosammine (zuccheri amminoacidi coinvolti nella sintesi di molecole glicosilate, prima tra tutte la glucosamina-6-fosfato) e degli aminoacidi non essenziali.

Il glutammato generato dalla glutammina ad opera delle glutaminasi è anche un precursore fondamentale per la maggior parte degli aminoacidi non essenziali, tra cui aspartato, alanina, arginina, e prolina.

Nel cancro si osserva l'aumento dell'attività degli enzimi coinvolti nella generazione di questi aminoacidi dal glutammato, il tutto sotto l'orchestrazione del protooncogene c-Myc.

Il glutammato può essere prodotto dalla glutammina in eccesso rispetto al suo utilizzo nella sintesi proteica. L'eccesso di glutammato può essere o esportato nella matrice extracellulare oppure convertito in  $\alpha$ -chetoglutarato ( $\alpha$ KG) dalla glutammato deidrogenasi (GDH) o dalle transaminasi. L' $\alpha$ KG può essere metabolizzato nel ciclo TCA, sia per la via ossidativa che riduttiva.

La sintesi di citrato da  $\alpha$ KG attraverso la carbossilazione riduttiva sembra essere essenziale per la crescita delle cellule tumorali con difetti mitocondriali suggerendo che questi tumori potrebbero essere sensibili all'inibizione del metabolismo della glutammina. I prodotti oncogenici KRas promuovono la crescita tumorale stimolando l'attività della glutammato piruvato transaminasi (GPT), che rilascia alte concentrazioni di  $\alpha$ KG per il ciclo TCA.

L'  $\alpha$ KG derivato dalla glutammina è un'alternativa al glucosio come donatore di carbonio nella sintesi dei lipidi in quanto può venire convertito dall'isocitrato- deidrogenasi 1 (IDH1) nel citoplasma a isocitrato, che può servire come substrato per la ATP citrato liasi durante la sintesi dei lipidi.

Infine, la glutammina è importante per la sintesi del glutatione (appunto composto da soli tre aminoacidi, ossia glutammato, cisteina e glicina), un antiossidante abbondante nelle cellule tumorali e importante per l'omeostasi redox e la sopravvivenza delle cellule tumorali in condizioni di stress ossidativo.

Per finire, l' $\alpha$ KG svolge anche attività epigenetica e in effetti una grande varietà di modificazioni post-traslazionali sono svolte dai membri di una vasta classe di diossigenasi dipendenti dall' $\alpha$ -chetoglutarato. Alcune di queste diossigenasi  $\alpha$ KG dipendenti, tra gli altri processi, regolano i livelli HIF1 $\alpha$  in risposta alla disponibilità di ossigeno e allo stress ossidativo.

L'elevato tasso di utilizzazione del glucosio extracellulare e di glutammina da parte delle cellule tumorali comporta l'accumulo di lattato extracellulare, che, tra gli altri effetti, ha quello di promuovere un microambiente immuno-permissivo, attenuando l'attivazione delle cellule dendritiche e dei linfociti T e la migrazione dei monociti. Oltre a ciò il lattato stimola la polarizzazione dei macrofagi residenti a un cosiddetto stato M2, con effetto immunosoppressivo, grazie anche all'azione dei fattori HIF1 $\alpha$  (Hypoxia Inducible Factor) e VEGF, da esso stimolati. Il lattato inoltre stimola la liberazione da parte dei macrofagi di arginasi 1, che catalizza la conversione dell'arginina in ornitina, precursore delle poliammine, con il risultato finale di promuovere la crescita delle cellule. Alti livelli di lattato sono associati a metastatizzazione e minore probabilità di sopravvivenza dei malati di cancro.

Il piruvato è un altro catabolita monocarbossilato importante per il metabolismo tumorale. Questa molecola può essere generata tramite il catabolismo del glucosio come prodotto finale della glicolisi, o può essere acquisita per assorbimento cellulare o può essere ottenuta dall'ossidazione del lattato, operata dalla lattato deidrogenasi stessa. Nel mitocondri, il piruvato viene ossidato dalla piruvato deidrogenasi (PDH) per formare acetil CoA, che viene convertito in citrato tramite condensazione con ossalacetato. Il citrato può quindi rimanere, nei mitocondri, nel ciclo degli acidi tricarbossilici (TCA) per generare NADH che può essere usato per produrre ATP attraverso la fosforilazione ossidativa. In alternativa il citrato può tornare nel citosol ed essere metabolizzato dalla ATP citrato liasi (ACLY) che lo riconverte in acetil CoA da utilizzare per la lipogenesi *de novo*, per le reazioni di acetilazione degli istoni, o la per la produzione dei corpi chetonici, via favorita dall'attivazione di prodotti oncogenici come KRas e Myc e dalla sovraespressione di Akt, che attivando mTOR aumenta i flussi mitocondriali che forniscono il citrato e l'acetilCoA per la lipogenesi.

L'economia del carbonio di una cellula proliferante differisce notevolmente da quella di una cellula quiescente. Il carbonio ridotto, nelle cellule proliferanti è destinato alla biosintesi di una gamma diversificata di molecole quali acidi grassi, colesterolo, derivati degli esosi e pentosi, glicerolo, nucleotidi e aminoacidi non essenziali.

Per raggiungere questo obiettivo, una cellula proliferante deve prima trasformare i nutrienti acquisiti in intermedi strutturali. Queste molecole includono l'acetil-CoA citosolico, le unità del ciclo dei folati recanti un gruppo monocarbonioso e la S-adenosilmetionina (SAM), nonché una serie di intermedi del ciclo glicolitico e del ciclo di Krebs. Inoltre, molte reazioni biosintetiche sono riduttive per natura e quindi richiedono una fonte con potere riducente, quale il NADPH (nicotinammide adenina dinucleotide fosfato ridotto). La generazione di NADPH da NADP<sup>+</sup> avviene per ossidazione controllata di substrati carboniosi in percorsi distinti da quelli che generano NADH (nicotinammide adenina dinucleotide ridotto) per supportare il trasporto degli elettroni mitocondriale. Quindi, una cellula proliferante deve destinare una parte dei suoi substrati carboniosi alla produzione di NADPH, obiettivo che viene raggiunto anche con la destinazione del glucosio-6-P, primo prodotto della glicolisi, alla via dei pentoso fosfati che ossidandolo genera NADPH e ribosio-5-fosfato, componente strutturale dei nucleotidi. Gli enzimi chiave nella via dei pentoso fosfati, la transchetolasi-like-1 (TKTL1) e la transaldolasi (TALDO), sono spesso iperespressi nel cancro.

La tumorigenesi può essere considerata alla stregua di una privazione di nutrienti in cui chetoni sono originati principalmente dal metabolismo lipidico se si verifica carenza di glucosio. I CAF secernono, anche per autofagia, grandi quantità di corpi chetonici, che vengono poi riutilizzati dalle cellule tumorali per il metabolismo anabolizzante o per la fosforilazione ossidativa (essendo l'acetoacetato convertito ad acetil-CoA).

I chetoni sono i combustibili più potenti per i mitocondri delle cellule tumorali proliferanti, producendo più energia e diminuendo il consumo di ossigeno, rispetto al lattato. Più specificamente, il  $\beta$ -idrossibutirrato aumenta la proliferazione delle cellule del cancro di tre volte, mentre il lattato promuove le metastasi.

L'autofagia, sovraespressa dai CAF, può portare a chetogenesi o essere mediata dai chetoni stessi. I chetoni in sostanza agiscono come fonte di energia paracrina nell'effetto Warburg inverso e possono seguire la stessa via di trasporto del lattato attraverso i trasportatori di membrana MCT, senza dispendio di energia.

La conservazione e l'utilizzo dei lipidi intracellulari sono fondamentali per mantenere l'omeostasi energetica della cellula. Un'aumentata beta ossidazione degli acidi

grassi, che oltretutto alimenta la produzione di corpi chetonici, può avvenire nelle cellule tumorali e in quelle adiacenti quali i CAF in genere, i fibroblasti derivati dal tessuto adiposo e gli adipociti associati al cancro (CAA).

Gli acidi grassi sono substrati fondamentali per le cellule tumorali proliferanti in quanto forniscono acetyl-CoA, corpi chetonici e ATP. La loro ossidazione gioca inoltre un ruolo fondamentale per il mantenimento dell'equilibrio redox cellulare attraverso la rigenerazione del NADPH, soprattutto in caso di carenza di glucosio. La beta-ossidazione degli acidi grassi e il ciclo TCA, infatti, generano malato e citrato, che sono substrati per l'enzima malico NAD-dipendente e per la isocitrato-deidrogenasi che genera NADPH.

Si ricordi infine che l'ipossia compromette l'attività della stearyl-CoA desaturasi 1 (SCD1) che crea doppi legami nella sintesi *de novo* di acidi grassi insaturi (acido oleico) da acidi grassi saturi (acido stearico), creando un deficit di acidi grassi insaturi, fondamentali per la formazione di membrane plasmatiche correttamente funzionanti. Per sopperire agli acidi grassi mancanti, le cellule ipossiche possono importare opportunisticamente acidi grassi insaturi "pronti all'uso" dall'ambiente extracellulare.

Visto il ruolo centrale svolto da HIF1 $\alpha$ , ossia il fattore inducibile da ipossia, la cui sovraespressione viene indotta da c-Myc e da NF-kB (sotto input del pathway PI3/Akt) a sua volta stimolato da un fattore dell'infiammazione subclinica cronica tissutale, quale TNF $\alpha$  e considerato che HIF1 $\alpha$  viene rilasciato sia fisiologicamente in risposta alla deprivazione di ossigeno, sia in risposta allo stress ossidativo indotto, tra l'altro, da fattori esogeni quali l'eccesso calorico, il sovrappeso, l'alcool, il fumo, gli interferenti endocrini, gli inquinanti ambientali, gli squilibri neuroormonali, ne consegue che, oltre a mantenere bassa l'insulina e i fattori di crescita, la prima finalità di un intervento nutrizionale deve essere quella di contrastare l'infiammazione, lo stress ossidativo e l'ipossia, con la premura di mantenere un corretto peso corporeo.