

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DEL PIEMONTE ORIENTALE

“AMEDEO AVOGADRO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE DEL FARMACO

Corso di Laurea Magistrale in Farmacia

TESI DI LAUREA

Titolo della tesi

L'acetyl-CoA: da intermedio metabolico a regolatore del fenotipo neoplastico

Relatrice

Prof.ssa Garavaglia Silvia

Candidato

Tassi Francesco

Matricola: 20043046

Anno Accademico 2025-2026

Sessione autunnale



Firmato digitalmente da Silvia Garavaglia
Data: 27.09.2026 22:08:08 CEST
Organizzazione: UNIVERSITA' DEGLI
STUDI DEL PIEMONTE
ORIENTALE/01943490027

Indice

Capitolo 1 L'acetil-CoA nella cellula in condizioni fisiologiche: biochimica, compartimentalizzazione e funzioni

- 1.1 Struttura chimica e significato del legame tioestere ad alta energia
- 1.2 Le vie di produzione
- 1.3 Compartimentalizzazione e i diversi pool cellulari
- 1.4 Destino metabolico del pool mitocondriale
- 1.5 Destino metabolico del pool citosolico
- 1.6 Il traffico intercompartimentale
- 1.7 Il pool nucleare
- 1.8 L'acetil-CoA come secondo messaggero
- 1.9 Acetilazione proteica: le basi
- 1.10 Il versante epigenetico: acetilazione istonica e accessibilità della cromatina
- 1.11 Acetil-CoA, autofagia e morte cellulare

Capitolo 2 — La riprogrammazione metabolica della cellula tumorale

- 2.1 Effetto Warburg e glicolisi aerobia
- 2.2 Metabolismo della glutammina e carbossilazione riduttiva
- 2.3 Via della serina e della glicina, metabolismo monocarbonioso
- 2.4 Metabolismo dell'arginina e auxotrofie tumorali
- 2.5 Oncometaboliti e specie reattive dell'ossigeno

Capitolo 3 — Produzione di acetil-CoA nel tumore: enzimi, regolazione, lipogenesi de novo

- 3.1 ATP citrato-liasi
- 3.2 Membro 2 della famiglia dell'acil-CoA sintetasi a catena corta (ACSS2) e acetato come nutriente di riserva
- 3.3 ACSS1 e ACSS3 mitocondriali
- 3.4 Complesso della piruvato deidrogenasi (PDC): regolazione e localizzazione
- 3.5 β -ossidazione come sorgente alternativa nei tumori
- 3.6 Le acetil-CoA carbossilasi e l'acido grasso sintesi: la lipogenesi de novo tumorale
- 3.7 Via del mevalonato e sintesi degli isoprenoidi

3.8 Eterogeneità delle sorgenti nei diversi tumori

3.9 Il microambiente come aspetto determinante nella produzione e fonte di acetil-CoA

Capitolo 4 — Acetil-CoA ed epigenetica: acetilazione istonica e controllo trascrizionale

4.1 KAT e HDAC, specificità di substrato, costanti cinetiche

4.2 Disponibilità di acetil-CoA e accessibilità istonica

4.3 ACLY e ACSS2 reclutati sulla cromatina

4.4 Acetil-CoA e altri programmi trascrizionali da esso influenzati

4.5 Gerarchia di sensibilità acetilazione istonica e disponibilità acetil-CoA

4.6 I lettori dell'acetilazione come mediatori dell'esito trascrizionale

4.7 Acetilazione istonica come aiuto alla resistenza adattiva del tumore

4.8 Marcatori epigenetici di acetilazione e prognosi

Capitolo 5 — Acetilazione non istonica: l'acetil-CoA come regolatore post-traduzionale

5.1 L'acetiloma: dimensioni del fenomeno e distribuzione subcellulare

5.2 N-acetiltransferasi e acetilazione N-terminale

5.3 Meccanismi d'azione dell'acetilazione

5.4 Acetilazione degli enzimi metabolici, effetto su ciclo di Krebs e glicolisi

5.5 Acetilazione di oncogeni e oncosoppressori

5.6 Acetilazione, stabilità genomica e riparo del DNA

5.7 Acetilazione di PD-L1: collocazione e stabilità del checkpoint

5.8 Il caso del fegato: restrizione del substrato e ipoacetilazione dell'acetiloma

5.9 Substrati citoplasmatici: citoscheletro, apoptosi e chaperoni

Capitolo 6 — Acetil-CoA, invasione e metastasi

6.1 Quadro generale: l'acetil-CoA come risorsa contesa lungo la storia naturale della malattia

6.2 Carcinoma mammario: ACC1, acetilazione di Smad2, transizione epitelio-mesenchimale e recidiva

6.3 Glioblastoma: asse acetil-CoA, Ca²⁺ e NFAT nell'adesione e nella migrazione

6.4 Carcinoma della cervice: β -ossidazione, acetil-CoA e staminalità nelle metastasi linfonodali

6.5 Epatocarcinoma: accumulo di acetil-CoA, CXCL1 e reclutamento dei neutrofili associati al tumore

6.6 Osteosarcoma: ACSS1 e riprogrammazione metabolica pro-metastatica

Capitolo 7 — Acetil-CoA e immunità antitumorale

7.1 Il microambiente tumorale come ambiente metabolicamente competitivo

7.2 Evasione immunitaria: acetil-CoA, PD-L1 e bersagli farmacologici

7.3 L'acetil-CoA carbossilasi nei linfociti T CD8⁺ infiltranti

7.4 Acetato come nutriente dei linfociti T e ruolo di ACSS2

7.5 Popolazioni mieloidi: neutrofili associati al tumore e macrofagi

7.6 Implicazioni traslazionali: rischi e benefici

Capitolo 8 — Acetil-CoA e resistenza terapeutica

8.1 Acetil-CoA e scelta della via di riparo: vulnerabilità agli inibitori di PARP e radioresistenza mammaria

8.2 Resistenza al cetuximab nel carcinoma squamoso di testa e collo

8.3 Chemioresistenza nel carcinoma del colon-retto e il ruolo di ACLY

Introduzione

La riprogrammazione metabolica è una componente fondamentale della biologia tumorale: consente alle cellule neoplastiche di sostenere la proliferazione, adattarsi alle condizioni del microambiente e sviluppare resistenza ai trattamenti. Il metabolismo, tuttavia, non fornisce soltanto energia e precursori biosintetici, ma partecipa anche alla regolazione dell'espressione genica e dell'attività proteica. In questo contesto, l'acetil-coenzima A (acetil-CoA) rappresenta un punto di collegamento tra disponibilità dei nutrienti e comportamento cellulare. Prodotto attraverso diverse vie metaboliche, l'acetil-CoA contribuisce al metabolismo energetico, alla sintesi dei lipidi e all'acetilazione degli istoni e di numerose proteine non istoniche. Attraverso queste funzioni può influenzare processi rilevanti per la progressione neoplastica, quali proliferazione, riparazione del DNA, sopravvivenza e invasività. I suoi effetti dipendono non soltanto dalla quantità complessivamente disponibile, ma anche dalla distribuzione nei compartimenti cellulari, dall'attività degli enzimi che lo producono e lo utilizzano e dalle caratteristiche del tessuto considerato. Questa tesi compilativa si propone di analizzare il ruolo dell'acetil-CoA nella regolazione del fenotipo neoplastico, mettendo in relazione i meccanismi biochimici con le loro possibili implicazioni terapeutiche. Dopo un inquadramento delle funzioni fisiologiche della molecola e delle principali alterazioni metaboliche tumorali, vengono esaminate le vie di produzione dell'acetil-CoA e il suo contributo all'acetilazione istonica e non istonica. L'analisi si concentra quindi sul coinvolgimento di questi processi nell'invasione e nella disseminazione metastatica, nelle interazioni con il sistema immunitario e nella resistenza ai trattamenti. Il confronto tra diversi modelli tumorali permette di evidenziare sia meccanismi condivisi sia risposte dipendenti dal contesto. La ricerca bibliografica è stata condotta principalmente attraverso PubMed, integrando le ricerche per parole chiave con la consultazione delle bibliografie e dei lavori correlati. Sono stati privilegiati gli studi sperimentali originali in lingua inglese, utilizzando le rassegne per l'inquadramento generale. L'interpretazione delle evidenze distingue i risultati ottenuti in colture cellulari e modelli animali dalle osservazioni cliniche. La prevalenza di dati preclinici e la necessità di conferme indipendenti per alcuni meccanismi richiedono infatti cautela nel trasferire i risultati alla pratica terapeutica. L'obiettivo è delineare le conoscenze disponibili e le questioni ancora

aperte, valutando le opportunità e i limiti del metabolismo dell'acetil-CoA come bersaglio oncologico.

Capitolo 1

L'acetil-CoA nella cellula in condizioni fisiologiche: biochimica, compartimentalizzazione e funzioni

Nonostante il nucleo del mio lavoro di tesi sia il ruolo dell'acetil-CoA in un contesto oncologico, si è ritenuto opportuno inserire un capitolo introduttivo che dia un inquadramento generale sul ruolo dell'acetil-CoA in condizioni fisiologiche, in modo da introdurre più agevolmente una serie di concetti di base che si troveranno poi anche nei capitoli successivi

1.1 Struttura chimica e significato del legame tioestere ad alta energia

L'acetil-CoA è una molecola impermeabile alle membrane cellulari, costituita da un gruppo acetilico ($\text{CH}_3\text{CO}-$) unito ad uno di coenzima A, ossia un derivato dell'acido pantotenico, vitamina B5 e della cisteina, uniti mediante un legame tioestere¹. Questo legame è caratterizzato dall'essere termodinamicamente attivato ma cineticamente stabile, non essendo soggetto ad idrolisi spontanea in ambiente acquoso². Da questa caratteristica ne deriva la possibilità di trasferire residui acetilici ad una vasta gamma di substrati nucleofili accettori, tra cui l'impatto sulla modifica proteica post traduzionale, sul metabolismo, sull'espressione mediante acetilazione istonica e sul ciclo cellulare stesso, aspetti che saranno motivati e approfonditi nei successivi sottocapitoli.

1.2 Le vie di produzione

La produzione dell'acetil-CoA è il primo aspetto metabolico che necessita quantomeno un inquadramento, dato che come sarà mostrato nei capitoli successivi questi pathways sono ampiamente disregolati nelle cellule neoplastiche. In linea generale, nella maggior parte dei tessuti dei mammiferi, l'acetil-CoA viene prodotto a livello mitocondriale mediante catabolismo degli aminoacidi ramificati, ossidazione del piruvato di origine glicolitica e beta-ossidazione. La glicolisi citosolica porta alla formazione di piruvato, traslocato poi a livello mitocondriale mediante il carrier mitocondriale del piruvato (MPC)³, per poi essere processato dal complesso della piruvato deidrogenasi (PDC) a formare acetil-CoA, NADH e CO_2 . Il PDC presenta due

proteine associate ad esso con finalità regolatoria, ossia l'enzima piruvato deidrogenasi chinasi (PDK) e il piruvato deidrogenasi fosfatasi (PDP), a loro volta regolate allostericamente da molecole come lo stesso acetil-CoA, NADH e ATP. Questi ultimi tenderanno ad attivare la PDK, che al contrario verrà inibita invece da CoA, NAD⁺ ed ADP. La finalità di questo circuito regolatorio è garantire che i prodotti della glicolisi siano usati a fini energetici, ossia produzione di ATP, in contesti di bassa energia, e a fini anabolici in caso di abbondanza di ATP, NADH e acetil-CoA.⁴ L'acetil-CoA e in generale le molecole di natura lipidica, come verrà approfondito in seguito, sono impermeabili alle membrane e necessitano di una forma trasportabile che possa raggiungere la membrana mitocondriale interna. Questo processo inizia con la condensazione di acidi grassi citosolici, principalmente il palmitato, ad opera di diversi enzimi della famiglia della acil-CoA sintasi, con la formazione di acil-CoA, che viene poi trasferito dalla Carnitina Palmitoiltransferasi 1 (CPT1) ad una molecola di L-carnitina. La proteina SLC25A20, nota anche come carnitina/acilcarnitina traslocasi, permette l'ingresso della L-carnitina con il residuo acilico a livello mitocondriale, dove la CPT2 rigenera acil-CoA e L-carnitina nella matrice. A questo punto l'acil-CoA, ora mitocondriale, viene impiegato nella β -ossidazione, che accorcia in modo progressivo la catena di due atomi di carbonio producendo acetil-CoA.⁵ La terza via di maggior rilevanza, utilizza come substrato gli aminoacidi ramificati, principalmente leucina e isoleucina⁶, che subiscono una transaminazione a α -chetoacidi a catena ramificata dall'enzima citosolico Branched-Chain Amino Acid Transaminase 1 (BCAT1). Il processo può avvenire anche a livello mitocondriale grazie all'isoenzima metabolicamente attivo BCAT2. A questo segue la decarbossilazione ossidativa da parte del complesso BCKD, che porta alla produzione di NADH, acetil-CoA e altri tioesteri acil-CoA, che possono poi entrare nella β -ossidazione o nel ciclo di Krebs. Resta ancora oggetto di studio la via di ingresso degli aminoacidi ramificati a livello mitocondriale. A queste vie metaboliche si affiancano le vie di produzione dell'acetil-CoA a partire dai corpi chetonici e la sintesi ATP-dipendente a partire da acetato, cui sarà dedicato un capitolo specifico in contesto oncologico. I corpi chetonici sono acetoacetato, β -idrossibutirrato e acetone; questi sono prodotti dal fegato, immessi in circolo e captati dai tessuti extraepatici, dove la 3-idrossibutirrato deidrogenasi 1 (BDH1) ossida il D- β -idrossibutirrato ad acetoacetato, con riduzione di NAD⁺. A questo punto la 3-oxoacid CoA-transferase 1 (OXCT1) o in alternativa la OXCT2, trasferisce il CoA dal succinil-CoA all'acetoacetato, generando acetoacetil-CoA. Il terzo e ultimo

step avviene ad opera di un complesso proteico con attività acetoacetyl-CoA tiolasica, che scinde l'acetoacetyl-CoA in presenza di CoA, liberando due molecole di acetyl-CoA⁷. Il fegato ha la sola funzione di produrre i corpi chetonici e di non utilizzarli; infatti, la OXCT1 è assente a livello epatico. La produzione a partire da acetato sfrutta invece in primo luogo i trasportatori monocarbossilici⁸ per accumulare acetato all'interno della cellula, a cui segue l'intervento dell'enzima Acyl-CoA Synthetase Short Chain Family Member 1 (ACSS1) a livello della matrice mitocondriale, che condensa il coenzima A ad acetato consumando ATP. Una possibile fonte di acetato è rappresentata dall'etanolo, che viene ossidato ad acetaldeide dall'attività dell'Alcol deidrogenasi 1B (ADH1B), convertita poi ad acetato dall'enzima aldeide deidrogenasi di tipo 2 (ALDH2). Una conseguenza documentata che dimostra la rilevanza di questa via è la correlazione tra assunzione di etanolo e l'elevata acetilazione proteica a livello epatico.⁹ A livello del citosol avviene una reazione analoga ad opera di ACSS2, ossia legame tra acetato e coenzima-AATP dipendente, con la sostanziale differenza legata al destino dell'acetyl-CoA nei due diversi compartimenti: l'acetyl-CoA mitocondriale alimenta infatti il ciclo di Krebs, quello generato da ACSS2 rimane disponibile per la lipogenesi e per le reazioni di acetilazione, come sarà successivamente mostrato.¹⁰

1.3 Compartimentalizzazione e i diversi pool cellulari

L'acetyl-CoA, in quanto molecola fortemente carica e quindi polare, risulta impermeabile alle membrane dei vari organelli cellulari quali la membrana mitocondriale interna, quella perossisomiale e la reticolare, da cui la presenza di quattro pool distinti, di acetyl-CoA, ossia mitocondriale, perossisomiale, nucleocitosolico e intrareticolare⁴. Il motivo per cui è possibile parlare di pool "nucleocitosolico" è legato al fatto che i pori nucleari consentono la libera diffusione dell'acetyl-CoA, nonostante la diffusione potrebbe essere limitata dall'affollamento macromolecolare; infatti, il nucleo ha concentrazioni molto più alte di proteine e DNA e ci sono evidenze che sintesi lipidica citosolica e acetilazione istonica nucleare non attingano dagli stessi pool¹¹. Il reticolo endoplasmatico si configura invece come caso limite, infatti è privo di enzimi in grado di produrre acetyl-CoA, motivo per cui l'acetilazione nel lume dipende interamente dalla traslocazione mediata da Acetyl-CoA transporter 1 (SLC33A1), noto anche come AT-1¹². Il gene *SLC33A1* è regolato mediante transattivazione ad opera del fattore di trascrizione X-box binding protein 1

(XBP1), correlato allo stress reticolare. Infatti, sotto stress del RE il pool intrareticolare tende ad aumentare a spese di quello nucleo-citosolico. I compartimenti non sono quindi da considerarsi come definitivamente separati, ma finemente regolati e interconnessi in base alle necessità cellulari¹³. Il metabolismo perossisomiale dell'acetil-CoA è stato citato per completezza, ma occorre precisare che è stato caratterizzato quasi solo nel lievito¹⁴ e mancano studi approfonditi sui mammiferi. La presenza di diversi pool di acetil-CoA separati ma interconnessi aggiunge un ulteriore livello di complessità alla comprensione del metabolismo di questa molecola¹⁵, infatti il livello complessivo di acetil-CoA cellulare non fornisce indicazioni precise sulla predominanza di uno specifico processo cellulare in un dato momento, con ripercussioni anche in ambito oncologico, come sarà approfondito in seguito.

1.4 Destino metabolico del pool mitocondriale

Il pool di acetil-CoA mitocondriale viene in linea generale impiegato nel ciclo degli acidi tricarbossilici per ottenere NADH, utilizzato a sua volta per produrre ATP nella fosforilazione ossidativa¹⁶. A livello epatico, per azione sequenziale del complesso proteico tiolasico formato da acetoacetil-CoA, 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA sintasi mitocondriale (HMGCS2), 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA liasi (HMGCL) e 3-idrossibutirrato deidrogenasi 1 (BDH1), l'acetil-CoA formatosi dalla beta ossidazione viene trasformato in corpi chetonici. Nello specifico questa via metabolica è particolarmente attiva in contesti di digiuno o restrizione calorica¹⁷. Infatti, i corpi chetonici, di fatto potrebbero essere classificati come la forma trasportabile di acetil-CoA tra gli organi. Essi entrano in circolo e sono captati da neuroni e cardiomiociti, per poi subire la riconversione ad acetil-CoA¹⁸. In aggiunta in questo contesto, il β -idrossibutirrato agisce anche come inibitore endogeno delle deacetilasi istoniche HDAC1, HDAC2 e HDAC3, come verrà spiegato nel quarto capitolo¹⁹.

1.5 Destino metabolico del pool citosolico

Il pool citosolico presenta un destino metabolico marcatamente differente rispetto a quello mitocondriale: viene infatti impiegato in primo luogo nella lipogenesi, ad opera della acetil-CoA carbossilasi (ACAC), enzima biotina-dipendente che provvede alla formazione di malonil-CoA mediante carbossilazione. Questo enzima è presente in due isoforme, ossia ACACA e ACACB, inibite entrambe dall'attività

dell'enzima AMPK in caso di condizioni di scarsità energetica mediante fosforilazione²⁰, inoltre il malonil-CoA inibisce CPT1, agendo come freno all'ossidazione degli acidi grassi²¹. La seconda possibilità è la via del mevalonato, dove HMGCS1 e una tiolasi extramitocondriale condensano tre acetil-CoA in HMG-CoA; a questo punto HMGCR lo riduce a mevalonato, precursore di steroli, ubiquinone e isoprenoidi²². La terza possibilità, solo nominata in questa sede in quanto oggetto di un successivo sottocapitolo, ed è l'utilizzo dell'acetil-CoA come donatore per l'acetilazione delle proteine e per la sintesi di metaboliti acetilati come l'UDP-N-acetilglucosamina. Un aspetto rilevante è la competizione di un pool limitato per i tre possibili destini metabolici, è stato infatti dimostrato che in epatociti murini con knockout di ACACA e ACACB, la rimozione della via lipogenica ha portato a iperacetilazione delle proteine extramitocondriali²³.

1.6 Il traffico intercompartimentale

Come precedentemente descritto, l'acetil-CoA non è in grado di attraversare le membrane, tra cui anche quella mitocondriale interna, motivo per cui è necessario un trasporto indiretto e successiva ricostituzione. Questo processo coinvolge in primo luogo l'enzima citrato sintasi, che condensa acetil-CoA e ossalacetato formando citrato e CoA²⁴; a questo punto la Citrate Transport Protein (CTP) esporta il citrato nel citoplasma, che viene scisso dalla ATP citrato liasi (ACLY) in ossalacetato e acetil-CoA con una reazione ATP- e CoA-dipendente. L'ossalacetato citosolico viene quindi ridotto a malato dall'enzima malato deidrogenasi 1 (MDH1), e quest'ultimo metabolita rientra nel mitocondrio tramite trasportatore mitocondriale dei dicarbossilati (DIC) o il carrier mitocondriale del 2-ossoglutarato/malato²⁵, entrambi antiporti, oppure viene convertito a piruvato dall'enzima malico (ME1) e rientra tramite il carrier del piruvato mitocondriale. Per quanto riguarda il traffico in uscita, viene utilizzato lo shuttle della carnitina: l'enzima carnitina O-acetiltransferasi (CRAT) mitocondriale converte L-carnitina in acetil-L-carnitina, che condivide con la carnitina libera la capacità di guidare l'antiporto CACT, già citato nel capitolo 1.2 come via di ingresso per l'acil-carnitina. Il processo termina nel citosol dove una variante di CRAT rigenera acetil-CoA e L-carnitina²⁶. CRAT si configura quindi come una valvola di sfogo. Nel muscolo scheletrico la sua attività è critica per la tolleranza glucidica sistemica, verosimilmente perché esporta l'acetil-CoA in eccesso dalla matrice e previene l'inibizione da

substrato del complesso enzimatico del piruvato deidrogenasi²⁷. Il gradiente netto di acetil-CoA non è solo legato ai livelli di consumo e sintesi nei due compartimenti, ma anche dall'attività del trasportatore del citrato, che viene stimolato da fattori trascrizionali pro-infiammatori come NF-KB e STAT1²⁸, oltre che dall'attività di ACLY, a sua volta regolata da pathways oncogenici che verranno approfonditi in seguito. La traslocazione del citrato implica la rimozione di un intermedio del ciclo di Krebs, da cui la necessità di una via anaplerotica per rigenerare ossalacetato²⁹, via che consiste nell'ossidazione della glutammina, alterata in ambito oncologico e trattata nel capitolo 2.2

1.7 Il pool nucleare

Oltre al pool citosolico e a quello mitocondriale, occorre fare alcune precisazioni sul pool nucleare di acetil-CoA. Come stabilito infatti nel capitolo 1.3, i pori nucleari sono liberamente permeabili all'acetil-CoA tanto da poter definire il pool come “nucleo-citosolico”, e la conseguenza logica dovrebbe essere una piena condivisione dell'acetil-CoA tra nucleo e citosol. L'evidenza sperimentale tuttavia mostra una situazione più complessa, infatti è documentato come nei fibroblasti embrionali murini *Acly*^{-/-}, l'acetato esogeno a concentrazione fisiologica di 100 μ M ripristina la sintesi degli acidi grassi e la produzione di malonil-CoA ma non l'acetilazione istonica, che torna ai livelli normali solo a concentrazioni dieci volte superiori, indicando quindi un flusso non unicamente concentrazione dipendente come ipotizzabile in funzione della permeabilità dei pori nucleari³⁰. In condizioni ipossiche e prive di siero, coerenti peraltro con il microambiente tumorale, è stato dimostrato che ACSS2 trasloca nel nucleo, dove usa prevalentemente l'acetato derivante da deacetilazione istonica piuttosto che il pool radiomarcato esterno al nucleo³¹. Queste evidenze indicano che nonostante la presenza di un unico pool nucleo-citosolico, ci sia una preferenza per l'acetil-CoA prodotto in prossimità del luogo di utilizzo, ossia una separazione funzionale contrapposta a libera permeabilità fisica. Questa preferenza per l'acetil-CoA locale è anche coerente con l'esistenza di enzimi produttori nucleari, ossia ACLY nucleare, che produce acetil-CoA presso le rotture del DNA a doppio filamento, come verrà approfondito nel capitolo 4.3 e il sopracitato ACSS2 nucleare, che ricicla l'acetato prodotto dalle reazioni di deacetilazione. A questi si aggiunge il complesso della PDC nucleare, infatti tutte le subunità del complesso mitocondriale sono presenti

anche nel nucleo in risposta a stress mitocondriale, segnalazioni da fattori di crescita e stimoli differenziativi³². Il complesso della PDC nucleare presenta inoltre, la particolarità di traslocare nel nucleo mediante ancoraggio mitocondrio-nucleo mediato dalla proteina mitofusina 2 (MFN2), senza passare dai pori³³. Un'ulteriore peculiarità del pool nucleare è che alcuni siti istonici, come H3K23, si trovano in uno stato quasi costantemente acetilato, motivo per cui è plausibile che non abbiano un ruolo regolatorio ma di serbatoio di gruppi acetilici, da cui attingere per acetilare i siti regolatori chiave³⁴. La conseguenza logica dell'esistenza di queste riserve istoniche è la domanda, ancora aperta, se anche altri siti istonici acetilati in caso di condizioni di carenza energetica siano usati come tampone metabolico e delle eventuali conseguenze della rimozione dei suddetti residui di acetile.

1.8 L'acetil-CoA come secondo messaggero

Nonostante per secondo messaggero in senso stretto si intendano molecole come cAMP, Ca^{2+} , IP_3 , DAG, prodotte in risposta ad un primo messaggero che si lega a un recettore, con effetti dedicati e una funzione specificamente di segnalazione, è possibile considerare l'acetil-CoA come un "metabolita di segnalazione" che veicola informazioni sullo stato metabolico verso sistemi effettori¹. Rispetto all'ATP, il cui livello viene mantenuto relativamente stabile per garantire l'omeostasi bioenergetica, l'acetil-CoA varia ampiamente in risposta a stimoli intra- ed extracellulari, come documentato anche nel corso dello sviluppo embrionale³⁵. Uno dei primi parametri a cui risponde la cellula è proprio la fluttuazione della concentrazione di acetil-CoA. Questa è stata infatti misurata in colture di cellule tumorali in un intervallo compreso tra 3–20 μM , e molte acetil-transferasi hanno una K_d verso l'acetil-CoA nell'ordine del basso micromolare o dell'alto nanomolare, coerente con l'intervallo in cui il metabolita fisiologicamente oscilla. Questo permette di affermare che una variazione di concentrazione di substrato si traduce direttamente in una variazione di velocità di reazione e quindi in una risposta adattiva³⁶. La seconda variabile che viene "letta" dalla cellula è invece il rapporto acetil-CoA/CoA più che la concentrazione assoluta, infatti le KAT, ossia la lisina acetiltransferasi che trasferiscono un gruppo acetile su un residuo di azoto, usando acetil-CoA come donatore e liberando CoA, di conseguenza, sono inibite dal proprio prodotto, ossia il CoA, con sensibilità variabile³⁷. Occorre quindi stabilire cosa faccia oscillare i livelli di acetil-CoA, e questo è stato studiato *in*

vitro, dove cellule tumorali umane incubate in un terreno privo di siero e nutrienti, hanno manifestato un crollo di acetil-CoA prima di ATP e NADH, entro trenta minuti, e il calo è più marcato nella frazione citosolica che nell'estratto totale, il pool mitocondriale ha subito infatti una variazione minore, per quanto significativa³⁸. *In vivo* invece è stato documentato come nel topo a digiuno da 24 ore si è osservata una riduzione dell'acetil-CoA totale in cuore e muscolo, con riduzione dell'acetilazione proteica, rimanendo invariato a livello cerebrale e aumentato nel fegato, a causa della mobilitazione del grasso sottocutaneo e la conseguente attivazione della β -ossidazione. Una stessa condizione sistemica produce quindi risposte opposte a seconda dei tessuti, riproponendosi come una versione macroscopica del principio di compartimentazione, già discusso nel capitolo 1.3³⁸. L'acetil-CoA quindi fluttua in un intervallo ampio, viene letto da enzimi con un'affinità che cade nell'intervallo di fluttuazione e la sua variazione ha conseguenze funzionali documentate. Queste condizioni sono coerenti con la trasmissione di informazioni e giustificano la definizione di secondo messaggero proposta da Pietrocola e collaboratori⁴. Resta però una differenza fondamentale che rende l'acetil-CoA de facto diverso dai secondi messaggeri in senso stretto, l'acetil-CoA viene infatti fisicamente incorporato nel substrato che modifica, rendendo l'acetilazione, trattata nel prossimo paragrafo, una modalità di trasmissione stechiometrica piuttosto che una cascata di segnalazione preposta all'amplificazione di un segnale iniziale.

1.9 Acetilazione proteica: le basi

L'acetilazione proteica rappresenta una tra le modifiche post traduzionali più rilevanti, e consiste per l'appunto nel trasferimento del gruppo acetilico dall'acetil-CoA all'azoto ϵ della lisina. Questo ha due implicazioni di tipo fisico immediato, ossia la neutralizzazione della carica positiva della lisina e l'aumento dell'ingombro sterico³⁹. In linea generale il processo di acetilazione è chimicamente reversibile ma per completezza occorre almeno citare l'esistenza dell'acetilazione catalizzata dalle N-acetiltransferasi (NAT) sull'azoto α del residuo N-terminale, questo è un fenomeno di tipo co-traduzionale e sostanzialmente irreversibile⁴⁰. Il processo di acetilazione viene effettuato dalle lisin-acetiltransferasi (KAT); queste sono codificate da 22 sequenze nel genoma umano, presentano una specificità di substrato marcata e sono suddivise in tre famiglie ossia N-acetiltransferasi correlate a Gcn5 (GNAT), famiglia MYST e

fattori di trascrizione p300/CBP. Il processo inverso viene invece svolto dalle deacetilasi, divise in due famiglie distinte in termini di cofattori, ossia le HDAC zinco-dipendenti, classi I, II e IV e le sirtuine classe III, che richiedono obbligatoriamente NAD^+ come cofattore⁴¹. Le HDAC zinco-dipendenti catalizzano una semplice idrolisi, mentre ogni evento di deacetilazione mediato dalle sirtuine scinde una molecola di NAD^+ producendo nicotinammide e 2'-O-acetil-ADP-ribosio. Occorre anche ricordare l'esistenza di una forma di acetilazione non enzimatica, a livello della matrice mitocondriale troviamo infatti un ambiente alcalino, tale per cui le molecole di lisina presenti sono acetilate in modo spontaneo. In questo contesto, tuttavia, è presumibile che il donatore non sia l'acetil-CoA ma l'acetil-fosfato. L'acetilazione mitocondriale rimane un campo in fase di studio, infatti si conoscono pochissime KAT, mentre è più chiaro che la regolazione dell'acetiloma sul lato della rimozione avvenga ad opera di SIRT3⁴². Questo implica che la deacetilazione mitocondriale, che necessita di NAD^+ in proporzioni stechiometriche, sia direttamente influenzata dallo stato redox, nello specifico dal rapporto NAD^+/NADH e del flusso catabolico. Un aumento del rapporto NAD^+/NADH che accompagna stati di restrizione energetica promuovono infatti la deacetilazione istonica stimolando l'attività delle sirtuine⁴¹. Gli enzimi deputati all'acetilazione mostrano una distribuzione compartimentata simile all'acetil-CoA; EP300 e SIRT1 operano infatti a livello di nucleo e citosol, la prima acetilando e la seconda deacetilando, mentre SIRT3 si trova, come precedentemente mostrato, essenzialmente a livello mitocondriale⁴¹. L'acetilazione proteica ha una serie di conseguenze fondamentali per la proteina che verranno approfondite nel quinto capitolo e che nel complesso sono raggruppabili in quattro categorie: attività catalitica, stabilità, localizzazione subcellulare e capacità di interagire con altre molecole. I meccanismi mediante cui viene prodotto l'effetto finale sono di tipo fisico, ossia la sopracitata neutralizzazione di carica e un aumento di ingombro sterico, per reclutamento di proteine "lettrici" o *reader* in grado di riconoscere le lisine acetilate e per competizione con altre modifiche. Un residuo di lisina acetilato, per quanto reversibilmente, non sarà più in grado di ricevere altre modifiche sullo stesso azoto come ubiquitinazione e metilazione.

1.10 L'acetilazione istonica e accessibilità della cromatina

L'acetilazione istonica rappresenta una delle modifiche epigenetiche più rilevanti e verrà approfondita nel quarto capitolo, ma in un contesto di inquadramento generale sul ruolo biologico dell'acetil-CoA non può essere omissivo almeno di introdurre le basi. Le code istoniche sono ricche di lisina e presentano per questo motivo una carica positiva netta, che permette un'adesione allo scheletro fosfodiesterico del DNA, carico invece negativamente. Questa carica positiva viene neutralizzata tramite l'acetilazione, riducendo così l'interazione elettrostatica istone/DNA e decomprimendo di conseguenza la cromatina, che diventa così accessibile alla macchina trascrizionale. L'aspetto cruciale, empiricamente dimostrato, è che l'acetilazione istonica e quindi l'espressione genica in molti tipi cellulari è molto sensibile alla disponibilità di acetil-CoA. Un'evidenza sperimentale a sostegno di questa affermazione è stata ottenuta mediante la delezione dell'acetil-CoA sintetasi nucleo-citosolica nel lievito, da cui un crollo dell'acetilazione istonica e della trascrizione genica in generale⁴³. Nelle cellule di mammifero, invece, il silenziamento dell'ATP-citrato liasi (ACLY) riduce l'acetilazione istonica e priva gli istoni del carbonio di origine glucidica⁴⁴. Lo stesso lavoro mostra che la dipendenza dell'acetilazione istonica dal carbonio glucidico si osserva anche durante il differenziamento cellulare, dove le variazioni del flusso glicolitico modificano i livelli di acetil-CoA e con essi l'acetilazione degli istoni⁴⁴. Complessivamente è quindi possibile affermare che alti livelli di acetilazione istonica servono sia a sostenere la trascrizione globale, sia alla transattivazione preferenziale di gruppi di geni specifici, tra cui quelli che codificano proteine coinvolte nella crescita e replicazione, nella glicolisi, e nella risposta allo stress ossidativo, aspetti che saranno approfonditi nei capitoli seguenti.

1.11 Acetil-CoA, autofagia e morte cellulare

L'ultimo aspetto, comunque fondamentale, è il ruolo dell'acetil-CoA nel contesto della morte cellulare. La deplezione di acetil-CoA nucleo-citosolico attiva, infatti, l'enzima AMP Kinasi (AMPK) e inibisce il complesso proteico mTORC1, da cui si verifica un arresto dell'anabolismo e l'induzione dell'autofagia. Il ruolo dell'acetil-CoA come inibitore endogeno dell'autofagia è stato provato sperimentalmente ripristinando il pool nucleo-citosolico mediante microiniezioni dirette in cellule umane in stato di digiuno³⁸. Il meccanismo di inibizione dell'autofagia avviene su due livelli: il primo è

la riduzione dell'attività della lisin-acetiltransferasi EP300 e il secondo, più a valle, è l'inibizione di diverse proteine della macchina autofagica tra cui ATG5, ATG7 e ATG12, quando acetilate da EP300 o la loro attivazione quando deacetilate da SIRT1³⁸. Il rapporto acetil-CoA/CoA sembra influenzare inoltre la propensione alla morte cellulare regolata, apoptosi caspasi-dipendente e necrosi regolata, per quanto le evidenze in tal senso debbano ancora essere consolidate⁴.

Capitolo 2

La riprogrammazione metabolica della cellula tumorale

La cellula tumorale presenta una serie di peculiarità metaboliche, ed essendo il metabolismo cellulare fortemente interconnesso sarebbe riduttivo concentrarsi unicamente sul metabolismo dell'acetil-CoA senza fornire quantomeno un inquadramento sulle altre alterazioni metaboliche più rilevanti. In questo breve capitolo si fornirà un quadro generale sulla riprogrammazione metabolica tumorale e su come gli altri pathways interagiscono con quello dell'acetil-CoA.

2.1 Effetto Warburg e glicolisi aerobia

L'«effetto Warburg» è probabilmente la più nota e studiata alterazione metabolica nelle cellule tumorali; descritta negli anni Venti e riproposta da Warburg nel 1956 come conseguenza di un danno irreversibile della respirazione mitocondriale, ritenuta erroneamente compromessa nel tumore⁴⁵. Il fenomeno consiste nella fermentazione del glucosio a lattato, ed è un fenotipo metabolico quasi ubiquitario tra le cellule tumorali. La resa energetica è molto più bassa rispetto all'ossidazione completa; infatti, si ottengono solo 2 molecole di ATP rispetto a 30/32, a seconda di come siano valutati i costi di trasporto. Il lattato prodotto viene quindi esportato mediante i trasportatori monocarbossilici (MCT), che rappresentano a loro volta un bersaglio terapeutico possibile⁴⁶. Il glucosio entra nella cellula attraverso i trasportatori GLUT e viene immediatamente fosforilato dall'esochinasi a glucosio-6-fosfato, forma impermeabile alle membrane. Nella fase successiva la gliceraldeide-3-fosfato deidrogenasi ossida il proprio substrato riducendo NAD^+ a NADH, generando un debito di potere riducente che dovrà essere saldato. Seguono due reazioni che generano ATP per fosforilazione a livello di substrato, catalizzate rispettivamente dagli enzimi fosfoglicerato chinasi e piruvato chinasi. Al netto dei due ATP consumati nella fase preparatoria, il bilancio complessivo è di due molecole di ATP, due di NADH e due di piruvato per ciascuna molecola di glucosio. Come anticipato la glicolisi consuma NAD^+ e si arresterebbe entro pochi cicli se questo non venisse rigenerato. In condizioni ossidative il compito spetta al mitocondrio, mentre nella fermentazione lattica il problema viene risolto ad opera dell'enzima lattato deidrogenasi che riduce il piruvato a L-lattato ossidando contestualmente NADH a NAD^+ . Il piruvato può essere ridotto a lattato dall'enzima lattato deidrogenasi (LDHA) a livello citosolico oppure

entrare nel mitocondrio tramite il trasportatore MPC ed essere decarbossilato ossidativamente dal complesso del piruvato deidrogenasi a dare acetil-CoA. La ripartizione del flusso di piruvato dipende dall'attività relativa degli enzimi: in condizioni ipossiche il fattore di trascrizione HIF-1 α induce l'aumento di espressione della piruvato deidrogenasi chinasi (PDK), la quale fosforila e inattiva il PDC. Il flusso verso l'acetil-CoA mitocondriale viene chiuso attivamente. HIF-1 α induce inoltre LDH isoforma A, spingendo così il piruvato verso il lattato in modo netto.⁴⁷ Il risultato complessivo è che nella cellula tumorale una quota rilevante del carbonio glucidico viene sottratta all'ossidazione mitocondriale in un contesto di maggiore domanda di acetil-CoA, e si pone il problema di definire da dove provenga il carbonio che soddisfa quella domanda, a cui si cercherà di rispondere nel terzo capitolo

2.2 Metabolismo della glutammina e carbossilazione riduttiva

La glutammina e il suo metabolismo sono di fondamentale rilevanza nelle cellule tumorali: oltre ad essere l'amminoacido più abbondante a livello plasmatico è anche il secondo nutriente più consumato in coltura dopo il glucosio come fornitore sia di carbonio e sia di azoto.⁴⁸ La glutammina entra tramite il trasportatore ASCT2, indotto dal fattore di trascrizione codificato da MYC e da mTORC1, per poi essere idrolizzata a glutammato ed ammoniaca, dalle glutaminasi GLS1 e GLS2. L'azoto amidico della glutammina viene ceduto direttamente dalle amidotransferasi alla sintesi dei nucleotidi, mentre quello amminico del glutammato è trasferito per transaminazione agli amminoacidi non essenziali; l'ammoniaca libera è in larga parte escreta. L'inibizione di GLS1 e 2 ha un potenziale effetto antineoplastico in fase di studio, ma per ora l'efficacia sembra dipendente dalle condizioni di coltura⁴⁶. Il glutammato può essere anche convertito a α -chetoglutarato da glutammato deidrogenasi o transaminasi, e l' α -chetoglutarato entra nel ciclo di Krebs rifornendolo. Questa è una delle vie anaplerotiche più rilevanti e va a colmare il fabbisogno dato dalla deplezione di citrato descritta precedentemente nel capitolo 1.6. Occorre anche ricordare che in base alle necessità metaboliche è possibile anche che avvenga la carbossilazione riduttiva, mediata dai medesimi enzimi, che porta alla produzione invece che al consumo di citrato⁴⁹. Il citrato prodotto rappresenta il punto di contatto tra metabolismo della glutammina e metabolismo dell'acetil-CoA: il citrato può essere infatti esportato dal trasportatore CTP e scisso da ACLY in ossalacetato e acetil-CoA⁴⁸.

A questa via si affianca anche una variante interamente citosolica, dove il glutammato viene convertito a α -chetoglutarato dall'enzima glutammato deidrogenasi (GLUD1) oppure, per transaminazione con l'ossalacetato, dall'aspartato aminotransferasi (GOT1). L'isocitrato deidrogenasi (IDH1) citosolica lo carbossila riduttivamente a isocitrato e l'aconitasi lo isomerizza a citrato, che sarà poi scisso dall'ATP citrato liasi in acetil-CoA e ossalacetato⁴⁹. La rilevanza di questa via è legata a tre condizioni precise, spesso ricorrenti nella massa tumorale. La prima è la compromissione dell'ingresso mitocondriale del piruvato: quando il piruvato non raggiunge la matrice il metabolismo della glutammina mantiene attivo il ciclo degli acidi tricarbossilici e la sopravvivenza cellulare²⁹. La seconda è invece l'ipossia, in cui la carbossilazione riduttiva appena descritta operata da IDH1 alimenta direttamente la lipogenesi, mentre la terza è la presenza di difetti mitocondriali, dove la carbossilazione riduttiva è sufficiente a sostenere la crescita cellulare nonostante la compromissione della catena respiratoria⁴⁸. Queste tre condizioni non sono mutualmente esclusive, ma spesso presenti in contemporanea nella cellula tumorale, e la carbossilazione riduttiva della glutammina è in grado di fornire parte della quota di carbonio sottratta dalla glicolisi, fornendo una prima risposta parziale in merito alla provenienza del carbonio necessario a soddisfare la domanda di acetil-CoA.

2.3 Via della serina e della glicina, metabolismo monocarbonioso

Il metabolismo della serina rispetto a quelli presi in considerazione precedentemente ha un legame meno diretto all'omeostasi dell'acetil-CoA. Pur non fornendo direttamente carbonio all'acetil-CoA fornisce tuttavia NADPH, senza cui l'acetil-CoA non può essere convertito in lipidi e senza cui non è peraltro possibile che avvenga la carbossilazione riduttiva citata nel paragrafo precedente. La serina può essere importata dall'ambiente esterno o essere sintetizzata dal 3-fosfoglicerato⁵⁰; il primo passaggio di questa via è catalizzato dalla fosfoglicerato deidrogenasi, spesso overespressa nel carcinoma mammario⁵¹ e nel melanoma. Ricopre inoltre un ruolo metabolico molto rilevante, essendo il terzo metabolita più consumato dopo glucosio e la glutammina. Il ruolo principale della serina è quello di fornire unità monocarboniose. Infatti, la serina idrossimetiltransferasi converte la serina in glicina liberando un'unità monocarboniosa; in questo contesto vale la pena sottolineare che la glicina, nonostante sia il prodotto della serina, non può sostituire direttamente la

serina come donatore di carbonio.⁵² Il destino metabolico del pool monocarbonioso dipende in parte dal compartimento cellulare di origine: citosol e mitocondrio mantengono pool distinti di unità monocarboniose e di NADPH, con contributi differenti alle vie biosintetiche che li utilizzano⁵³. Il carbonio ceduto dalla serina può anche essere completamente ossidato ad anidride carbonica, fornendo in questo caso non un precursore ma potere riducente sotto forma di NADPH. La via dei pentosi fosfati e il metabolismo monocarbonioso sono le due principali fonti di NADPH cellulare⁴⁶, fornendo come detto un contributo indiretto ma rilevante alla trasformazione in biomassa dell'accumulo di acetil-CoA come verrà chiarito nei seguenti capitoli.

2.4 Metabolismo dell'arginina e auxotrofie tumorali

Il metabolismo dell'arginina e le altre auxotrofie tumorali hanno legame più debole con l'acetil-CoA, ma sono una forma di riprogrammazione metabolica peculiare della cellula tumorale che merita almeno una breve contestualizzazione. Arginina e ornitina hanno una rilevanza per la cellula tumorale che va oltre la semplice sintesi proteica. Esse sono infatti utilizzate su due fronti indipendenti: le poliammine e l'auxotrofia. Le poliammine nei mammiferi sono, in sequenza biosintetica: putrescina, spermidina e spermina. Il loro primo ruolo biologico è la stabilizzazione degli acidi nucleici, sono infatti in grado di legare lo scheletro fosfodiesterico in quanto policationi facilitando le transizioni conformazionali richieste da trascrizione e replicazione. La spermidina invece è nello specifico il donatore obbligato del gruppo amminobutilico per l'ipusinazione dell'eukaryotic translation initiation factor 5A (eIF5A), una modifica post-traduzionale che non esiste su nessun'altra proteina. In aggiunta le poliammine sono legate infine al ciclo cellulare e la loro deplezione arresta infatti le cellule in fase G₁⁵⁴. La loro sintesi avviene mediante la conversione dell'arginina in ornitina da parte dell'arginasi, cui segue l'azione dell'ornitina decarbossilasi che ne avvia la conversione in poliammine. La difluorometilornitina è un inibitore irreversibile dell'ornitina decarbossilasi, ma ha fallito come agente singolo in più sperimentazioni cliniche⁵⁵. I punti di contatto metabolici tra poliammine e acetil-CoA sono fondamentalmente due: la spermidina/spermina N¹-acetiltransferasi che le acetila consumando acetil-CoA citosolico, per facilitarne la secrezione⁵⁶, e la spermidina compete con l'acetil-CoA per il legame alla lisin-acetiltransferasi della famiglia p300/CBP, uno degli attivatori trascrizionali più importanti (P300), innalzando la

concentrazione di substrato necessaria all'attività ottimale dell'acetiltransferasi⁵⁷. Il secondo contesto di rilevanza è l'auxotrofia. In molti tumori l'argininosuccinato sintasi è silenziata epigeneticamente, il che rende la cellula dipendente dall'apporto esogeno di arginina. Questa dipendenza è stata studiata come bersaglio terapeutico, sfruttando enzimi capaci di degradare l'arginina circolante.⁵⁸ Lo step metabolico successivo nel ciclo dell'urea dopo l'intervento dell'argininosuccinato sintasi dovrebbe essere la reazione catalizzata dall'argininosuccinato liasi, ma in alcune forme neoplastiche abbiamo un accumulo di fumarato tale da invertire questa reazione. Questo porta quindi l'argininosuccinato liasi, a compiere la reazione inversa e quindi invece di scindere l'argininosuccinato in arginina e fumarato, lo sintetizza a partire da questi ultimi⁵⁹. Il meccanismo mostra chiari parallelismi con la carbossilazione riduttiva, ma la conseguenza non è solo metabolica ed il fumarato accumulato agisce anche da segnale, come sarà mostrato nel paragrafo seguente.

2.5 Oncometaboliti, succinato e fumarato

Alcuni intermedi metabolici, oltre a fornire carbonio e potere riducente, svolgono una funzione di segnalazione. Questa proprietà è stata evidenziata in diversi studi in cui la perdita di enzimi appartenenti al ciclo degli acidi tricarbossilici portava ad un conseguente accumulo di intermedi specifici che sottendono a diversi effetti sull'omeostasi cellulare che vanno oltre il semplice deficit energetico⁶⁰. Il caso meglio caratterizzato riguarda la perdita dell'enzima succinato deidrogenasi o della fumarato idratasi, da cui deriva l'accumulo di succinato e fumarato. Entrambi sono analoghi strutturali dell' α -chetoglutarato e ne occupano il sito attivo sugli enzimi della classe delle diossigenasi α -chetoglutarato-dipendenti⁶¹. Questo ha implicazioni in due diversi contesti, ossia la risposta all'ipossia e i profili di metilazione dell'epigenoma. Le prolil-idrossilasi che marcano il fattore di trascrizione HIF1 α appartengono infatti a questa famiglia, e la loro inibizione stabilizza HIF1 α anche in condizioni di normale ossigenazione, da cui deriva una condizione descritta come pseudo-ipossia⁶². Alla stessa famiglia appartengono anche le demetilasi istoniche e le idrossilasi della 5-metilcitosina, motivo per cui l'accumulo di succinato o fumarato si traduce in un'alterazione dell'epigenoma⁶⁰. Il rapporto di questi metaboliti con l'acetil-CoA può essere ricavato richiamando quanto affermato nel paragrafo sull'effetto Warburg. Come spiegato, la stabilizzazione di HIF-1 α induce la piruvato deidrogenasi chinasi,

che fosforila e inattiva il complesso della piruvato deidrogenasi, da cui una riduzione della produzione di acetil-CoA. Questi esempi mostrano anche come l'accumulo o la carenza di un metabolita possano influenzare l'espressione genica, creando un parallelismo con quanto trattato nel quarto capitolo in merito all'impatto epigenetico dell'acetil-CoA.

Capitolo 3

Produzione di acetil-CoA nel tumore: enzimi, regolazione, lipogenesi de novo

Poste le basi teoriche generali, è possibile procedere in un ambito più specialistico riguardante il ruolo di acetil-CoA in ambito tumorale. In linea generale nella cellula tumorale è presente acetil-CoA in quantità abbondanti, tranne un caso particolare che sarà approfondito in seguito, motivo per cui occorre mostrare come la cellula tumorale gestisca il proprio approvvigionamento di acetil-CoA. Questo capitolo inoltre introduce anche una serie di possibili target farmacologici, e mostra l'eterogeneità metabolica tumorale, rilevante per i capitoli 6 e 8.

3.1 ATP citrato liasi

Il primo enzima preso in considerazione è l'ATP citrato liasi (ACLY); questa proteina converte il citrato di origine mitocondriale in acetil-CoA citosolico, rendendo così disponibile il carbonio glucidico per lipogenesi e acetilazione. I geni che codificano per ACLY, ACSS2, ACC1 e ACC2, sono regolati insieme agli altri geni lipogenici, dai fattori di trascrizione SREBP, ossia *sterol regulatory element-binding proteins*, che consistono in una famiglia di fattori di trascrizione preposti al controllo della sintesi degli acidi grassi⁶³. In linea generale questi fattori di trascrizione sono attivati in risposta alla deplezione del pool di steroli e l'espressione di ACLY si accompagna quindi a quella degli enzimi che ne utilizzano il prodotto. Nella cellula tumorale questo controllo viene esercitato anche da altri segnali oltre allo stato lipidico: fra i pathways con maggiore frequenza di alterazione nelle neoplasie umane troviamo infatti la via della Phosphoinositide 3-kinase (PI3K)/Protein Kinase B, nota anche come PI3K/AKT, cascata di trasduzione attivata da fattori di crescita e insulina, che converge sugli SREBP stimolando mTORC1 (mechanistic target of rapamycin) e inibendo GSK3 β (Glycogen Synthase Kinase-3 beta). Il primo è un complesso chinasi con il ruolo di promuovere reazioni anaboliche in funzione dello stato nutrizionale e dei fattori di crescita⁶⁴, mentre la seconda è una chinasi che induce la degradazione di SREBP⁶⁵. Nel complesso il risultato sarà un cambio nell'induzione della sintesi lipidica, che se nella cellula sana è regolata in via maggioritaria dalla presenza di lipidi, in quella tumorale sarà indotta anche da stimoli di tipo proliferativo. L'abbondanza di lipidi nell'ambiente non sarà quindi più un freno per la sintesi lipidica, ma sarà

costitutivamente attiva nel fenotipo trasformato. Occorre ricordare come oltre che nei fenotipi caratterizzati da deregolazione della via PI3K/AKT, l'iperattività di ACLY è riscontrata anche in quelli guidati da un'espressione aberrante di MYC, dove la lipogenesi *de novo* non solo è più intensa ma anche necessaria alla crescita neoplastica⁶⁶. La discussione del comportamento di ACLY in ambito neoplastico non può prescindere da un'analisi delle modifiche post-traduzionali più caratterizzanti. La prima e più studiata è la fosforilazione della serina 455, substrato della protein-chinasi A (PKA), di AKT e della *branched-chain ketoacid dehydrogenase kinase*, comunemente chiamata BCKDK⁶⁷. Nell'ottica di quanto già discusso quest'ultima merita attenzione in quanto è la stessa chinasi che inattiva il complesso BCKD, citato nel capitolo 1.2 e responsabile del catabolismo degli amminoacidi ramificati. Quindi la produzione citosolica di acetil-CoA e il catabolismo degli amminoacidi ramificati sono coordinati da uno stesso enzima regolatore. L'effetto funzionale della fosforilazione è stato caratterizzato su enzima ricombinante, dove essa produce un aumento di sei volte della velocità massima e abolisce la cooperatività negativa nei confronti del citrato, rendendo la dipendenza dal substrato iperbolica anziché sigmoidale⁶⁸. A questa prima modifica post-traduzionale se ne affiancano altre, forse meno caratterizzate ma con impatto maggiore in contesto oncologico. La prima è l'**acetilazione** sulle lisine 540, 546 e 554, indotta da concentrazioni di glucosio elevate, che stabilizza l'enzima e promuove la sintesi lipidica e la crescita tumorale⁶⁹. Questa modificazione post traduzionale può anche essere considerata come un esempio di retroazione positiva: stabilizza infatti l'enzima che produce acetil-CoA, necessario per la modifica stessa. A questa si aggiungono sia l'**ubiquitinazione** sugli stessi residui da parte della ligasi CUL3–KLHL25, i cui livelli sembrano correlare negativamente con quelli di ACLY nel carcinoma polmonare⁷⁰ e sia la **fosforilazione sulla tirosina** ad opera di Lck/Yes *novel tyrosine kinase*, nota anche come Lyn, marcatore nella leucemia mieloide acuta⁷¹. Un'ultima considerazione su ACLY in ambito oncologico è l'esistenza di una correlazione tra la sua espressione e una peggiore prognosi in alcune tipologie tumorali. Essa risulta infatti sovraespressa in diverse tipologie tumorali, tra cui la leucemia mieloide acuta⁷² e il carcinoma mammario, dove l'elevata espressione sembra essere direttamente proporzionale alla probabilità di recidive.⁷³

3.2 Acetato come nutriente di riserva

In condizioni ipossiche la sintesi degli acidi grassi rimane elevata, ma il contributo del glucosio alla lipogenesi cala drasticamente, motivo per cui occorre una fonte di carbonio alternativa¹⁰. La carenza di ossigeno, il dirottamento metabolico verso la glicolisi e l'acidificazione sono le tre condizioni necessarie, e spesso presenti a livello tumorale, a rendere l'acetato un fondamentale nutriente di riserva mediante l'induzione di ACSS2 o acil-CoA sintetasi a catena corta⁷⁴. Nello specifico vale la pena puntualizzare che l'acidificazione è sostenuta dall'efflusso del lattato attraverso i trasportatori monocarbossilici, che nel processo espellono anche un protone. Questo non è altro che lo smaltimento degli scarti prodotti dal processo fermentativo descritto nel capitolo 2.1. Quindi la cellula stessa dirottando il piruvato verso il lattato crea quindi una delle tre condizioni necessarie all'utilizzo dell'acetato come nutriente acidificando l'ambiente circostante. A livello di regolazione trascrizionale ACSS2 è indotta da SREBP2, isoforma dell'enzima SREBP citato nel paragrafo precedente, in condizioni ipossiche e di acidosi: sono state infatti documentate anche interazioni sinergiche tra la segnalazione *Hypoxia-inducible factor* (HIF) e quella di SREBF2⁷⁵. Le modifiche post- traduzionali rilevanti sono due, con effetti diversi: SIRT1, deacetilasi già citata nel capitolo 1.9, attiva infatti ACSS2 deacetilandola sulla lisina 661⁷⁶, mentre AMPK la fosforila sulla serina 659, cosa che sembrerebbe esporre un segnale di localizzazione nucleare⁷⁷. In questo contesto si può notare come la deacetilazione da parte di una sirtuina vada ad attivare un enzima produttore di acetil-CoA, mentre l'acetilazione stabilizza ACLY, come spiegato nel paragrafo precedente. Questo meccanismo regolatorio indica come il volume complessivo di acetil-CoA rimanga costante ma sia ridistribuito tra la via dell'acetato e quella del citrato. L'identificazione di ACSS2 in condizioni ipossiche come enzima rilevante è stata validata in diverse linee cellulari: in uno screening sulla perdita di funzione condotto su 66 geni del metabolismo lipidico, in otto linee di carcinoma mammario e tre di carcinoma prostatico ACSS2 è risultato il gene il cui silenziamento compromette maggiormente la crescita cellulare. L'effettivo contributo è stato misurato mediante tracciamento isotopico, infatti in normossia e abbondanza di lipidi l'acetato marcato andava a costituire circa il 10% del pool di acetil-CoA, mentre in contesti ipossici e di stress metabolico la quota marcata raggiungeva il 50%, segno inequivocabile dell'induzione di ACSS2 nelle condizioni sopra indicate.¹⁰ *In vivo* l'elevata espressione di ACSS2 è stata riscontrata in forme tumorali

metastatiche e circa il 40% dei carcinomi duttali invasivi metastatici presenta ACSS2 a livelli elevati, ed è più elevata anche nel carcinoma prostatico metastatico rispetto che nel tumore primitivo.¹⁰ Un'ultima puntualizzazione va effettuata citando la differenza prognostica in diversi tipi di tumore: mentre nel carcinoma alla cervice, renale⁷⁸ e nei gliomi di grado II e III⁷⁹ un'espressione elevata sembra correlata a scarsa sopravvivenza, nel carcinoma epatico e coloretale un'espressione bassa è associata a fenotipi più aggressivi^{80,81}, mostrando ancora una volta quanto sia complesso e a tratti apparentemente incoerente il fenomeno della proliferazione tumorale.

3.3 ACSS1 e ACSS3 mitocondriali

ACSS1 e ACSS3, a differenza di ACSS2, sono enzimi espressi a livello mitocondriale, dove come la controparte citosolica producono acetil-CoA a partire dall'acetato. L'acetil-CoA così prodotto viene quindi destinato al ciclo di Krebs e alla produzione di ATP piuttosto che alla lipogenesi e all'acetilazione nucleo-citosolica. Alla differente distribuzione cellulare corrisponde anche una diversa distribuzione tissutale. ACSS1 è infatti espressa soprattutto nei tessuti ossidativi come cuore, muscolo scheletrico e tessuto adiposo bruno. Questo dato trova conferma sperimentale, riportata in letteratura secondaria, nel fatto che l'acetato marcato somministrato a tessuto cardiaco sano risulti in quota maggiore ossidato, mentre nel tessuto tumorale venga prevalentemente incorporato nei lipidi.⁸² La regolazione di questi enzimi viene gestita mediante deacetilazione da SIRT3, la deacetilasi mitocondriale, con un meccanismo che ricalca la regolazione di ACSS2 ad opera di SIRT1, fornendo un esempio di logica regolatoria comune e esecuzione compartimentalizzata⁷⁶. Nonostante questi enzimi non siano tra i più caratterizzati, ci sono evidenze solide del loro ruolo in ambito tumorale: ACSS1 ad esempio è sovraespressa nell'osteosarcoma e la sua espressione correla negativamente con la sopravvivenza globale e con quella libera da metastasi polmonari.⁸³ Nel carcinoma mammario inoltre ACSS1 tende ad essere sovraespresso e correlare con resistenza alla radioterapia; il meccanismo specifico coinvolge anche l'accoppiamento tra ROS e piruvato e sarà discusso nel capitolo 8.¹⁸⁴

3.4 Il complesso multienzimatico piruvato deidrogenasi

Il complesso della piruvato deidrogenasi (PDH), già descritto nelle sezioni 1.2 e 1.7 per la sua funzione metabolica e il contributo alla produzione nucleare di acetil-CoA, è stato discusso nella sezione 2.1 come bersaglio della regolazione mediata da HIF-1 α . Quest'ultimo induce l'espressione del piruvato deidrogenasi chinasi (PDK), che fosforila e inattiva PDH, riducendo la conversione del piruvato in acetil-CoA. Tale effetto, apparentemente in contrasto con le esigenze biosintetiche tumorali, riguarda quindi questa specifica via di produzione del metabolita. Un ulteriore meccanismo coinvolge l'oncosoppressore p53: la perdita della sua funzione, frequente nei tumori, può rimuovere la repressione di PDK2, favorendo anche attraverso questa via l'inibizione di PDH. Trattandosi di una regolazione per fosforilazione, è reversibile e non coincide con una perdita dell'enzima, premessa necessaria per spiegare come l'attività del PDH non sia semplicemente abolita ma ridistribuita fra compartimenti. Vista la tendenza nelle cellule tumorali ad inattivare PDH, si potrebbe pensare che questo sia di scarsa rilevanza per lo sviluppo neoplastico, ma evidenze sperimentali sottolineano che l'inattivazione genetica e farmacologica di *PDHA1*, la subunità catalitica di PDH, inibisce lo sviluppo del carcinoma prostatico in modelli murini e in xenotrapianti umani compromettendo la sintesi lipidica. In modo coerente *PDHA1* è spesso sovraespresso nei tumori prostatici, con amplificazioni sia a livello genico che proteico.⁸⁵ La spiegazione di questo apparente paradosso è legata al concetto ormai ricorrente di compartimentalizzazione cellulare, infatti PDH si localizza sia a livello mitocondriale e sia nucleare; il primo fornisce il citrato per la sintesi lipidica, il secondo invece fornisce alle acetilasi istoniche il materiale necessario ad acetilare i geni bersaglio degli SREBP, ossia i geni che codificano proprio per gli enzimi della lipogenesi³². La fosforilazione inibitoria operata dalle chinasi della famiglia PDK agisce solo a livello mitocondriale: la sovraespressione di PDK1 e PDK2 non ha quindi un effetto rilevabile sull'acetilazione istonica e quindi sull'espressione dei geni lipogenici, permettendo così alla cellula di ridurre il piruvato destinato all'ossidazione mantenendo allo stesso tempo una fonte di acetile nucleare tale da garantire la piena attività dei geni deputati alla sintesi lipidica⁸⁵.

3.5 β -ossidazione come sorgente alternativa nei tumori

Oltre alle vie di produzione citate, la cellula tumorale può sfruttare anche la β -ossidazione per approvvigionarsi di acetil-CoA. Questo avviene nello specifico in contesti con scarsa disponibilità di glucosio e abbondanza di acidi grassi. Due esempi documentati di questo cambio metabolico sono il carcinoma tiroideo trattato con inibitori di BRAF⁸⁶ e il carcinoma della cervice con metastasi linfonodali⁸⁷. Lo step limitante della β -ossidazione è rappresentato dall'ingresso degli acidi grassi nel mitocondrio, ingresso catalizzato dalla carnitina palmitoiltransferasi 1 (CPT1)⁵. La regolazione fisiologica di CPT1 avviene tramite inibizione ad opera del malonil-CoA, prodotto della reazione con cui l'acetil-CoA carbossilasi (ACC1) avvia la sintesi degli acidi grassi²¹. Si può quindi evidenziare un apparente bivio metabolico tra β -ossidazione e sintesi dei grassi: il primo prodotto di questo pathway inibisce il trasportatore necessario a iniziare l'altro. La spiegazione risiede nell'esistenza di due diverse isoforme di ACC: ACC1 è infatti citosolica e produce malonil-CoA destinato alla sintesi lipidica, mentre ACC2 sembra essere associata alla membrana mitocondriale esterna e produrre malonil-CoA con funzione regolatoria.²⁰ Il controllo trascrizionale è stato oggetto di studio ma ha portato a conclusioni discordanti: nel modello tiroideo trattato con inibitori BRAF sembra regolato infatti dal coattivatore 1-alfa del recettore attivato dai proliferatori dei perossisomi gamma, il cui acronimo è PGC1 α ⁸⁶, che tuttavia mostra una soppressione della capacità metastatica nel carcinoma prostatico⁸⁸. Occorre sottolineare che la β -ossidazione viene promossa fisiologicamente anche da p-53, considerato il "guardiano del genoma", che ne induce gli enzimi a partire da CPT1⁶⁵. In questo contesto una stessa via metabolica viene promossa sia da un meccanismo di resistenza tumorale e sia da un oncosoppressore, e questo è possibile perché nel secondo caso la β -ossidazione è parte di un programma trascrizionale più ampio che include anche l'arresto della proliferazione, nel primo invece è solo il modulo catabolico usato per ottenere una fonte di energia alternativa e di cofattori per alimentare l'acetilazione istonica, come verrà illustrato di seguito. Nel carcinoma tiroideo è stato dimostrato che la β -ossidazione riprogramma il pattern di acetilazione la lisina 9 dell'istone H3, attivando segnali di sopravvivenza come Fattore di trascrizione 1 correlato a Runt (RUNX1)⁸⁶. Nel carcinoma alla cervice uterina, invece, l'acetil-CoA prodotto dalla β -ossidazione incrementa l'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3 in corrispondenza dei promotori dei geni coinvolti nella

staminalità di una cellula, favorendo l'infiltrazione nei linfonodi tumore-drenanti.⁸⁷ Rimane tuttavia una questione ancora da puntualizzare in merito ai modelli tiroideo e cervicale. Infatti, come spiegato nel capitolo 1.2 la β -ossidazione è un processo a localizzazione mitocondriale e l'acetil-CoA è un metabolita impermeabile alle membrane che necessita di un carrier per poter essere esportato come descritto precedentemente. Nel modello tiroideo si è osservato che l'acetil-CoA citoplasmatico deriva prevalentemente dal citrato che subisce l'azione dell'enzima ATP citrato liasi (ACLY). In questi modelli la somministrazione di citrato aumenta infatti la concentrazione di acetil-CoA e l'acetilazione della lisina 9 sull'istone H3, mentre l'inibizione di ACLY la riduce. Nel modello cervicale la questione rimane invece aperta e ulteriormente complicata dal fatto che sono state rilevate evidenze della centralità della β -ossidazione a livello perossisomiale. Nonostante la β -ossidazione non sia una via metabolica tra le più frequentemente regolate, il suo studio e la sua comprensione sono un ulteriore passo avanti nel trattamento di alcune forme neoplastiche ad alto rischio o resistenti al trattamento.

3.6 La lipogenesi *de novo* tumorale

Come introdotto nel capitolo precedente, le acetil-CoA carbossilasi sono enzimi in grado di produrre malonil-CoA mediante la reazione enzimatica:



L'enzima multifunzionale dotato di sette domini catalitici Acido grasso Sintasi (FASN) condensa in serie sette molecole di malonil-CoA e una di acetil-CoA, generando così palmitato, acido grasso saturo a sedici atomi di carbonio e primo prodotto della lipogenesi vera e propria. A questo punto l'intervento di elongasi (ELOVL) e desaturasi, come la stearoil-CoA desaturasi, introducono doppi legami in $\Delta 5$, $\Delta 6$ e $\Delta 9$, portando alla formazione di una serie variegata di acidi grassi, vincolati però dall'impossibilità di inserire doppi legami oltre la posizione 9.⁸⁹ A questo punto occorre soffermarsi sul significato biologico della lipogenesi, dato che in termini di dispendio energetico risulterebbe più efficiente la captazione dall'ambiente. La risposta è strettamente legata alla composizione qualitativa delle membrane tumorali. Infatti, il tumore produce acidi grassi saturi o a basso grado di insaturazione con il fine di

ottenere una serie di membrane più resistenti allo stress ossidativo e alla terapia chemioterapica.⁹⁰ Gli acidi grassi saturi, per quanto più resistenti all'ossidazione, se accumulati in eccesso risultano lipotossici, motivo per cui la cellula tumorale tende a utilizzare acidi grassi mono-insaturi piuttosto che totalmente saturi. Un'ulteriore conseguenza della composizione peculiare delle membrane tumorali è la resistenza alla ferroptosi. Questa è infatti una forma di morte cellulare regolata, ferro dipendente, innescata dalla perossidazione degli acidi grassi polinsaturi dei fosfolipidi di membrana. La lipogenesi *de novo* è quindi responsabile di una maggiore resistenza a questo tipo di morte cellulare e un ulteriore vantaggio competitivo per il tumore.⁷⁴ Il controllo trascrizionale viene effettuato dagli *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* (SREBP), famiglia che comprende SREBP1a, 1c, varianti di splicing del gene *SREBF1* e *SREBP2* prodotto dalla trascrizione di *SREBF2*. In questo contesto è importante sottolineare che l'espressione degli enzimi che rigenerano il NADPH, in particolare quelli coinvolti nella fase ossidativa della via dei pentosi fosfati, le isocitrato deidrogenasi e gli enzimi malici, insieme a quelli del ciclo monocarbonioso, sono a loro volta regolati da SREBP.⁸⁹ Un controllo specifico della lipogenesi avviene a livello post-trascrizionale. Lin28A e Lin28B sono due proteine oncofetali, ossia espresse nelle cellule staminali embrionali che legano l'mRNA e sono silenziate nei tessuti sani adulti⁹¹, ma vengono riespresse in numerose neoplasie. Nello specifico agiscono sul mRNA di SREBP1, potenziandone traduzione e maturazione da cui scaturisce una sintesi accelerata degli acidi grassi e una più efficiente conversione dei lipidi da saturi a monoinsaturi, per tenere bassa la lipotossicità.⁹² Per quanto riguarda la regolazione post-traduzionale troviamo la fosforilazione da parte di AMPK, con effetto inibitorio sia su ACC1 che su ACC2²⁰; questo avrà un impatto sulla resistenza al cetuximab, come sarà approfondito nel capitolo 8.2 successivo.

3.7 Via del mevalonato e sintesi degli isoprenoidi

La via del mevalonato inizia tramite la condensazione di tre molecole di acetil-CoA ad opera di una tiolasi extramitocondriale e della 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA sintasi 1 (HMGCS1), formando HMG-CoA. A questo punto la 3-idrossi-3-metilglutaril-CoA reduttasi (HMGCR), bersaglio delle statine, procede alla riduzione dell'HMG-CoA a mevalonato, da cui derivano steroli, ubiquinone, Eme A e gli altri isoprenoidi⁴. La sintesi del mevalonato rispetto alle altre reazioni prese in considerazione è

particolarmente sensibile alla concentrazione citosolica di acetil-CoA e la disponibilità del metabolita funge infatti da regolatore per l'intera via.⁷⁴

Oltre a questo meccanismo regolatorio troviamo una forte dipendenza da p53, cui seguono implicazioni in ambito oncologico: p53 wild-type infatti reprime la via inducendo la trascrizione di ATP-binding cassette transporter A1, noto anche come ABCA1, il trasportatore che esporta colesterolo, da cui la riduzione del colesterolo intracellulare e quindi la mancata attivazione di SREBP-2, regolatore trascrizionale della via. La deregolazione di questa via nel contesto tumorale è stata studiata nel modello del carcinoma epatico. A seguito della perdita di p53, gli epatocarcinomi diventano dipendenti dalla via del mevalonato al punto che l'inibizione del pathway ne limita lo sviluppo. Questo è stato dimostrato anche dalla promozione della tumorigenesi mediante l'ablazione di ABCA1, che, come detto, limita la trascrizione di SREBP-2.⁹³ Il ruolo di p53 risulta particolarmente rilevante anche nei contesti caratterizzati dalla presenza di mutazioni missenso. Nel carcinoma mammario, utilizzato come modello di studio, la deplezione delle forme mutate di p53 determina una regressione del fenotipo tumorale verso caratteristiche più simili a quelle delle cellule sane. Al contrario, la reintroduzione degli intermedi della via del mevalonato favorisce la progressione neoplastica.⁹⁴ Il punto di contatto più netto tra acetil-CoA e via del mevalonato in ambito tumorale è stato rilevato nel modello pancreatico. La metaplasia acino-duttale è una risposta fisiologica a danno o stato infiammatorio, dove le cellule acinari differenziano verso un fenotipo duttale, per poi essere sostituite da cellule acinari nuove a seguito della riparazione del danno. In contesti con mutazione della proteina nota come omologo dell'oncogene virale del sarcoma del ratto di Kirsten, ossia KRAS, invece la differenziazione può procedere e diventare irreversibile, fino a culminare in neoplasia vera e propria. Nelle cellule metaplastiche si osserva un'elevata espressione dei geni codificanti gli enzimi della sintesi del colesterolo, accompagnata da un aumento della concentrazione di acetil-CoA. La rilevanza di entrambi questi aspetti è stata dimostrata mediante l'inibizione della HMG-CoA reduttasi e di ACLY, enzima precedentemente citato e coinvolto nella produzione di acetil-CoA citosolico. In entrambi i casi è stata osservata un'inibizione della crescita cellulare sia nello stadio metaplastico sia in quello tumorale conclamato.⁹⁵ Per quanto riguarda l'inibizione della HMG-CoA reduttasi, quanto descritto potrebbe suggerire una potenziale attività antineoplastica delle statine. Tale ipotesi è stata oggetto di diversi studi; tuttavia, è emerso che a un iniziale arresto della crescita cellulare può seguire

l'attivazione di un meccanismo compensatorio, caratterizzato dall'induzione di SREBP2 e dal conseguente aumento dell'espressione della HMG-CoA reduttasi. Questo meccanismo potrebbe contribuire a limitare l'efficacia delle statine utilizzate come singoli agenti antitumorali; inoltre, le evidenze epidemiologiche disponibili non risultano, ad oggi, conclusive.⁹⁶ Dalla via del mevalonato deriva infine l'ubiquinone, molecola che agisce come antiossidante di membrana fornendo resistenza alla ferroptosi. L'ubiquinone è mantenuto in stato ridotto dall'enzima *Ferroptosis-Suppressor Protein 1* (FSP1) e dall'attività enzimatica della *Dihydroorotate Dehydrogenase* (DHODH), che ne promuovono la riduzione rispettivamente per via NADH- e FMNH₂-dipendente⁷⁴. Questo permette quindi di affermare che l'acetil-CoA alimenta la difesa alla ferroptosi, sia tramite la sintesi *de novo* di acidi grassi monoinsaturi e sia tramite la via del mevalonato che fornisce ubiquinone.

3.8 Eterogeneità delle sorgenti di Acetil-CoA nei diversi tumori

Nei paragrafi precedenti sono state descritte le principali fonti di acetil-CoA. Resta tuttavia da chiarire quale di queste assuma un ruolo predominante nei diversi contesti cellulari e in quale misura tali fonti possano essere considerate metabolicamente intercambiabili. L'esistenza di un certo grado di flessibilità metabolica tra queste diverse fonti di acetil-CoA è stata dimostrata sperimentalmente. Infatti, la delezione di ACLY non risulta fatale ma sembra invece indurre una proliferazione più lenta e la cellula mette in atto meccanismi compensatori che consistono nella sovraespressione di ACSS2 e un utilizzo maggiore dell'acetato esogeno. In questo contesto è interessante notare come servano concentrazioni esogene più alte di acetato per recuperare l'acetilazione istonica, che viene sacrificata prima delle funzioni metaboliche di base.³⁰ Ulteriori studi sulla delezione di ACLY sono stati effettuati in modelli murini: silenziando ACLY e somministrando boli di fruttosio, è stato dimostrato che il microbiota fosse in grado di convertire il fruttosio non assorbito in acetato aggirando l'attività di ACLY. Questo non avviene invece in topi a cui è stato eradicato il microbiota mediante antibiotici, suggerendo ulteriori gradi di complessità legati anche all'intervento di agenti esterni al tumore in senso stretto.⁹⁷ Oltre a silenziare ACLY è stato anche studiato l'impatto del silenziamento di ACSS2, sempre in modelli murini, geneticamente modificati per aumentare l'insorgenza precoce di carcinoma epatico. In questo caso è importante sottolineare che i topi con ACSS2

mutato raggiungono l'età adulta normalmente, ma con un carico tumorale epatico significativamente ridotto rispetto a quelli con ACSS2 wild-type⁹⁸. Questa distinzione presenta importanti implicazioni dal punto di vista terapeutico, purché letta sulla scala corretta. La delezione di ACLY è tollerata dalla singola cellula, che compensa con ACSS2 e acetato esogeno; nell'intero organismo, invece, il knockout costitutivo è letale nelle prime fasi dello sviluppo, mentre gli eterozigoti risultano sani e normolipidemic. I topi privi di ACSS2 raggiungono al contrario l'età adulta senza alterazioni evidenti, motivo per cui ACSS2, frequentemente sovraespresso in numerose neoplasie, potrebbe rappresentare un potenziale bersaglio terapeutico. Sono presenti anche evidenze in vivo, ottenute infondendo ¹³C-acetato in pazienti con glioblastoma o con metastasi cerebrali da carcinoma mammario e NSCLC, e analizzando poi i tessuti asportati mediante spettroscopia di risonanza magnetica nucleare al ¹³C. In tutti i tipi di tumore è stata dimostrata l'ossidazione sia dell'acetato sia del glucosio, dimostrando che le due vie metaboliche sono utilizzate in modo sinergico piuttosto che mutualmente esclusivo dando numerosi spunti in ambito terapeutico⁷⁹. Come evidenziato nei paragrafi precedenti il quadro è complesso e non esiste una fonte nettamente prevalente di acetil-CoA che non sia contesto-dipendente. Ad esempio, l'acetato sostiene la lipogenesi in condizioni ipossiche e acide, mentre la β -ossidazione prevale nel carcinoma della cervice, mentre ACSS1 è fondamentale per l'osteosarcoma e la resistenza alla radioterapia nel carcinoma mammario. L'eterogeneità tumorale rende la sintesi dell'acetil-CoA un bersaglio terapeutico potenzialmente interessante ma complesso, dato che le sue ramificazioni metaboliche sono tali da consentire uno sviluppo di meccanismi compensatori e vie alternative, come sarà in seguito approfondito nel nono capitolo.

3.9 Il microambiente come determinante delle fonti di acetil-CoA

Il terzo capitolo finora ha mostrato soprattutto le principali vie di approvvigionamento cellulare, ma occorre sempre ricordare che il tumore non esiste come sistema isolato, ma è in costante comunicazione con l'ambiente circostante. In questo paragrafo sarà quindi evidenziato il ruolo del microambiente tumorale come sorgente e regolatore dell'approvvigionamento dell'acetil-CoA. Nei paragrafi precedenti sono già stati descritti due aspetti relativi all'influenza del microambiente sul metabolismo dell'acetil-CoA: da un lato, l'ipossia, l'acidosi e la limitata disponibilità

di glucosio come condizioni in grado di indurre ACSS2; dall'altro, la possibilità che il carbonio necessario alla produzione di acetil-CoA derivi da fonti esterne, tra cui il microbiota. A questi aspetti si aggiunge la relazione tra il metabolismo dell'acetil-CoA e l'obesità, approfondita nel presente paragrafo. L'obesità rappresenta un fattore di rischio per svariate patologie, tra cui anche il mieloma multiplo, quest'ultimo viene infatti inserito dallo IARC nel gruppo di tumori correlabili a un eccesso di adiposità⁹⁹ e l'analisi aggregata di venti studi prospettivi associa l'obesità anche alla mortalità per mieloma.¹⁰⁰ Un dato particolarmente rilevante emerge dall'analisi degli aspirati midollari di pazienti affetti da mieloma multiplo, stratificati in base al BMI in soggetti normopeso (BMI < 25) e obesi (BMI > 30). Nei pazienti obesi è stata infatti osservata una maggiore espressione di ACSS1 e ACSS2, accompagnata da una ridotta espressione di ACLY.¹⁰¹ Il microambiente tumorale esercita quindi un'influenza significativa sulla regolazione metabolica delle cellule neoplastiche e, in questo specifico contesto, ne indirizza il metabolismo verso un maggiore utilizzo dell'acetato. Il ruolo degli adipociti del midollo osseo nel sostenere la crescita delle cellule di mieloma è già noto. L'elemento di novità risiede, invece, nel diverso effetto esercitato dagli adipociti provenienti da soggetti normopeso o obesi. In modelli murini NSG, caratterizzati da una marcata immunodeficienza, il co-impianto di cellule di mieloma con adipociti isolati da topi obesi determina infatti una maggiore crescita tumorale rispetto a quella osservata in presenza di adipociti provenienti da topi normopeso.¹⁰¹ È stato dimostrato che il segnale responsabile dell'induzione di ACSS2, è l'angiotensina II. La capacità degli adipociti di secernere angiotensina II è un aspetto noto¹⁰², così come la tendenza degli adipociti dei soggetti obesi a secernerne maggiori quantità, mentre non era chiaro il processo di induzione di ACSS2. Nelle cellule di mieloma, questo meccanismo è mediato dal legame con il recettore dell'angiotensina II di tipo 1 (AGTR1), che determina l'attivazione dell'asse PI3K/AKT-SREBP1. Al termine della cascata di segnalazione, la forma matura di SREBP1 si lega al promotore di ACSS2, inducendone l'espressione.¹⁰¹ Nel complesso, il segnale paracrino proveniente dagli adipociti promuove l'espressione di ACSS2, enzima che catalizza la conversione dell'acetato e del coenzima A in acetil-CoA. Il segnale adipocitario aumenta quindi la capacità delle cellule di mieloma di produrre acetil-CoA a partire dall'acetato, evidenziando l'esistenza di un dialogo metabolico tra il tumore e il microambiente e il suo impatto sulla regolazione di questa via metabolica.

Capitolo 4

Acetil-CoA ed epigenetica: acetilazione istonica e controllo trascrizionale

Dopo aver descritto le principali vie di produzione dell'acetil-CoA, è possibile approfondirne il contributo alla regolazione della cromatina. Oltre a sostenere il metabolismo energetico e la biosintesi, questo metabolita fornisce i gruppi acetile utilizzati dalle acetiltransferasi per modificare gli istoni. L'acetilazione istonica contribuisce all'organizzazione della cromatina e al reclutamento di proteine regolatrici, ma il suo rapporto con la trascrizione dipende dal residuo modificato, dalla regione genomica e dal contesto cellulare. Non ogni variazione dell'acetilazione comporta quindi un cambiamento dell'espressione genica, né dimostra, da sola, l'instaurarsi di una memoria epigenetica stabile.

4.1 Acetiltransferasi, deacetilasi e disponibilità del substrato

Il collegamento tra metabolismo ed acetilazione dipende, in parte, dalla sensibilità delle lisina acetiltransferasi (KAT) alla disponibilità di acetil-CoA. Quando il substrato non è saturante, una sua variazione può modificare la velocità della reazione; non è però corretto considerarlo sempre il fattore limitante. Occorre inoltre distinguere la costante di dissociazione, K_d , che descrive il legame tra enzima e ligando, dalla costante di Michaelis, K_m , che caratterizza la cinetica della reazione nelle condizioni esaminate. Il confronto tra questi parametri e la concentrazione cellulare totale di acetil-CoA non dimostra automaticamente lo stato di saturazione delle KAT nel nucleo. Contano anche la disponibilità locale del substrato, il reclutamento degli enzimi e l'organizzazione della cromatina. Il CoA libero, prodotto dalla reazione, può inibire alcune KAT: il rapporto acetil-CoA/CoA può pertanto contribuire alla regolazione, senza implicare una relazione universalmente proporzionale con l'acetilazione. In cellule di carcinoma del colon, la riduzione graduata della glicolisi modifica i livelli di acetil-CoA e l'acetilazione di una parte dei siti istonici analizzati, mentre altri risultano meno sensibili. Questa osservazione dimostra una risposta differenziale nel modello studiato, ma non permette di estendere la percentuale dei siti coinvolti a tutti gli istoni o a tutti i tumori.¹⁰³

La rimozione dei gruppi acetile è affidata alle deacetilasi: le classi I, II e IV sono zinco-dipendenti, mentre le sirtuine utilizzano NAD^+ come cosubstrato. Questa distinzione

non rende le prime indipendenti dal metabolismo, né consente di ricondurre l'attività delle seconde al solo stato redox. Il livello di acetilazione deriva quindi dall'equilibrio tra deposizione e rimozione della modifica, entrambe influenzate dal contesto cellulare.

4.2 Compartimentalizzazione e fonti dell'acetil-CoA

La disponibilità di acetil-CoA per l'acetilazione istonica dipende anche dal compartimento in cui viene prodotto. L'acetil-CoA mitocondriale non attraversa direttamente la membrana mitocondriale interna: le sue unità carboniose devono essere trasferite attraverso altre molecole e utilizzate per rigenerare il metabolita nel compartimento nucleo-citosolico. Negli esperimenti di silenziamento di ACLY, la riduzione dell'acetilazione istonica può essere compensata mediante concentrazioni elevate di acetato, utilizzato dall'acetil-CoA sintetasi nucleo-citosolica oggi denominata ACSS2. Questo dimostra una compensazione possibile nelle condizioni sperimentali, non una completa equivalenza delle due vie in ogni contesto⁴⁴. In cellule tumorali sottoposte a ipossia, l'acetato può sostenere l'acetilazione di H3K9, H3K27 e H3K56. Esperimenti con acetato marcato isotopicamente ne hanno documentato il contributo ai gruppi acetile istonici. Nei modelli esaminati, l'aumento dell'acetilazione sui promotori di FASN e ACACA si accompagna all'induzione dei geni lipogenici. L'acetato può quindi contribuire sia alla sintesi lipidica sia alla regolazione dei geni che la sostengono.¹⁰⁴ Un diverso esempio proviene dal differenziamento adipocitario: il silenziamento di ACLY riduce l'espressione di geni coinvolti nella captazione e nel metabolismo del glucosio, con recupero dopo aggiunta di acetato. Questo risultato sostiene un collegamento tra metabolismo e regolazione trascrizionale, ma deve essere distinto dalle evidenze ottenute direttamente nelle cellule tumorali.

4.3 Produzione nucleare di acetil-CoA e reclutamento sulla cromatina

La localizzazione nucleare degli enzimi metabolici può favorire l'utilizzo dell'acetil-CoA in specifici processi cromatinici. Il reclutamento vicino alle acetiltransferasi sostiene un modello di produzione locale, ma non dimostra necessariamente l'esistenza di pool completamente isolati o incapaci di scambiare

metaboliti con il resto del nucleo. Un esempio riguarda il riparo del DNA. Dopo una rottura a doppio filamento, ACLY nucleare viene fosforilata sulla serina 455 a valle di ATM e AKT. La sua attività sostiene l'acetilazione istonica presso le lesioni, limita il reclutamento di 53BP1 e favorisce quello di BRCA1 e la ricombinazione omologa. La scelta della via di riparo resta comunque dipendente anche dal ciclo cellulare e dagli altri componenti della risposta al danno.¹⁰⁵ Nel glioblastoma, la carenza di glucosio attiva AMPK, che fosforila ACSS2 sulla serina 659 favorendone l'ingresso nel nucleo. ACSS2 si associa quindi a TFEB e viene reclutata sui promotori di geni lisosomiali e autofagici. Nel modello proposto, l'enzima recupera acetato liberato dal ricambio dell'acetilazione istonica e lo utilizza per produrre acetil-CoA, sostenendo l'acetilazione locale e l'espressione dei geni bersaglio. Gli esperimenti mostrano un contributo di questo asse all'adattamento allo stress nutrizionale e alla crescita tumorale.⁷⁷ Un ulteriore studio ha identificato un complesso comprendente PKM2, la subunità E2 del complesso della piruvato deidrogenasi, p300 e il recettore degli idrocarburi arilici, AhR. Il reclutamento sull'enhancer di CYP1A1 e la dipendenza dall'attività metabolica sostengono un modello di produzione locale del substrato per l'acetilazione. Il risultato non dimostra però che questo meccanismo sia universale.¹⁰⁶

4.4 Programmi trascrizionali sensibili al metabolismo dell'acetil-CoA

Per distinguere gli effetti della carenza di glucosio da quelli associati alla disponibilità di acetil-CoA, uno studio su cellule di glioblastoma ha confrontato condizioni di glucosio abbondante, glucosio limitato e glucosio limitato con aggiunta di acetato. Una parte delle variazioni trascrizionali indotte dalla restrizione viene recuperata dall'acetato, con coinvolgimento della segnalazione Ca^{2+} -NFAT e dei programmi di adesione e migrazione cellulare.¹⁰⁷ Il recupero sostiene il contributo del metabolismo dell'acetil-CoA, ma non dimostra che ciascun gene risponda direttamente al metabolita: l'acetato può influenzare più processi e le variazioni trascrizionali possono comprendere effetti secondari. Nel carcinoma pancreatico, i fattori di crescita possono aumentare l'acetilazione istonica attraverso la via AKT-ACLY. Nei modelli studiati, la stimolazione con IGF incrementa H3K27ac su alcuni promotori e su regioni regolatrici associate a EGFR e MYC, mentre regioni di controllo non mostrano la stessa risposta. Questi risultati indicano una regolazione selettiva di elementi cromatinici sensibili ai segnali extracellulari.⁹⁵ Il metabolismo dell'acetil-CoA

può quindi contribuire a programmi proliferativi già organizzati da fattori trascrizionali e segnali oncogenici. L'eventuale formazione di circuiti di retroazione, nei quali questi programmi aumentano a loro volta la produzione del metabolita, deve essere verificata sperimentalmente e non dedotta dalla sola connessione tra le vie.

4.5 Sensibilità dei diversi siti istonici

Le variazioni della disponibilità di acetil-CoA non producono necessariamente una risposta uniforme. Studi biochimici su p300 e CBP mostrano che la preferenza per determinati residui dipende dalla concentrazione dei substrati e dalla loro presentazione sperimentale. Anche per una singola acetiltransferasi, quindi, la selettività non è una proprietà completamente indipendente dalle condizioni della reazione.^{108,109} In alcuni saggi, le curve cinetiche sono descritte mediante coefficienti di Hill compatibili con cooperatività apparente. Questi parametri caratterizzano il comportamento osservato, ma non identificano da soli il meccanismo molecolare e non permettono di prevedere direttamente la risposta della cromatina nelle cellule. Un secondo elemento è il ricambio dei gruppi acetile. Esperimenti di marcatura isotopica hanno individuato siti con ricambio rapido e altri molto più stabili. Nei primi, il mantenimento dell'acetilazione richiede una continua deposizione di nuovi gruppi acetile, suggerendo una maggiore sensibilità temporale alle variazioni del metabolismo. Tuttavia, la risposta dipende anche dall'attività delle deacetilasi, dall'accessibilità del sito e dal ricambio degli istoni¹¹⁰. È quindi più corretto parlare di sensibilità differenziale dei siti, definita nel singolo modello, che di una gerarchia universale. Quantità totale di acetilazione e distribuzione delle modifiche lungo il genoma sono inoltre misure distinte: una variazione globale non identifica automaticamente i loci o i geni funzionalmente coinvolti.

4.6 Lettori dell'acetilazione e regolazione trascrizionale

L'acetilazione delle lisine modifica le proprietà degli istoni e crea siti di riconoscimento per proteine regolatrici. Tra i moduli che riconoscono l'acetil-lisina figurano i bromodomini, presenti nelle proteine BET, come BRD2, BRD3, BRD4 e BRDT, e in numerose proteine non-BET. BRD4 contribuisce alla regolazione trascrizionale anche attraverso l'interazione con P-TEFb, coinvolto nel rilascio della pausa prossimale al promotore dell'RNA polimerasi II. La sua funzione non si riduce

però a una sequenza obbligata tra acetilazione, riconoscimento e allungamento: sono state documentate anche attività di BRD4 indipendenti dal legame dei bromodomini agli istoni acetilati.¹¹¹ Nel mieloma multiplo, l'inibitore BET JQ1 provoca una perdita preferenziale di BRD4 da alcuni super-enhancer, regioni regolatrici estese e ricche di coattivatori, riducendo l'espressione di geni associati, tra cui MYC. I super-enhancer sono presenti anche nelle cellule non tumorali e contribuiscono alla regolazione dell'identità cellulare.¹¹² Questi risultati non dimostrano che ridurre l'acetil-CoA produca necessariamente gli stessi effetti dell'inibizione dei bromodomini. Analogamente, la presenza di due bromodomini in BRD4 può favorire interazioni multivalenti, ma non implica che entrambi debbano sempre legare simultaneamente due lisine acetilate per consentire la funzione della proteina. Un esempio diretto di alterazione oncogenica è la fusione BRD4–NUT, presente in una parte dei carcinomi NUT. Nei modelli studiati, il suo silenziamento favorisce il differenziamento squamoso e arresta la proliferazione, mostrando come l'alterazione di un regolatore della cromatina possa sostenere il fenotipo neoplastico.¹¹³

4.7 Acetilazione istonica e adattamento ai trattamenti

La tolleranza ai farmaci può dipendere da stati cellulari reversibili, oltre che da alterazioni genetiche stabili. Nei modelli descritti da Sharma e collaboratori, una piccola sottopopolazione sopravvive al trattamento e può recuperare sensibilità dopo la sua sospensione. Questo stato coinvolge la segnalazione di IGF-1R e la demetilasi istonica KDM5A e si accompagna a una riduzione di H3K14ac¹¹⁴. Le cellule tolleranti risultano sensibili agli inibitori delle deacetilasi. Il dato sostiene il coinvolgimento della regolazione cromatinica, ma non dimostra che la sola ipoacetilazione di H3K14 causi la tolleranza, né che questa dipenda da una carenza di acetil-CoA. L'esempio documenta pertanto la plasticità della cromatina, senza stabilire un ruolo diretto del metabolita. Un collegamento più specifico è stato proposto nel carcinoma tiroideo con mutazione BRAF V600E. Nei modelli esaminati, il trattamento con vemurafenib aumenta l'ossidazione degli acidi grassi e si associa a un incremento dell'acetil-CoA e al rimodellamento di H3K9ac. Gli esperimenti di inibizione del metabolismo lipidico e di recupero con acetato sostengono il contributo del metabolita. Tra i programmi coinvolti figura quello di RUNX1, il cui silenziamento riduce caratteristiche di aggressività cellulare⁸⁶. Le evidenze restano precliniche e non definiscono una

strategia terapeutica validata. Nel complesso, questi esempi mostrano che l'adattamento può accompagnarsi a modificazioni di segno diverso: non esiste una relazione generale secondo cui aumentare o ridurre l'acetilazione produca sempre sensibilità o resistenza al trattamento.

4.8 Profili di acetilazione e significato prognostico

Le modificazioni istoniche sono state studiate anche come possibili indicatori dell'evoluzione clinica. Nel carcinoma prostatico, analisi immunoistochimiche hanno identificato associazioni tra profili combinati di acetilazione e metilazione e rischio di recidiva. Questi risultati riguardano specifiche coorti e modalità di misurazione e non attribuiscono a una singola modifica un significato prognostico universale.¹¹⁵ In una serie di 880 carcinomi mammari, livelli relativamente elevati delle modificazioni istoniche analizzate si associavano a caratteristiche più favorevoli e ai tumori di tipo luminale. La frequente riduzione di H4K16ac è un'osservazione rilevante, ma la sua prevalenza non dimostra da sola che si tratti di un evento precoce nella storia della malattia.¹¹⁶ Nell'epatocarcinoma, invece, uno studio su 278 pazienti ha associato livelli elevati di H3K18ac a prognosi sfavorevole. Il confronto conferma la necessità di interpretare ogni marcatura nel contesto tissutale e clinico in cui è stata misurata.¹¹⁷ Occorre inoltre distinguere il valore prognostico, relativo all'evoluzione della malattia, da quello predittivo di risposta a uno specifico trattamento. Nel melanoma, l'asse ACLY–H3K27ac–PD-L1 è stato associato a una risposta sfavorevole all'immunoterapia nei campioni analizzati, ma il suo impiego come biomarcatore richiede ulteriori conferme.¹¹⁸ Infine, il livello di acetilazione rilevato nei tessuti non costituisce una misura diretta della disponibilità di acetil-CoA. Esso riflette anche l'attività degli enzimi, la composizione cellulare e altri fattori regolatori. Le associazioni cliniche non dimostrano quindi, da sole, che il metabolismo dell'acetil-CoA sia la causa dell'andamento osservato.

Capitolo 5

Acetilazione non istonica: l'acetil-CoA nella regolazione delle proteine

5.1 L'acetiloma: dimensioni e significato funzionale

L'acetilazione non interessa soltanto gli istoni, ma anche numerose proteine coinvolte nel metabolismo, nella segnalazione e nella regolazione della sopravvivenza cellulare. L'insieme delle proteine e dei siti acetilati costituisce l'acetiloma, la cui caratterizzazione ha rivelato una distribuzione della modifica in diversi compartimenti cellulari. L'identificazione di un sito acetilato, tuttavia, non ne dimostra automaticamente la rilevanza funzionale. In uno studio su cellule HeLa, comprendente 6.829 siti di 2.535 proteine, la frazione mediana di molecole acetilate per sito era dello 0,02%. I siti con occupazione più elevata risultavano maggiormente rappresentati nelle proteine nucleari e nelle acetiltransferasi. Questi dati richiedono cautela nell'interpretazione delle analisi proteomiche: una modifica poco abbondante può avere effetti su specifiche sottopopolazioni proteiche, ma il suo significato deve essere verificato sperimentalmente.¹¹⁹ Nel mitocondrio, inoltre, le condizioni chimiche della matrice favoriscono anche l'acetilazione non enzimatica. Studi sul fegato murino hanno proposto che SIRT3 contribuisca a rimuovere queste modifiche, limitandone l'accumulo. Tale modello non esclude funzioni regolatorie di singoli siti, ma impedisce di considerare ogni acetilazione mitocondriale come un evento programmato di segnalazione.¹²⁰ Il capitolo considera pertanto soprattutto esempi con conseguenze funzionali documentate. Occorre mantenere una distinzione: dimostrare che una proteina è regolata dall'acetilazione non equivale a dimostrare che tale regolazione dipenda dalle variazioni della concentrazione cellulare di acetil-CoA.

5.2 Acetilazione N-terminale e disponibilità di acetil-CoA

L'acetilazione può interessare il gruppo amminico α all'estremità N-terminale della proteina, oltre al gruppo amminico ϵ delle lisine. L'acetilazione N-terminale è catalizzata dalle N-acetiltransferasi, che riconoscono substrati differenti in funzione della sequenza iniziale della catena polipeptidica. Molte di queste modifiche avvengono durante la traduzione, mediante enzimi associati ai ribosomi. Esistono però anche meccanismi post-traduzionali: NAA60, o NatF, è localizzata

prevalentemente al Golgi e acetila estremità N-terminali esposte sul versante citosolico di proteine transmembrana.¹²¹ La relazione con la disponibilità di acetil-CoA non è uniforme. Nel lievito, una marcata riduzione del metabolita durante la carenza di nutrienti non determina una diminuzione generalizzata dell'acetilazione N-terminale. La dipendenza biochimica dal substrato, quindi, non implica necessariamente una risposta proporzionale alle sue variazioni intracellulari.¹²² Un collegamento con la sopravvivenza cellulare è stato descritto per la proteina antiapoptotica Bcl-xL. Nei modelli studiati, la sua sovraespressione riduceva la disponibilità di acetil-CoA e l'acetilazione N-terminale di diverse proteine, comprese alcune caspasi. Per la caspasi-2, questa modifica favoriva l'interazione con l'adattatore RAIDD, coinvolto nella sua attivazione. La supplementazione con acetato o citrato ripristinava l'acetilazione e aumentava la sensibilità agli stimoli apoptotici. Il risultato documenta un collegamento metabolico con la regolazione dell'apoptosi, senza esaurire i molteplici meccanismi attraverso cui Bcl-xL esercita la propria funzione.¹²³

5.3 Meccanismi d'azione dell'acetilazione delle lisine

L'acetilazione neutralizza la carica positiva del gruppo amminico della lisina e ne modifica le proprietà chimiche. A seconda del residuo coinvolto, può influenzare attività enzimatica, interazioni molecolari, stabilità e localizzazione della proteina. Un esempio è SKP2, componente di riconoscimento del substrato di un complesso ubiquitina-ligasi. L'acetilazione delle lisine 68 e 71, mediata da p300 e antagonizzata da SIRT3, ne favorisce la stabilità e la localizzazione citoplasmatica. In particolare, riduce il riconoscimento da parte del complesso APC/C-CDH1, responsabile della sua degradazione. Nei modelli esaminati, l'accumulo citoplasmatico di SKP2 favorisce la degradazione dell'E-caderina e la migrazione cellulare.¹²⁴ Acetilazione e ubiquitinazione possono competere per la stessa lisina, ma questa possibilità non costituisce una regola generale: l'acetilazione può anche favorire la degradazione modificando il riconoscimento della proteina da parte di altri fattori. Analogamente, l'ubiquitinazione non rappresenta sempre un segnale di degradazione. L'interpretazione degli esperimenti richiede inoltre attenzione ai mutanti utilizzati. La sostituzione della lisina con arginina impedisce l'acetilazione mantenendo una carica positiva, mentre la sostituzione con glutammina riproduce soltanto alcune proprietà della lisina acetilata. Nessuna delle due sostituzioni equivale perfettamente allo stato

naturale deacetilato o acetilato; i risultati devono quindi essere integrati con evidenze biochimiche e funzionali.¹¹⁹

5.4 Regolazione degli enzimi metabolici

L'acetilazione degli enzimi metabolici consente di collegare la disponibilità dei nutrienti alla regolazione delle vie che li utilizzano. Gli effetti possono essere opposti anche all'interno della stessa via. Nella glicolisi, l'acetilazione della piruvato chinasi M2 sulla lisina 305 ne riduce l'attività e ne favorisce la degradazione attraverso l'autofagia mediata da chaperoni. Nei modelli studiati, questo meccanismo contribuisce all'accumulo di intermedi glicolitici utilizzabili nelle vie biosintetiche e favorisce la crescita tumorale.¹²⁵ Un effetto differente riguarda la fosfoglicerato chinasi 1, altro enzima della glicolisi. La sua acetilazione sulla lisina 323, mediata da PCAF e contrastata da SIRT7, ne aumenta l'attività e sostiene il metabolismo glicolitico nei modelli di carcinoma epatocellulare esaminati. L'acetilazione, dunque, non esercita un effetto uniforme sulla glicolisi, ma interviene su passaggi distinti con conseguenze specifiche.¹²⁶ Sono stati descritti anche meccanismi non enzimatici. Studi biochimici sulla fosfoenolpiruvato carbossichinasi citosolica, PCK1, hanno mostrato un'auto acetilazione dipendente dall'acetil-CoA, comprendente la lisina 244, che ne inibisce la reazione gluconeogenica favorendo quella inversa. Il dato identifica un possibile meccanismo di regolazione metabolica, ma non dimostra da solo una funzione nella progressione tumorale.¹²⁷ Infine, l'acetilazione può regolare gli stessi enzimi che producono acetil-CoA. La deacetilazione della sintetasi mitocondriale dell'acetil-CoA da parte di SIRT3 ne aumenta l'attività. L'enzima, indicato nello studio originario come AceCS2, corrisponde all'attuale ACSS1: questa distinzione è necessaria per non confonderlo con ACSS2 nucleo-citosolica.¹²⁸

5.5 Regolazione di oncosoppressori e oncoproteine

L'acetilazione interviene anche su proteine centrali nel controllo della proliferazione e della risposta al danno cellulare. Il suo effetto dipende dal sito modificato e non può essere definito, in termini generali, come oncogenico oppure oncosoppressivo. Per p53, l'acetilazione della lisina 120, mediata dalle acetiltransferasi TIP60 e hMOF, contribuisce alla risposta apoptotica. Nei modelli analizzati, la perdita di questa modifica comprometteva l'induzione di geni pro-

apoptotici, tra cui BAX e PUMA, preservando maggiormente la capacità di indurre l'arresto del ciclo cellulare. Il risultato mostra che singole modifiche possono modulare selettivamente le diverse funzioni di p53.¹²⁹ Anche la regolazione di MYC richiede di distinguere effetti differenti. Uno studio su p300 ha mostrato che la sua interazione con MYC può stabilizzare la proteina indipendentemente dall'attività acetiltransferasica, mentre l'acetilazione può favorirne il ricambio. Non è quindi corretto attribuire automaticamente all'acetilazione tutti gli effetti prodotti dal legame con un'acetiltransferasi.¹³⁰ PTEN offre un ulteriore esempio di specificità del residuo. Questa fosfatasi contrasta la segnalazione PI3K–AKT rimuovendo un gruppo fosfato dal PIP3. L'acetilazione delle lisine 125 e 128, mediata da PCAF, ne riduce la capacità di sopprimere l'attivazione di AKT.¹³¹ Al contrario, l'acetilazione della lisina 163, osservata in seguito all'inibizione di HDAC6, favorisce la localizzazione di PTEN alla membrana e ne potenzia la funzione nei modelli studiati. Sulla stessa proteina, quindi, l'acetilazione di residui diversi può produrre effetti opposti.¹³²

5.6 Acetilazione, stabilità genomica e riparo del DNA

La riparazione delle rotture a doppio filamento richiede il reclutamento e il successivo rilascio coordinato di numerose proteine. L'acetilazione contribuisce a regolarne la stabilità e la permanenza sulla cromatina. La ricombinasi RAD51, essenziale per la ricombinazione omologa, viene acetilata da PCAF sulla lisina 40. Questa modifica favorisce la sua rimozione dalla cromatina e la degradazione attraverso il sistema ubiquitina–proteasoma, contribuendo alla regolazione temporale del riparo. Nei modelli cellulari esaminati, il mutante K40R mostrava una maggiore resistenza a etoposide e doxorubicina. Il risultato sostiene un possibile collegamento con la chemioresistenza, ma non costituisce una validazione clinica di RAD51 acetilata come biomarcatore.¹³³ Un secondo meccanismo riguarda il complesso BRCA1–BARD1. SIRT2 deacetila BARD1 sulle lisine 46, 96 e 110, favorendone l'associazione con BRCA1 e la stabilità del complesso. La perdita di questa regolazione compromette la ricombinazione omologa. Il dato documenta una funzione della deacetilazione nel mantenimento dell'integrità genomica, senza implicare che ogni variante dei residui studiati costituisca una mutazione ereditaria patogena.¹³⁴ Un collegamento più diretto con la disponibilità di acetil-CoA è stato descritto nel carcinoma della vescica. ACSL5 attiva gli acidi grassi a catena lunga convertendoli in

acil-CoA; nei modelli studiati, la sua attività favorisce l'ossidazione degli acidi grassi e aumenta l'acetil-CoA. Quest'ultimo sostiene l'acetilazione di 53BP1 sulla lisina 1360, mediata da CBP, stabilizzando la proteina.

La conseguenza è l'attivazione dell'asse p53–p21 e della senescenza cellulare, con limitazione della crescita tumorale. In questo caso l'esito descritto non è l'apoptosi: si tratta di una distinzione rilevante, poiché senescenza e morte cellulare rappresentano risposte biologiche differenti.¹³⁵

5.7 Acetilazione di PD-L1: localizzazione e stabilità

L'acetilazione può regolare direttamente PD-L1, oltre ai meccanismi che ne controllano l'espressione. Questo paragrafo considera le modifiche della proteina, mentre il capitolo dedicato all'immunità antitumorale ne approfondisce la regolazione nel contesto metabolico. Una quota di PD-L1 può raggiungere il nucleo attraverso un processo che coinvolge HIP1R e importina α 1. Nei modelli esaminati, p300 acetila PD-L1 sulla lisina 263, mentre HDAC2 ne promuove la deacetilazione, favorendone la traslocazione nucleare. Nel nucleo, PD-L1 partecipa alla regolazione di programmi trascrizionali associati alla risposta immunitaria e all'infiammazione. Queste osservazioni descrivono una funzione ulteriore rispetto all'interazione di membrana con PD-1, ma non ne dimostrano un'identica rilevanza in tutti i tumori.¹³⁶

Un diverso meccanismo è stato descritto nel carcinoma mammario. La proteina HBXIP favorisce il reclutamento di p300 e l'acetilazione di PD-L1 sulla lisina 270, aumentandone la stabilità.¹³⁷ I due studi mostrano che l'acetilazione può intervenire su localizzazione e degradazione della stessa proteina. Poiché i risultati derivano da contesti sperimentali differenti, non dimostrano necessariamente che entrambi i meccanismi operino contemporaneamente in ogni cellula tumorale.

5.8 Riduzione dell'acetil-CoA e ipoacetilazione nel carcinoma epatocellulare

Non tutti i tumori sono caratterizzati da un aumento dell'acetil-CoA. Uno studio su un modello murino di carcinoma epatocellulare e su campioni umani ha rilevato una riduzione del metabolita associata a una diminuzione dell'acetilazione proteica. In questo contesto, i fattori trascrizionali TEAD2 ed E2A reprimono diverse vie di sintesi dell'acetil-CoA. La loro inibizione ripristina la disponibilità del metabolita e contrasta la

crescita tumorale nei modelli sperimentali, sostenendo un ruolo funzionale della riduzione dell'acetil-CoA nel mantenimento del fenotipo neoplastico.¹³⁸

Il risultato non autorizza a considerare la scarsità di acetil-CoA una caratteristica universale dell'epatocarcinoma, né a trasferire direttamente il rapporto causale sperimentale alla prognosi dei pazienti. Mostra invece che, in determinati contesti, la riduzione della disponibilità del metabolita e dell'acetilazione proteica può favorire il tumore. Questo esempio completa quelli descritti in precedenza: il significato oncologico dell'acetil-CoA dipende dalle vie metaboliche coinvolte e dai substrati interessati, non soltanto dalla sua quantità complessiva.

5.9 Substrati citoplasmatici: citoscheletro, apoptosi e chaperoni

L'acetilazione non istonica interessa anche proteine coinvolte nell'organizzazione del citoscheletro e nel controllo della sopravvivenza. L' α -tubulina è acetilata sulla lisina 40 e costituisce un substrato di HDAC6. Studi sperimentali hanno collegato l'attività di questa deacetilasi alla regolazione dell'acetilazione dei microtubuli e della motilità cellulare. Tale relazione, tuttavia, non permette di equiparare automaticamente la deacetilazione della tubulina a una maggiore invasività tumorale, che richiede verifiche nel modello considerato.¹³⁹ Ku70, oltre a partecipare al riparo del DNA, può trattenere Bax nel compartimento citoplasmatico. L'acetilazione di residui nella sua regione C-terminale, in particolare delle lisine 539 e 542, favorisce il rilascio di Bax e la risposta apoptotica. Questo meccanismo mostra come una modifica post-traduzionale possa regolare la sopravvivenza senza modificare direttamente la trascrizione genica.¹⁴⁰ Un ulteriore substrato è HSP90, uno chaperone molecolare che sostiene la maturazione e la stabilità di numerose proteine di segnalazione. L'inibizione o la deplezione di HDAC6 ne provoca iperacetilazione, compromettendone la funzione. Nelle cellule leucemiche K562 questo fenomeno è associato alla perdita di proteine clienti, tra cui BCR-ABL, AKT e c-Raf. Il risultato contribuisce al razionale antitumorale dell'inibizione delle deacetilasi attraverso meccanismi che coinvolgono anche proteine non istoniche.¹⁴¹

Nel complesso, gli esempi descritti mostrano che l'acetilazione può modulare metabolismo, riparo del DNA, motilità e soglia apoptotica. La disponibilità di acetil-CoA partecipa a questa regolazione, ma il risultato dipende anche dagli enzimi coinvolti, dalla localizzazione e dal residuo modificato. Per questo motivo, aumentare o ridurre

globalmente l'acetilazione non consente di prevedere un effetto antitumorale uniforme.

Capitolo 6

Il ruolo dell'acetil-CoA nella progressione tumorale e nella metastatizzazione

6.1 Quadro generale: l'acetil-CoA come risorsa contesa lungo la storia naturale della malattia

Nei capitoli precedenti sono state descritte le principali vie di produzione dell'acetil-CoA, la sua influenza sulla regolazione trascrizionale e il suo coinvolgimento nei processi di modificazione proteica. A queste funzioni regolatorie si affianca il ruolo dell'acetil-CoA come precursore nella biosintesi de novo dei lipidi. La sintesi di una molecola di palmitato, ad esempio, richiede otto molecole di acetil-CoA. Anche la biosintesi del colesterolo dipende dalla disponibilità di questo metabolita e procede attraverso la formazione di acetoacetil-CoA e la successiva via del mevalonato, richiedendo complessivamente diciotto molecole di acetil-CoA per ogni molecola di colesterolo prodotta. La β -ossidazione degli acidi grassi rappresenta, invece, un processo catabolico che genera acetil-CoA a ogni ciclo di accorciamento della catena. Il metabolismo lipidico rappresenta quindi sia una destinazione sia una fonte di acetil-CoA, coinvolgendo differenti compartimenti cellulari. In questo capitolo verrà analizzato come la richiesta e l'utilizzo di acetil-CoA varino nelle diverse fasi della progressione neoplastica. L'acetil-CoA svolge un ruolo, seppure indiretto, già nelle fasi iniziali della tumorigenesi. Nell'epitelio intestinale, ad esempio, l'inibizione dell'enzima di rimodellamento fosfolipidico LPCAT3 determina un aumento della saturazione delle membrane e stimola la biosintesi del colesterolo, che a sua volta favorisce la proliferazione delle cellule staminali delle cripte intestinali.¹⁴² Il coinvolgimento del colesterolo in questo processo è supportato da evidenze sperimentali complementari: l'inibizione farmacologica della sua sintesi riduce l'iperproliferazione osservata negli animali privi di LPCAT3, mentre l'aumento del contenuto cellulare di colesterolo, ottenuto mediante apporto alimentare o attraverso l'attivazione di SREBP-2, favorisce la proliferazione e la tumorigenesi *in vivo*. Dal momento che il colesterolo è costruito interamente a partire dall'acetil-CoA, il segnale proliferativo qui descritto è dipendente dalla disponibilità del metabolita e dirottare il flusso verso la via del mevalonato e quindi del colesterolo equivale a fornire al comparto staminale uno stimolo di crescita. Occorre inoltre sottolineare che la specificità riguarda la sintesi degli steroli e non

l'intera via del mevalonato. Quest'ultimo, somministrato a concentrazioni sufficienti, alla prenilazione proteica ma non alla sintesi sterolica non ripristina la proliferazione, rafforzando l'evidenza pro-proliferativa dell'abbondanza di acetil-CoA.¹⁴² Come anticipato nel capitolo 3.6, le catene aciliche polinsature sono più suscettibili alla perossidazione di quelle sature e monoinsature. La distinzione è rilevante per questa tesi perché gli acidi grassi monoinsaturi sono le specie che la cellula può costruire dall'acetil-CoA, mentre quelli polinsaturi devono essere assunti dall'esterno, e questo implica che la composizione protettiva della membrana coincide con la frazione lipidica di origine lipogenica. L'analisi di tessuti tumorali umani ottenuti da prostatectomia radicale ha evidenziato che le neoplasie caratterizzate da un fenotipo lipogenico presentano un grado di saturazione degli acidi grassi superiore rispetto a quelle non lipogeniche. In cellule tumorali in coltura, il trattamento con soraphen A, un inibitore dell'acetil-CoA carbossilasi (ACC), blocca la conversione dell'acetil-CoA in malonil-CoA, determinando una riduzione degli acidi grassi saturi e monoinsaturi e, conseguentemente, un aumento relativo della componente polinsatura. In queste condizioni, le cellule tumorali, caratterizzate da una maggiore presenza di acidi grassi polinsaturi, mostrano una maggiore sensibilità alla morte cellulare indotta dallo stress ossidativo e al trattamento con doxorubicina.⁹⁰ Nel complesso, questi risultati evidenziano come l'utilizzo dell'acetil-CoA nella lipogenesi contribuisca a determinare la composizione lipidica delle membrane e, di conseguenza, possa influenzare la sensibilità delle cellule tumorali allo stress ossidativo e ai trattamenti farmacologici. Nel carcinoma mammario gli adipociti peritumorali perdono il proprio contenuto lipidico e gli acidi grassi liberi vengono trasferiti alle cellule tumorali, dove sono immagazzinati in gocce lipidiche per poi essere rimessi in circolo dalla lipasi trigliceridica adiposa (ATGL), la cui espressione nei tumori umani correla con l'aggressività.¹⁴³ Il ruolo di questi acidi grassi è alimentare la β -ossidazione, attiva nelle cellule tumorali e non nell'epitelio mammario normale e permettere la rigenerazione di acetil-CoA all'interno del mitocondrio. L'aumento della capacità invasiva viene completamente abolito *in vitro* dall'inibizione della lipolisi e della β -ossidazione, evidenziando l'importanza del metabolismo degli acidi grassi anche nella progressione tumorale locale. Un ulteriore rimodellamento metabolico si verifica durante la disseminazione metastatica, come dimostrato in modelli sperimentali di melanoma. Le cellule di melanoma umano sono in grado di formare tumori sottocutanei con elevata frequenza, mentre la loro capacità di colonizzare organi distanti risulta limitata dall'elevato stress ossidativo cui sono

sottoposte durante la circolazione e negli organi viscerali. I cloni con maggiore capacità metastatica presentano infatti una maggiore disponibilità di molecole coinvolte nella difesa antiossidante, tra cui il NADPH¹⁴⁴. Questo aspetto assume particolare rilevanza nel contesto del metabolismo lipidico. La lipogenesi de novo richiede infatti un elevato consumo di NADPH: la sintesi di una molecola di palmitato ne utilizza quattordici molecole. Poiché il NADPH è anche essenziale per i sistemi di difesa antiossidante, un'elevata attività lipogenica può ridurre la disponibilità per contrastare lo stress ossidativo. Si configura quindi una competizione metabolica per l'utilizzo del NADPH tra la biosintesi degli acidi grassi e il mantenimento dell'equilibrio redox, con possibili conseguenze sulla capacità delle cellule tumorali di sopravvivere durante il processo metastatico. Complessivamente la cellula neoplastica deve compiere delle "scelte" sul destino dell'acetil-CoA, generando una serie di fenotipi unici in funzione della tipologia tumorale presa in considerazione.

6.2 Carcinoma mammario: ACC1, acetilazione di Smad2 e transizione epitelio-mesenchimale

Nel carcinoma mammario, la disponibilità di acetil-CoA collega segnali extracellulari, acetilazione di proteine non istoniche e comportamento invasivo. Un ruolo centrale è svolto dall'acetil-CoA carbossilasi 1 (ACC1), che converte l'acetil-CoA in malonil-CoA per la sintesi degli acidi grassi, riducendone la disponibilità per le reazioni di acetilazione. La relazione tra consumo di acetil-CoA e acetilazione proteica è stata osservata anche in altri sistemi sperimentali, nei quali la riduzione dell'attività di ACC determina un aumento dell'acetilazione.²³ Questo meccanismo assume particolare interesse nel contesto dell'associazione epidemiologica tra obesità e prognosi del carcinoma mammario.¹⁴⁵ La leptina, un'adipochina prodotta dal tessuto adiposo, attiva una via dipendente da TAK1 che conduce alla fosforilazione inibitoria di ACC1 sulla serina 79. La conseguente riduzione del consumo di acetil-CoA ne favorisce l'accumulo e aumenta l'acetilazione proteica, inclusa quella di Smad2, trasduttore della via del TGFβ.¹⁴⁶ L'acetilazione di Smad2 favorisce la sua localizzazione nucleare e l'attivazione di un programma associato alla transizione epitelio-mesenchimale, caratterizzato dalla riduzione di E-caderina e dall'aumento di N-caderina e vimentina. Coerentemente, il trattamento con TOFA, un inibitore di ACC, aumenta l'acetilazione di Smad2 e induce i marcatori di questo programma. Il

coinvolgimento delle lisine Lys19, Lys20 e Lys39 è stato studiato sostituendole con arginine: TGF β e TOFA inducono la traslocazione nucleare della proteina wild-type, ma non del mutante, sostenendo il ruolo di questi residui nella regolazione della localizzazione di Smad2. Nei campioni umani esaminati, la fosforilazione di ACC1 aumenta passando dal tessuto sano al tumore primario e alle metastasi. Questa osservazione è coerente con i risultati sperimentali, pur non dimostrando da sola un rapporto causale. Nel complesso, il modello mostra come il segnale di un'adipochina possa attivare un programma pro-invasivo attraverso eventi metabolici in cui l'accumulo di acetil-CoA svolge un ruolo centrale.¹⁴⁶

6.3 Glioblastoma: asse acetil-CoA, Ca²⁺ e NFAT nell'adesione e nella migrazione

Nel glioblastoma, l'acetil-CoA è coinvolto nella regolazione dell'adesione e della migrazione attraverso un meccanismo che interessa la segnalazione del calcio e il fattore trascrizionale NFAT. Nelle cellule studiate, una maggiore disponibilità di acetil-CoA si associa all'aumento dell'espressione di geni coinvolti nell'adesione alla matrice extracellulare, nelle interazioni integriniche e nell'organizzazione del citoscheletro. L'inibizione o la deplezione dell'ATP-citrato liasi (ACLY) compromette l'adesione alla fibronectina, la migrazione e l'espressione di geni di adesione, tra cui ITGA2B, indicando il coinvolgimento della produzione nucleo-citosolica di acetil-CoA.¹⁰⁷ L'analisi dei programmi trascrizionali ha individuato NFAT come possibile mediatore. La sua attivazione dipende dalla calcineurina, una fosfatasi attivata dal calcio che, defosforilando NFAT, ne favorisce l'ingresso nel nucleo. Coerentemente, l'inibizione della calcineurina con ciclosporina A riduce l'adesione cellulare. Gli esperimenti con un indicatore fluorescente del calcio hanno mostrato che l'aumento del glucosio o l'aggiunta di acetato incrementano la frequenza delle oscillazioni intracellulari di Ca²⁺. La rimozione del calcio extracellulare mediante EGTA abolisce le oscillazioni persistenti, indicando che il loro mantenimento richiede un apporto dall'esterno. Inoltre, la ionomicina, che aumenta il calcio intracellulare, ripristina adesione e migrazione compromesse dalla scarsità di glucosio o dall'inibizione di ACLY. Questi risultati sostengono il ruolo del calcio come mediatore degli effetti associati alla disponibilità di acetil-CoA.¹⁰⁷ Resta tuttavia da chiarire il meccanismo molecolare che collega l'acetil-CoA alla regolazione del calcio. Il modello individua quindi un asse

acetil-CoA–Ca²⁺–NFAT rilevante per il comportamento cellulare, senza definirne completamente tutti i passaggi.

6.4 Carcinoma della cervice: β -ossidazione, acetil-CoA e staminalità nelle metastasi linfonodali

Nel carcinoma della cervice, il metabolismo lipidico contribuisce all'adattamento delle cellule tumorali alla nicchia linfonodale. Nei modelli esaminati, le cellule metastatiche mostrano una minore dipendenza dalla glicolisi e un maggiore ricorso all'ossidazione degli acidi grassi rispetto a quelle del tumore primario.⁸⁷ Il trattamento delle linee SiHa e HeLa con palmitato aumenta la formazione di sferoidi, l'espressione dei geni associati alla staminalità e la quota di cellule positive all'aldeide deidrogenasi. Un ruolo centrale è svolto dalla carnitina palmitoiltransferasi 1A (CPT1A), che partecipa al trasferimento degli acidi grassi a lunga catena nel mitocondrio.⁸⁷ La sua inibizione riduce la staminalità indotta dal palmitato, collegando l'utilizzo dei lipidi al fenotipo tumorale.⁸⁷ L'acetil-CoA prodotto dalla β -ossidazione non attraversa direttamente la membrana mitocondriale interna: le sue unità carboniose possono raggiungere il compartimento nucleo-citosolico attraverso il citrato, dal quale ACLY rigenera acetil-CoA. Nel modello studiato, questo processo sostiene l'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27ac) sui promotori di geni associati alla staminalità, tra cui SOX2, OCT4, NANOG e CD44. L'inibizione di ACLY con SB204990 contrasta l'acquisizione del fenotipo staminale, sostenendo il coinvolgimento di questa via. Ai risultati sperimentali si affiancano osservazioni su campioni umani: l'espressione di CPT1A è maggiore nei tumori di pazienti con metastasi linfonodali rispetto a quelli senza coinvolgimento linfonodale e si associa a una minore sopravvivenza globale.⁸⁷ Il modello evidenzia quindi come l'utilizzo di nutrienti presenti nella nicchia metastatica possa influenzare la regolazione epigenetica e la plasticità delle cellule neoplastiche.

6.5 Epatocarcinoma: accumulo di acetil-CoA, CXCL1 e reclutamento dei neutrofili

Nel fegato, alterazioni del metabolismo dell'acetil-CoA e dell'acetilazione sono state descritte sia nelle condizioni che predispongono alla trasformazione neoplastica sia nella progressione tumorale. Questi effetti devono essere distinti in base ai

substrati coinvolti: le modificazioni dell'acetilazione istonica qui considerate non coincidono necessariamente con quelle delle proteine non istoniche discusse nel capitolo 5.8. Nei modelli sperimentali di steatosi, l'accumulo lipidico si associa a un aumento dell'acetilazione istonica, a una maggiore accessibilità della cromatina e a marcatori di danno al DNA.¹⁴⁷ Alcune regioni telomero-prossimali, comprendenti oncosoppressori, risultano particolarmente interessate; osservazioni su tessuti umani con steatoepatite indicano alterazioni mutazionali nelle medesime regioni.¹⁴⁸ Un ulteriore contributo alla progressione deriva dalle trappole extracellulari dei neutrofili (NET), strutture costituite da cromatina e proteine granulari.¹⁴⁹ Nei modelli di steatoepatite, gli acidi grassi liberi ne favoriscono la formazione; l'inibizione delle NET riduce la crescita tumorale senza correggere la steatosi, sostenendo il coinvolgimento dell'infiammazione nella progressione della malattia. Nel tumore conclamato, un meccanismo di accumulo dell'acetil-CoA è la riduzione dell'acil-CoA tioesterasi 12 (ACOT12), che ne catalizza l'idrolisi. La minore espressione di ACOT12 si associa a maggiore aggressività e prognosi sfavorevole. Nei modelli studiati, la sua riduzione aumenta l'acetilazione istonica e l'espressione di TWIST2, favorendo la transizione epitelio-mesenchimale.¹⁵⁰ La riduzione di ACOT12 promuove inoltre l'acetilazione dell'istone H3 sul promotore di CXCL1 e l'espressione di questa chemochina. CXCL1 richiama neutrofili che formano NET e favoriscono la metastatizzazione.¹⁵¹ In altri modelli, il DNA delle NET può essere riconosciuto dalla proteina transmembrana CCDC25, che attiva la via ILK- β -parvina e aumenta la motilità tumorale.¹⁵² Queste evidenze collegano il metabolismo dell'acetil-CoA sia a programmi intrinseci della cellula neoplastica sia al reclutamento di componenti del microambiente favorevoli alla progressione.

6.6 Osteosarcoma: ACSS1 e riprogrammazione metabolica pro-metastatica

Nell'osteosarcoma, studi lipidomici indicano un'associazione tra riprogrammazione del metabolismo lipidico e capacità metastatica.¹⁵³ In particolare, l'acetil-CoA sintetasi 1 (ACSS1), enzima mitocondriale che utilizza acetato per produrre acetil-CoA, risulta maggiormente espressa nei tumori metastatici. Nei campioni clinici analizzati, la sua espressione si associa a una minore sopravvivenza globale e libera da metastasi polmonari. Il silenziamento di ACSS1 nelle linee 143B e

SJSA1 riduce proliferazione, migrazione e invasione, altera il metabolismo energetico e aumenta le specie reattive dell'ossigeno⁸³. Si osserva inoltre una riduzione di H3K27ac, anche sul promotore del gene della stearyl-CoA desaturasi (SCD), suggerendo un collegamento tra disponibilità di acetil-CoA e regolazione trascrizionale del metabolismo lipidico. SCD converte acidi grassi saturi in monoinsaturi, contribuendo alla composizione lipidica cellulare e alla sensibilità alla perossidazione¹⁵⁴. Il modello proposto collega quindi l'attività di ACSS1 all'acetilazione istonica sul promotore di SCD e all'aumento della sua espressione, con un assetto lipidico favorevole alla resistenza alla perossidazione. L'incremento delle specie reattive dell'ossigeno dopo silenziamento di ACSS1 è coerente con un'alterazione dell'equilibrio ossidativo, ma non costituisce da solo una dimostrazione di ferroptosi. Resta da chiarire come l'acetil-CoA prodotto nel mitocondrio sostenga l'acetilazione nucleare in questo modello. Il trasferimento delle unità acetiliche attraverso l'acetilcarnitina rappresenta una possibile spiegazione, documentata in altri sistemi, ma non dimostrata nell'osteosarcoma esaminato.¹⁵⁵

Nel complesso, i modelli descritti mostrano come differenti modalità di produzione o accumulo dell'acetil-CoA possano contribuire a invasività, adattamento alla nicchia metastatica e progressione tumorale. Gli effetti dipendono tuttavia dal contesto e dai meccanismi di utilizzo del metabolita, alcuni dei quali restano da definire.

Capitolo 7

Acetil-CoA e immunità antitumorale

7.1 Competizione metabolica nel microambiente tumorale

Nel microambiente tumorale, le cellule neoplastiche e quelle immunitarie competono per nutrienti necessari alla crescita e alle rispettive funzioni. In alcuni modelli, il consumo di glucosio da parte del tumore limita il metabolismo dei linfociti T infiltranti, contribuendo alla compromissione della risposta antitumorale. In un modello murino di sarcoma, questa competizione riduce l'attività di mTOR, la glicolisi e la produzione di interferone γ (IFN- γ) nei linfociti. Nello stesso contesto sperimentale, il blocco dei checkpoint immunitari migliora la disponibilità di glucosio e le funzioni linfocitarie. In particolare, il blocco di PD-L1 riduce la glicolisi delle cellule tumorali, suggerendo che parte dell'effetto dell'immunoterapia possa coinvolgere anche il metabolismo del microambiente.¹⁵⁶ La disponibilità di glucosio influenza, inoltre, la segnalazione intracellulare attraverso il fosfoenolpiruvato (PEP), che contribuisce a mantenere l'attivazione della via Ca^{2+} -NFAT. Quando il PEP diminuisce, viene meno il suo effetto inibitorio su SERCA, la pompa che trasferisce il calcio dal citosol al reticolo endoplasmatico, con conseguente attenuazione del segnale. La sovraespressione della fosfoenolpiruvato carbossichinasi 1 (PCK1), che produce PEP dall'ossalacetato, ripristina le funzioni effettrici e migliora il controllo tumorale nei modelli studiati¹⁵⁷. Alla competizione per i nutrienti si aggiungono gli effetti dei prodotti metabolici tumorali. Nel melanoma, la produzione di acido lattico associata all'attività dell'enzima lattato deidrogenasi A compromette le funzioni dei linfociti T e delle cellule natural killer.¹⁵⁸ Queste condizioni rendono particolarmente rilevanti le vie alternative di approvvigionamento metabolico, comprese quelle che sostengono la produzione di acetil-CoA.

7.2 Acetil-CoA e regolazione di PD-L1

Il legame tra PD-1, espresso dai linfociti T attivati, e il suo ligando PD-L1 trasmette un segnale inibitorio che limita proliferazione, produzione di citochine e attività citotossica. Questo meccanismo fisiologico di controllo della risposta immunitaria può essere sfruttato dalle cellule tumorali per ostacolare la loro eliminazione. Nel melanoma, l'acetil-CoA nucleo-citosolico prodotto dall'ATP-citrato

liasi (ACLY) sostiene l'espressione di PD-L1 attraverso l'acetilazione della lisina 27 dell'istone H3 (H3K27ac) sul promotore di CD274, il gene che codifica il ligando. Il silenziamento di ACLY riduce l'acetilazione del promotore, il trascritto e la proteina di superficie; l'aggiunta di acetato può compensare questo effetto. L'inibitore delle acetiltransferasi p300/CBP A-485 contrasta invece l'induzione di PD-L1 da parte dell'acetato, indicando che la disponibilità del metabolita deve accompagnarsi all'attività degli enzimi che lo utilizzano.¹¹⁸ L'acetilazione del promotore dipende anche dalla rimozione dei gruppi acetile. Nei linfomi a cellule B, HDAC3 contribuisce a reprimere CD274; la sua inibizione aumenta l'acetilazione istonica e l'espressione di PD-L1.¹⁵⁹ Un meccanismo analogo è stato descritto in modelli di resistenza alla chemioterapia, nei quali l'accumulo di c-Jun riduce l'espressione di HDAC3.¹⁶⁰ L'aumento dell'acetilazione può quindi derivare sia da una maggiore disponibilità di acetil-CoA sia da una minore attività deacetilasica. La regolazione interessa anche proteine non istoniche. Nel carcinoma pancreatico, l'acido valproico aumenta PD-L1 sia attraverso meccanismi trascrizionali sia favorendone l'acetilazione e l'interazione con TRAPPC4, coinvolta nel riciclo della proteina verso la membrana¹⁶¹. Questi risultati suggeriscono possibili combinazioni terapeutiche: nei modelli studiati, l'inibizione di ACLY riduce PD-L1 e potenzia la risposta all'immunoterapia. Tuttavia, gli effetti dipendono dal contesto. Nei modelli di linfoma a cellule T esaminati, PD-1 può esercitare una funzione oncosoppressiva: la sua perdita favorisce il metabolismo dipendente da ACLY e programmi trascrizionali associati alla crescita neoplastica.¹⁶² Non è quindi possibile attribuire alla relazione tra acetil-CoA e asse PD-1/PD-L1 un significato univoco in tutti i tumori.

7.3 Acetil-CoA carbossilasi e metabolismo dei linfociti T CD8⁺

La carenza di nutrienti, l'ipossia e la stimolazione antigenica persistente possono compromettere la funzione mitocondriale dei linfociti T infiltranti^{163,164}. L'utilizzo degli acidi grassi rappresenta una possibile forma di adattamento: in alcuni modelli, l'attivazione di PPAR- α favorisce il catabolismo lipidico e migliora la risposta antitumorale, anche in associazione al blocco di PD-1¹⁶⁵. Questo adattamento è influenzato dall'acetil-CoA carbossilasi (ACC), che converte l'acetil-CoA in malonil-CoA. Le due isoforme svolgono funzioni prevalentemente distinte: ACC1 sostiene la sintesi degli acidi grassi, mentre ACC2, associata alla membrana mitocondriale

esterna, produce malonil-CoA coinvolto nell'inibizione di CPT1 e quindi nella regolazione dell'ossidazione lipidica. Nei linfociti CD8⁺ infiltranti dei modelli esaminati, ACC1 risulta aumentata e si osserva un accumulo di gocce lipidiche. Un aumento dell'espressione di ACC1 è stato rilevato anche nei linfociti intratumorali di pazienti con sarcoma rispetto a quelli del sangue periferico.¹⁶⁶ L'accumulo lipidico può accompagnarsi a disfunzione immunitaria; in altri studi, l'eccesso di colesterolo attiva lo stress del reticolo endoplasmatico e il fattore XBP1, favorendo l'espressione di recettori inibitori.¹⁶⁷ L'inibizione di ACC con ND-646, attivo su entrambe le isoforme, riduce l'accumulo lipidico e migliora l'utilizzo degli acidi grassi nei linfociti sottoposti a stress nutrizionale. Nei modelli studiati si osservano un aumento della produzione di ATP e una maggiore efficacia antitumorale.¹⁶⁶ Questi risultati devono essere distinti da quelli ottenuti nei linfociti in condizioni fisiologiche, nei quali ACC1 sostiene la sintesi lipidica necessaria all'espansione: la sua delezione compromette la sopravvivenza delle cellule in divisione, con un difetto parzialmente compensabile mediante acidi grassi esogeni.¹⁶⁸ Gli effetti dell'inibizione dipendono quindi dallo stato cellulare e dalla disponibilità dei nutrienti. Il condizionamento dei linfociti prima del trasferimento adottivo rappresenta una possibile strategia sperimentale, mentre efficacia e sicurezza dell'inibizione sistemica richiedono ulteriori valutazioni.

7.4 Acetato, ACSS2 e funzione dei linfociti T

L'acetato costituisce una fonte alternativa di acetil-CoA utilizzabile sia dalle cellule tumorali sia dai linfociti⁹⁸. Nei linfociti T CD8⁺ sottoposti a restrizione di glucosio, la sua aggiunta può ripristinare l'acetilazione istonica e la produzione di IFN- γ attraverso l'acetil-CoA sintetasi 2 (ACSS2)¹⁶⁹. Nei modelli esaminati, la riduzione di ACSS2 compromette invece la funzione dei linfociti infiltranti e il controllo tumorale. ACLY e ACSS2 contribuiscono in modo diverso all'approvvigionamento di acetil-CoA. Durante la risposta dei linfociti CD8⁺ all'infezione, ACLY sostiene l'utilizzo del carbonio derivato dal glucosio; la sua perdita induce una compensazione attraverso ACSS2 e il metabolismo dell'acetato, che non ripristina però necessariamente tutte le funzioni cellulari.¹⁷⁰ La provenienza dell'acetil-CoA può influenzare anche la distribuzione dell'acetilazione istonica. Nei sistemi studiati, ACLY si associa all'acetiltransferasi KAT2A, mentre ACSS2 interagisce con p300. Questi complessi sostengono programmi trascrizionali differenti: il primo è associato a geni dell'esaurimento

linfocitario, il secondo a funzioni effettrici e di memoria. Durante la stimolazione antigenica cronica, la riduzione di ACSS2 favorisce lo squilibrio verso il programma di esaurimento. L'aumento dell'espressione nucleare di ACSS2 o l'inibizione di ACLY contrastano questo processo e migliorano la risposta antitumorale nei modelli esaminati.¹⁷¹ La competizione per l'acetato introduce tuttavia un'ulteriore complessità. Nei modelli preclinici di carcinoma mammario, l'inibizione di ACSS2 con VY-3-135 riduce l'utilizzo tumorale dell'acetato e ne favorisce la disponibilità per le cellule immunitarie, contribuendo al controllo del tumore¹⁷². La selettività dell'inibitore per l'enzima non implica però una selettività esclusiva per le cellule neoplastiche: occorre considerare anche gli effetti sui linfociti, nei quali ACSS2 può sostenere funzioni protettive.

7.5 Acetil-CoA e popolazioni mieloidi

Le cellule mieloidi possono modificare la disponibilità di metaboliti nel microambiente e influenzare sia la progressione tumorale sia la risposta immunitaria. I macrofagi associati al tumore (TAM), in particolare, possono fornire nutrienti alle cellule neoplastiche¹⁷³. Nel carcinoma epatocellulare, i TAM producono e rilasciano acetato, che viene utilizzato dalle cellule tumorali per sostenere il pool di acetil-CoA e l'acetilazione istonica. Il lattato tumorale promuove nei macrofagi una risposta associata a stress ossidativo, perossidazione lipidica e attività dell'aldeide deidrogenasi 2 (ALDH2), favorendo la produzione di acetato. Questo meccanismo non implica necessariamente una conversione diretta del carbonio del lattato in acetato. Nel modello murino studiato, la delezione mieloide di Aldh2 riduce l'acetato nelle cellule tumorali e le metastasi polmonari, senza modificare significativamente la crescita del tumore primario¹⁷⁴. Nelle cellule dendritiche, la ripartizione dell'acetil-CoA tra sintesi lipidica e acetilazione istonica contribuisce invece alla funzione immunitaria. La perdita di TSC1 aumenta l'attività della via mTOR e l'espressione di ACC1, favorendo la lipogenesi a scapito dell'acetilazione istonica. Ne consegue una riduzione dell'espressione di MHC di classe I e interleuchina 7, con compromissione delle risposte dei linfociti CD8⁺ e del controllo tumorale nei modelli esaminati¹⁷⁵. Un ulteriore collegamento riguarda i neutrofili, già discussi nel capitolo 6. Nell'epatocarcinoma, l'accumulo di acetil-CoA aumenta l'acetilazione istonica sul promotore di CXCL1 e la produzione della chemochina, favorendo il reclutamento dei neutrofili e la formazione

delle loro trappole extracellulari (NET). La riduzione dell'acetil-CoA mediante sovraespressione di ACOT12, il silenziamento di CXCL1 o la degradazione delle NET contrastano la metastatizzazione nei modelli studiati¹⁵¹. L'asse acetil-CoA–CXCL1–neutrofili rappresenta pertanto una possibile vulnerabilità, ancora da validare sul piano terapeutico.

7.6 Implicazioni terapeutiche e limiti

La condivisione delle vie metaboliche tra cellule neoplastiche e immunitarie rende complessa la scelta dei bersagli terapeutici. Ridurre la disponibilità di acetil-CoA o modificarne l'utilizzo può ostacolare il tumore, ma anche compromettere le cellule che dovrebbero eliminarlo. L'inibizione di ACSS2 può limitare il consumo tumorale di acetato e favorirne la disponibilità nel microambiente. Tuttavia, nei linfociti lo stesso enzima sostiene programmi effettori e di memoria: il beneficio dipende quindi dall'effetto complessivo sulle diverse popolazioni cellulari¹⁷¹. Anche ACLY presenta effetti dipendenti dal contesto. Nelle cellule tumorali, la sua inibizione può ridurre l'espressione di PD-L1 e migliorare la risposta al blocco di PD-1¹¹⁸. Nei linfociti, invece, ACLY sostiene la risposta all'attivazione¹⁷⁰ ma può contribuire ai programmi di esaurimento durante la stimolazione cronica.¹⁷¹ Queste osservazioni non definiscono ancora una finestra terapeutica clinicamente validata, ma indicano la necessità di considerare lo stato differenziativo e metabolico dei linfociti. L'inibizione di ACC riduce la sintesi lipidica e la crescita tumorale in modelli di carcinoma polmonare non a piccole cellule¹⁷⁶ e può migliorare la funzione dei linfociti infiltranti.¹⁶⁶ D'altra parte, ACC1 è necessaria all'espansione linfocitaria in altri contesti.¹⁶⁸ La disponibilità di lipidi esogeni può modificare la risposta, ma non è sufficiente, da sola, a prevedere la sicurezza del trattamento. Infine, l'inibizione di p300/CBP può contrastare programmi tumorali in alcuni modelli¹⁷⁷, ma rischia di interferire anche con la regolazione dei geni effettori nei linfociti. I risultati ottenuti colpendo domini o attività differenti di queste proteine non sono automaticamente equivalenti.

Nel complesso, il metabolismo dell'acetil-CoA offre possibili bersagli per potenziare l'immunità antitumorale. La loro applicazione richiede però di chiarire quali cellule colpire, in quale fase della risposta e con quali conseguenze sul sistema immunitario. La selettività cellulare, la compensazione metabolica e la validazione clinica rimangono quindi questioni centrali.

Capitolo 8

Acetil-CoA e resistenza terapeutica

I capitoli precedenti hanno esaminato il coinvolgimento dell'acetil-CoA nella progressione tumorale. Questo capitolo considera invece il suo contributo alla resistenza a trattamenti specifici, attraverso la regolazione del riparo del DNA, del metabolismo lipidico e dei programmi di sopravvivenza cellulare. Le evidenze descritte delineano possibili bersagli terapeutici, ma derivano prevalentemente da studi preclinici e non definiscono ancora strategie applicabili nella pratica clinica.

8.1 Acetil-CoA e riparo del DNA: sensibilità agli inibitori di PARP e radioresistenza mammaria

Le rotture a doppio filamento del DNA possono essere riparate attraverso diverse vie, tra cui la ricombinazione omologa e il ricongiungimento delle estremità non omologhe. La prima utilizza una sequenza omologa come stampo ed è attiva soprattutto nelle fasi S e G2; la seconda opera durante tutto il ciclo cellulare e può comportare alterazioni della sequenza. Alla scelta contribuiscono BRCA1 e 53BP1, che favoriscono rispettivamente la resezione delle estremità e la loro protezione¹⁷⁸. L'acetilazione della cromatina influenza il reclutamento di queste proteine¹⁷⁹. In seguito al danno, ACLY nucleare viene fosforilata sulla serina 455 a valle di ATM e AKT e sostiene la produzione locale di acetil-CoA. L'acetilazione istonica risultante limita l'accumulo di 53BP1 e favorisce il reclutamento di BRCA1 e la ricombinazione omologa. Nei modelli studiati, il silenziamento di ACLY compromette questa via e aumenta l'instabilità genomica e la morte cellulare indotte dall'inibitore di PARP olaparib.¹⁰⁵ Il risultato suggerisce una possibile vulnerabilità farmacologica, senza rendere la perdita di ACLY automaticamente equivalente a una mutazione di BRCA1. Un secondo esempio riguarda la radioresistenza mammaria. Nei modelli esaminati, l'acetil-CoA sintetasi mitocondriale ACSS1 sostiene la sopravvivenza dopo irradiazione, mentre il suo silenziamento aumenta la radiosensibilità. Gli autori propongono che l'irradiazione favorisca la produzione non enzimatica di acetato attraverso la reazione tra piruvato e specie reattive dell'ossigeno; ACSS1 utilizza quindi l'acetato per produrre acetil-CoA⁸⁴. L'aumento del pool nucleare si associa a maggiore acetilazione istonica e al reclutamento dei fattori della ricombinazione omologa. L'inibizione del trasporto del citrato o di ACLY contrasta questo aumento,

sostenendo il coinvolgimento dell'asse mitocondrio–citrato–ACLY.⁸⁴ Nelle analisi retrospettive dello studio, un'elevata espressione di ACSS1 si associa a un minore beneficio dalla radioterapia. Il dato richiede tuttavia una validazione prospettica: non consente di classificare rigidamente i sottotipi mammari come radiosensibili o radioresistenti, né di utilizzare ACSS1 per escludere pazienti dal trattamento.

8.2 Resistenza al cetuximab nel carcinoma squamoso di testa e collo

Il cetuximab è un anticorpo monoclonale diretto contro il recettore del fattore di crescita epidermico, EGFR. Nei modelli di carcinoma squamoso di testa e collo esaminati, il trattamento riduce la segnalazione di HIF-1 α e la glicolisi, inducendo uno stress energetico e l'attivazione di AMPK¹⁸⁰. Tra i bersagli di AMPK figura l'acetil-CoA carbossilasi (ACC), la cui fosforilazione riduce la sintesi degli acidi grassi e può favorirne l'ossidazione¹⁸¹. Nelle cellule con resistenza acquisita al cetuximab, tuttavia, l'aumento di AMPK e ACC fosforilate si accompagna a una maggiore quantità di ACC totale, senza un corrispondente incremento dei trascritti. Questa osservazione suggerisce una regolazione post-trascrizionale, il cui meccanismo resta da chiarire. Il coinvolgimento di ACC è sostenuto da esperimenti con mutanti non fosforilabili, che proteggono le cellule dall'inibizione della crescita indotta dal cetuximab. Viceversa, il silenziamento di ACC aumenta l'apoptosi nelle cellule resistenti. Negli xenotrapianti murini, l'associazione tra cetuximab e TOFA, un inibitore di ACC, riduce la crescita tumorale più dei singoli trattamenti¹⁸⁰. Questi risultati indicano una possibile strategia di associazione, ma non dimostrano efficacia o sicurezza nell'uomo. Anche l'impiego dell'espressione di ACC come criterio per selezionare i pazienti richiede validazione. L'eventuale estensione del meccanismo ad altri farmaci che alterano il metabolismo tumorale rimane un'ipotesi da verificare.

8.3 ACLY e chemioresistenza nel carcinoma del colon-retto

Nel carcinoma del colon-retto, ACLY è stata collegata alla chemioresistenza attraverso meccanismi che coinvolgono sia la produzione di acetil-CoA sia le modificazioni della proteina stessa. Nel primo modello, l'attività di ACLY sostiene l'acetilazione degli istoni H3K9 e H4K16 e l'espressione di ABCB1, noto anche come MDR1, che codifica la glicoproteina P, una pompa di efflusso coinvolta nella resistenza a diversi farmaci. La sovraespressione di ACLY aumenta MDR1, mentre l'inibizione

dell'enzima ne riduce l'espressione. Nei campioni tumorali umani, i livelli delle due proteine risultano positivamente correlati. Nelle cellule studiate, la sovraespressione di ACLY si accompagna inoltre a un aumento di circa due volte dell'IC₅₀ del 5-fluorouracile. Il risultato indica una minore sensibilità al trattamento, ma non dimostra da solo che essa dipenda dall'espulsione diretta del farmaco attraverso MDR1. Analogamente, le variazioni dell'acetilazione istonica sostengono un meccanismo di regolazione trascrizionale, senza dimostrare modificazioni specifiche sul promotore di ABCB1, non direttamente analizzate nello studio¹⁸². Il secondo meccanismo riguarda l'acetilazione di ACLY sulla lisina 978. Nei campioni e nei modelli esaminati, una minore acetilazione di questo residuo si associa alla chemioresistenza. La sostituzione della lisina con arginina, che impedisce l'acetilazione, riduce l'apoptosi indotta dal 5-fluorouracile e favorisce la crescita tumorale¹⁸³. La deacetilazione di K978 favorisce l'accumulo nucleare di ACLY e l'interazione con RBM15, una proteina coinvolta nella deposizione della modificazione N⁶-metiladenosina (m⁶A) sugli RNA. Questo processo aumenta la modificazione del trascritto di NOXA, ne riduce la stabilità e diminuisce l'espressione della proteina proapoptotica, attenuando la risposta al farmaco. Lo studio identifica inoltre HDAC2 come deacetilasi coinvolta: contrastarne l'attività aumenta l'acetilazione di K978 e la sensibilità al 5-fluorouracile nei modelli sperimentali¹⁸³. I due esempi mostrano che quantità, attività e stato di acetilazione di ACLY non sono aspetti intercambiabili. Non è però dimostrato che ridurre globalmente l'acetil-CoA provochi necessariamente la deacetilazione di K978 e attivi l'asse RBM15–NOXA, compensando la riduzione di MDR1. Questa possibilità richiede esperimenti specifici e non può essere dedotta direttamente dal confronto tra i due studi.

Nel complesso, il metabolismo dell'acetil-CoA contribuisce a diversi meccanismi di resistenza terapeutica. Le evidenze giustificano ulteriori studi sulle associazioni farmacologiche e sui possibili biomarcatori, ma il passaggio alla pratica clinica richiede conferme sull'efficacia, sulla sicurezza e sui criteri di selezione dei pazienti.

Conclusioni

Le evidenze esaminate mostrano che l'acetil-CoA svolge un ruolo che supera quello di intermedio del metabolismo energetico. Collegando disponibilità dei nutrienti, biosintesi lipidica e acetilazione proteica, contribuisce alla regolazione di processi coinvolti nella crescita tumorale, nell'adattamento al microambiente e nella risposta ai trattamenti. Un primo elemento emerso è la flessibilità delle vie di approvvigionamento. Le cellule neoplastiche possono utilizzare substrati diversi per produrre acetil-CoA e, in alcuni contesti, compensare l'inibizione di una via attraverso l'attivazione di percorsi alternativi. Questa plasticità costituisce un possibile ostacolo terapeutico e rende necessario considerare le caratteristiche metaboliche del singolo tumore. Inoltre, la concentrazione cellulare totale non descrive necessariamente la disponibilità del metabolita nei compartimenti in cui viene utilizzato. Un secondo elemento riguarda la specificità degli effetti dell'acetilazione. Le modifiche istoniche possono influenzare programmi trascrizionali coinvolti nella proliferazione, nella plasticità cellulare e nel riparo del DNA; quelle non istoniche possono modificare attività, stabilità, localizzazione e interazioni delle proteine. Tuttavia, l'effetto dipende dal substrato e dal residuo interessato: un aumento dell'acetilazione non corrisponde quindi necessariamente a un vantaggio per la cellula tumorale, né la sua riduzione garantisce un beneficio terapeutico. L'analisi del microambiente evidenzia un'ulteriore complessità. Cellule neoplastiche e cellule immunitarie condividono vie metaboliche e competono per alcuni nutrienti. Di conseguenza, un intervento capace di ostacolare il tumore può compromettere anche la risposta antitumorale, mentre altri interventi possono potenziarla in condizioni specifiche. La selettività cellulare, il contesto metabolico e la possibilità di compensazione devono pertanto essere valutati insieme. Gli studi sulla resistenza terapeutica indicano che il metabolismo dell'acetil-CoA può contribuire al riparo del danno al DNA, alla regolazione dei programmi di sopravvivenza e all'espressione di proteine associate alla chemioresistenza. Questi risultati delineano possibili vulnerabilità, ma derivano in larga parte da modelli preclinici e non definiscono ancora strategie applicabili in modo generalizzato. Restano da chiarire diversi collegamenti tra produzione locale di acetil-CoA, modificazioni proteiche ed esiti funzionali, così come i criteri per identificare i tumori maggiormente dipendenti da specifiche vie. Nel complesso, l'acetil-CoA emerge come

un regolatore del fenotipo neoplastico il cui potenziale terapeutico richiede interventi mirati e una validazione rigorosa dell'efficacia e della sicurezza.

Bibliografia

1. Shi L, Tu BP. Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;33:125-131. PMID: 25703630.
2. Walsh CT, Tu BP, Tang Y. Eight Kinetically Stable but Thermodynamically Activated Molecules that Power Cell Metabolism. *Chem Rev*. 2018;118(4):1460-1494. PMID: 29272116.
3. Herzig S, Raemy E, Montessuit S, Veuthey JL, Zamboni N, Westermann B, Kunji ER, Martinou JC. Identification and functional expression of the mitochondrial pyruvate carrier. *Science*. 2012;337(6090):93-96. PMID: 22628554.
4. Pietrocola F, Galluzzi L, Bravo-San Pedro JM, Madeo F, Kroemer G. Acetyl coenzyme A: a central metabolite and second messenger. *Cell Metab*. 2015;21(6):805-821. PMID: 26039447.
5. Rufer AC, Thoma R, Hennig M. Structural insight into function and regulation of carnitine palmitoyltransferase. *Cell Mol Life Sci*. 2009;66(15):2489-2501. PMID: 19430727.
6. Harris RA, Joshi M, Jeoung NH, Obayashi M. Overview of the molecular and biochemical basis of branched-chain amino acid catabolism. *J Nutr*. 2005;135(6 Suppl):1527S-30S. PMID: 15930464.
7. Cahill GF. Fuel metabolism in starvation. *Annu Rev Nutr*. 2006;26:1-22. PMID: 16848698.
8. Halestrap AP, Price NT. The proton-linked monocarboxylate transporter (MCT) family: structure, function and regulation. *Biochem J*. 1999;343 Pt 2(Pt 2):281-299. PMID: 10510291.
9. Fritz KS, Green MF, Petersen DR, Hirschey MD. Ethanol metabolism modifies hepatic protein acylation in mice. *PLoS One*. 2013;8(9):e75868. PMID: 24073283.
10. Schug ZT, Peck B, Jones DT, Zhang Q, Grosskurth S, Alam IS, Goodwin LM, Smethurst E, Mason S, Blyth K, McGarry L, James D, Shanks E, Kalna G, Saunders RE, Jiang M, Howell M, Lassailly F, Thin MZ, Spencer-Dene B, Stamp G, van den Broek NJ, Mackay G, Bulusu V, Kamphorst JJ, Tardito S, Strachan D, Harris AL, Aboagye EO, Critchlow SE, Wakelam MJ, Schulze A, Gottlieb E. Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell*. 2015;27(1):57-71. PMID: 25584894.
11. Sivanand S, Viney I, Wellen KE. Spatiotemporal Control of Acetyl-CoA Metabolism in Chromatin Regulation. *Trends Biochem Sci*. 2017;43(1):61-74. PMID: 29174173.
12. Kanamori A, Nakayama J, Fukuda MN, Stallcup WB, Sasaki K, Fukuda M, Hirabayashi Y. Expression cloning and characterization of a cDNA encoding a novel membrane protein required for the formation of O-acetylated ganglioside: a putative acetyl-CoA transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(7):2897-2902. PMID: 9096318.
13. Damiano F, Tocci R, Gnoni GV, Siculella L. Expression of citrate carrier gene is activated by ER stress effectors XBP1 and ATF6 α , binding to an UPRE in its promoter. *Biochim Biophys Acta*. 2015;1849(1):23-31. PMID: 25450523.
14. Chen Y, Siewers V, Nielsen J. Profiling of cytosolic and peroxisomal acetyl-CoA metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One*. 2012;7(8):e42475. PMID: 22876324.
15. Wellen KE, Snyder NW. Should we consider subcellular compartmentalization of metabolites, and if so, how do we measure them? *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*. 2019;22(5):347-354. PMID: 31365463.
16. Boroughs LK, DeBerardinis RJ. Metabolic pathways promoting cancer cell survival and growth. *Nat Cell Biol*. 2015;17(4):351-359. PMID: 25774832.
17. Newman JC, Verdin E. Ketone bodies as signaling metabolites. *Trends Endocrinol Metab*. 2014;25(1):42-52. PMID: 24140022.
18. Cotter DG, Schugar RC, Crawford PA. Ketone body metabolism and cardiovascular disease. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2013;304(8):H1060-76. PMID: 23396451.
19. Shimazu T, Hirschey MD, Newman J, He W, Shirakawa K, Le Moan N, Grueter CA, Lim H, Saunders LR, Stevens RD, Newgard CB, Farese RV, de Cabo R, Ulrich S, Akassoglou K, Verdin E. Suppression of oxidative stress by β -hydroxybutyrate, an endogenous histone deacetylase inhibitor. *Science*. 2013;339(6116):211-214. PMID: 23223453.
20. Brownsey RW, Boone AN, Elliott JE, Kulpa JE, Lee WM. Regulation of acetyl-CoA carboxylase. *Biochem Soc Trans*. 2006;34(Pt 2):223-227. PMID: 16545081.
21. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, Bain J, Stevens R, Dyck JR, Newgard CB, Lopaschuk GD, Muoio DM. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab*. 2008;7(1):45-56. PMID: 18177724.
22. Edwards PA, Ericsson J. Sterols and isoprenoids: signaling molecules derived from the cholesterol biosynthetic pathway. *Annu Rev Biochem*. 1999;68:157-185. PMID: 10872447.
23. Chow JD, Lawrence RT, Healy ME, Dominy JE, Liao JA, Breen DS, Byrne FL, Kenwood BM, Lackner C, Okutsu S, Mas VR, Caldwell SH, Tomsig JL, Cooney GJ, Puigserver PB, Turner N, James DE, Villén J, Hoehn KL. Genetic inhibition of hepatic acetyl-CoA carboxylase activity increases liver fat and alters global protein acetylation. *Mol Metab*. 2014;3(4):419-431. PMID: 24944901.
24. Zaidi N, Swinnen JV, Smans K. ATP-citrate lyase: a key player in cancer metabolism. *Cancer Res*. 2012;72(15):3709-3714. PMID: 22787121.
25. Mizuarai S, Miki S, Araki H, Takahashi K, Kotani H. Identification of dicarboxylate carrier Slc25a10 as malate transporter in de novo fatty acid synthesis. *J Biol Chem*. 2005;280(37):32434-32441. PMID: 16027120.
26. Rebouche CJ, Seim H. Carnitine metabolism and its regulation in microorganisms and mammals. *Annu Rev Nutr*. 1998;18:39-61. PMID: 9706218.

27. Muoio DM, Noland RC, Kovalik JP, Seiler SE, Davies MN, DeBalsi KL, Ilkayeva OR, Stevens RD, Kheterpal I, Zhang J, Covington JD, Bajpeyi S, Ravussin E, Kraus W, Koves TR, Mynatt RL. Muscle-specific deletion of carnitine acetyltransferase compromises glucose tolerance and metabolic flexibility. *Cell Metab.* 2012;15(5):764-777. PMID: 22560225.
28. Infantino V, Iacobazzi V, Menga A, Avantiaggiati ML, Palmieri F. A key role of the mitochondrial citrate carrier (SLC25A1) in TNF α - and IFN γ -triggered inflammation. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1839(11):1217-1225. PMID: 25072865.
29. Yang C, Ko B, Hensley CT, Jiang L, Wasti AT, Kim J, Sudderth J, Calvaruso MA, Lumata L, Mitsche M, Rutter J, Merritt ME, DeBerardinis RJ. Glutamine oxidation maintains the TCA cycle and cell survival during impaired mitochondrial pyruvate transport. *Mol Cell.* 2014;56(3):414-424. PMID: 25458842.
30. Zhao S, Torres A, Henry RA, Trefely S, Wallace M, Lee JV, Carrer A, Sengupta A, Campbell SL, Kuo YM, Frey AJ, Meurs N, Viola JM, Blair IA, Weljie AM, Metallo CM, Snyder NW, Andrews AJ, Wellen KE. ATP-Citrate Lyase Controls a Glucose-to-Acetate Metabolic Switch. *Cell Rep.* 2016;17(4):1037-1052. PMID: 27760311.
31. Bulusu V, Tumanov S, Michalopoulou E, van den Broek NJ, MacKay G, Nixon C, Dhayade S, Schug ZT, Vande Voorde J, Blyth K, Gottlieb E, Vazquez A, Kamphorst JJ. Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation. *Cell Rep.* 2017;18(3):647-658. PMID: 28099844.
32. Sutendra G, Kinnaird A, Dromparis P, Paulin R, Stenson TH, Haromy A, Hashimoto K, Zhang N, Flaim E, Michelakis ED. A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell.* 2014;158(1):84-97. PMID: 24995980.
33. Zervopoulos SD, Boukouris AE, Saleme B, Haromy A, Tejay S, Sutendra G, Michelakis ED. MFN2-driven mitochondria-to-nucleus tethering allows a non-canonical nuclear entry pathway of the mitochondrial pyruvate dehydrogenase complex. *Mol Cell.* 2022;82(5):1066-1077.e7. PMID: 35245450.
34. Mendoza M, Egervari G, Sidoli S, Donahue G, Alexander DC, Sen P, Garcia BA, Berger SL. Enzymatic transfer of acetate on histones from lysine reservoir sites to lysine activating sites. *Sci Adv.* 2022;8(3): eabj5688. PMID: 35061542.
35. Tsuchiya Y, Pham U, Hu W, Ohnuma S, Gout I. Changes in acetyl CoA levels during the early embryonic development of *Xenopus laevis*. *PLoS One.* 2014;9(5):e97693. PMID: 24831956.
36. Langer MR, Fry CJ, Peterson CL, Denu JM. Modulating acetyl-CoA binding in the GCN5 family of histone acetyltransferases. *J Biol Chem.* 2002;277(30):27337-27344. PMID: 11994311.
37. Albaugh BN, Arnold KM, Denu JM. KAT (ching) metabolism by the tail: insight into the links between lysine acetyltransferases and metabolism. *Chembiochem.* 2011;12(2):290-298. PMID: 21243716.
38. Mariño G, Pietrocola F, Eisenberg T, Kong Y, Malik SA, Andryushkova A, Schroeder S, Pendl T, Harger A, Niso-Santano M, Zamzami N, Scoazec M, Durand S, Enot DP, Fernández ÁF, Martins I, Kepp O, Senovilla L, Bauvy C, Morselli E, Vacchelli E, Bennetzen M, Magnes C, Sinner F, Pieber T, López-Otín C, Maiuri MC, Codogno P, Andersen JS, Hill JA, Madeo F, Kroemer G. Regulation of autophagy by cytosolic acetyl-coenzyme A. *Mol Cell.* 2014;53(5):710-725. PMID: 24560926.
39. Choudhary C, Weinert BT, Nishida Y, Verdin E, Mann M. The growing landscape of lysine acetylation links metabolism and cell signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(8):536-550. PMID: 25053359.
40. Hollebeke J, Van Damme P, Gevaert K. N-terminal acetylation and other functions of N α -acetyltransferases. *Biol Chem.* 2012;393(4):291-298. PMID: 22718636.
41. Chang HC, Guarente L. SIRT1 and other sirtuins in metabolism. *Trends Endocrinol Metab.* 2014;25(3):138-145. PMID: 24388149.
42. Wagner GR, Payne RM. Widespread and enzyme-independent N ϵ -acetylation and N ϵ -succinylation of proteins in the chemical conditions of the mitochondrial matrix. *J Biol Chem.* 2013;288(40):29036-29045. PMID: 23946487.
43. Takahashi H, McCaffery JM, Irizarry RA, Boeke JD. Nucleocytoplasmic acetyl-coenzyme A synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Mol Cell.* 2006;23(2):207-217. PMID: 16857587.
44. Wellen KE, Hatzivassiliou G, Sachdeva UM, Bui TV, Cross JR, Thompson CB. ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science.* 2009;324(5930):1076-1080. PMID: 19461003.
45. WARBURG O. On the origin of cancer cells. *Science.* 1956;123(3191):309-314. PMID: 13298683.
46. Vazquez A, Kamphorst JJ, Markert EK, Schug ZT, Tardito S, Gottlieb E. Cancer metabolism at a glance. *J Cell Sci.* 2016;129(18):3367-3373. PMID: 27635066.
47. Papandreou I, Cairns RA, Fontana L, Lim AL, Denko NC. HIF-1 mediates adaptation to hypoxia by actively downregulating mitochondrial oxygen consumption. *Cell Metab.* 2006;3(3):187-197. PMID: 16517406.
48. Mullen AR, Wheaton WW, Jin ES, Chen PH, Sullivan LB, Cheng T, Yang Y, Linehan WM, Chandel NS, DeBerardinis RJ. Reductive carboxylation supports growth in tumour cells with defective mitochondria. *Nature.* 2012;481(7381):385-388. PMID: 22101431.
49. Metallo CM, Gameiro PA, Bell EL, Mattaini KR, Yang J, Hiller K, Jewell CM, Johnson ZR, Irvine DJ, Guarente L, Kelleher JK, Vander Heiden MG, Iliopoulos O, Stephanopoulos G. Reductive glutamine metabolism by IDH1 mediates lipogenesis under hypoxia. *Nature.* 2012;481(7381):380-384. PMID: 22101433.
50. Locasale JW, Grassian AR, Melman T, Lyssiotis CA, Mattaini KR, Bass AJ, Heffron G, Metallo CM, Muranen T, Sharfi H, Sasaki AT, Anastasiou D, Mullarky E, Vokes NI, Sasaki M, Beroukhim R, Stephanopoulos G, Ligon AH, Meyerson M, Richardson AL, Chin L, Wagner G, Asara JM, Brugge JS, Cantley LC, Vander Heiden MG. Phosphoglycerate dehydrogenase diverts glycolytic flux and contributes to oncogenesis. *Nat Genet.* 2011;43(9):869-874. PMID: 21804546.

51. Possemato R, Marks KM, Shaul YD, Pacold ME, Kim D, Birsoy K, Sethumadhavan S, Woo HK, Jang HG, Jha AK, Chen WW, Barrett FG, Stransky N, Tsun ZY, Cowley GS, Barretina J, Kalaany NY, Hsu PP, Ottina K, Chan AM, Yuan B, Garraway LA, Root DE, Mino-Kenudson M, Brachtel EF, Driggers EM, Sabatini DM. Functional genomics reveal that the serine synthesis pathway is essential in breast cancer. *Nature*. 2011;476(7360):346-350. PMID: 21760589.
52. Labuschagne CF, van den Broek NJ, Mackay GM, Vousden KH, Maddocks OD. Serine, but not glycine, supports one-carbon metabolism and proliferation of cancer cells. *Cell Rep*. 2014;7(4):1248-1258. PMID: 24813884.
53. Lewis CA, Parker SJ, Fiske BP, McCloskey D, Gui DY, Green CR, Vokes NI, Feist AM, Vander Heiden MG, Metallo CM. Tracing compartmentalized NADPH metabolism in the cytosol and mitochondria of mammalian cells. *Mol Cell*. 2014;55(2):253-263. PMID: 24882210.
54. Pegg AE. Mammalian polyamine metabolism and function. *IUBMB Life*. 2009;61(9):880-894. PMID: 19603518.
55. Casero RA, Marton LJ. Targeting polyamine metabolism and function in cancer and other hyperproliferative diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2007;6(5):373-390. PMID: 17464296.
56. Pegg AE. Spermidine/spermine-N (1)-acetyltransferase: a key metabolic regulator. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2008;294(6): E995-1010. PMID: 18349109.
57. Pietrocola F, Lachkar S, Enot DP, Niso-Santano M, Bravo-San Pedro JM, Sica V, Izzo V, Maiuri MC, Madeo F, Mariño G, Kroemer G. Spermidine induces autophagy by inhibiting the acetyltransferase EP300. *Cell Death Differ*. 2015;22(3):509-516. PMID: 25526088.
58. Qiu F, Huang J, Sui M. Targeting arginine metabolism pathway to treat arginine-dependent cancers. *Cancer Lett*. 2015;364(1):1-7. PMID: 25917076.
59. Zheng L, MacKenzie ED, Karim SA, Hedley A, Blyth K, Kalna G, Watson DG, Szlosarek P, Frezza C, Gottlieb E. Reversed argininosuccinate lyase activity in fumarate hydratase-deficient cancer cells. *Cancer Metab*. 2013;1(1):12. PMID: 24280230.
60. Nowicki S, Gottlieb E. Oncometabolites: tailoring our genes. *FEBS J*. 2015;282(15):2796-2805. PMID: 25864878.
61. Selak MA, Armour SM, MacKenzie ED, Boulahbel H, Watson DG, Mansfield KD, Pan Y, Simon MC, Thompson CB, Gottlieb E. Succinate links TCA cycle dysfunction to oncogenesis by inhibiting HIF- α prolyl hydroxylase. *Cancer Cell*. 2005;7(1):77-85. PMID: 15652751.
62. Frezza C, Pollard PJ, Gottlieb E. Inborn and acquired metabolic defects in cancer. *J Mol Med (Berl)*. 2011;89(3):213-220. PMID: 21301796.
63. DeBose-Boyd RA, Ye J. SREBPs in Lipid Metabolism, Insulin Signaling, and Beyond. *Trends Biochem Sci*. 2018;43(5):358-368. PMID: 29500098.
64. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, Triantafellow E, Ma Q, Gorski R, Cleaver S, Vander Heiden MG, MacKeigan JP, Finan PM, Clish CB, Murphy LO, Manning BD. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 2010;39(2):171-183. PMID: 20670887.
65. Park JH, Pyun WY, Park HW. Cancer Metabolism: Phenotype, Signaling and Therapeutic Targets. *Cells*. 2020;9(10):2308. PMID: 33081387.
66. Gouw AM, Margulis K, Liu NS, Raman SJ, Mancuso A, Toal GG, Tong L, Mosley A, Hsieh AL, Sullivan DK, Stine ZE, Altman BJ, Schulze A, Dang CV, Zare RN, Felsher DW. The MYC Oncogene Cooperates with Sterol-Regulated Element-Binding Protein to Regulate Lipogenesis Essential for Neoplastic Growth. *Cell Metab*. 2019;30(3):556-572.e5. PMID: 31447321.
67. White PJ, McGarrah RW, Grimsrud PA, Tso SC, Yang WH, Haldeman JM, Grenier-Larouche T, An J, Lapworth AL, Astapova I, Hannou SA, George T, Arlotto M, Olson LB, Lai M, Zhang GF, Ilkayeva O, Herman MA, Wynn RM, Chuang DT, Newgard CB. The BCKDH Kinase and Phosphatase Integrate BCAA and Lipid Metabolism via Regulation of ATP-Citrate Lyase. *Cell Metab*. 2018;27(6):1281-1293.e7. PMID: 29779826.
68. Potapova IA, El-Maghrabi MR, Doronin SV, Benjamin WB. Phosphorylation of recombinant human ATP: citrate lyase by cAMP-dependent protein kinase abolishes homotropic allosteric regulation of the enzyme by citrate and increases the enzyme activity. Allosteric activation of ATP: citrate lyase by phosphorylated sugars. *Biochemistry*. 2000;39(5):1169-1179. PMID: 10653665.
69. Lin R, Tao R, Gao X, Li T, Zhou X, Guan KL, Xiong Y, Lei QY. Acetylation stabilizes ATP-citrate lyase to promote lipid biosynthesis and tumor growth. *Mol Cell*. 2013;51(4):506-518. PMID: 23932781.
70. Zhang C, Liu J, Huang G, Zhao Y, Yue X, Wu H, Li J, Zhu J, Shen Z, Haffty BG, Hu W, Feng Z. Cullin3-KLHL25 ubiquitin ligase targets ACLY for degradation to inhibit lipid synthesis and tumor progression. *Genes Dev*. 2016;30(17):1956-1970. PMID: 27664236.
71. Basappa J, Citir M, Zhang Q, Wang HY, Liu X, Melnikov O, Yahya H, Stein F, Muller R, Traynor-Kaplan A, Schultz C, Wasik MA, Ptasznik A. ACLY is the novel signaling target of PIP/PIP2 and Lyn in acute myeloid leukemia. *Heliyon*. 2020;6(5):e03910. PMID: 32420483.
72. Wang J, Ye W, Yan X, Guo Q, Ma Q, Lin F, Huang J, Jin J. Low expression of ACLY associates with favorable prognosis in acute myeloid leukemia. *J Transl Med*. 2019;17(1):149. PMID: 31077215.
73. Chen Y, Li K, Gong D, Zhang J, Li Q, Zhao G, Lin P. ACLY: A biomarker of recurrence in breast cancer. *Pathol Res Pract*. 2020;216(9):153076. PMID: 32825949.
74. Guertin DA, Wellen KE. Acetyl-CoA metabolism in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2023;23(3):156-172. PMID: 36658431.
75. Kondo A, Yamamoto S, Nakaki R, Shimamura T, Hamakubo T, Sakai J, Kodama T, Yoshida T, Aburatani H, Osawa T. Extracellular Acidic pH Activates the Sterol Regulatory Element-Binding Protein 2 to Promote Tumor Progression. *Cell Rep*. 2017;18(9):2228-2242. PMID: 28249167.

76. Hallows WC, Lee S, Denu JM. Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103(27):10230-10235. PMID: 16790548.
77. Li X, Yu W, Qian X, Xia Y, Zheng Y, Lee JH, Li W, Lyu J, Rao G, Zhang X, Qian CN, Rozen SG, Jiang T, Lu Z. Nucleus-Translocated ACSS2 Promotes Gene Transcription for Lysosomal Biogenesis and Autophagy. *Mol Cell*. 2017;66(5):684-697.e9. PMID: 28552616.
78. Zhang S, He J, Jia Z, Yan Z, Yang J. Acetyl-CoA synthetase 2 enhances tumorigenesis and is indicative of a poor prognosis for patients with renal cell carcinoma. *Urol Oncol*. 2018;36(5):243.e9-243.e20. PMID: 29503142.
79. Mashimo T, Pichumani K, Vemireddy V, Hatanpaa KJ, Singh DK, Sirasanagandla S, Nannepaga S, Piccirillo SG, Kovacs Z, Foong C, Huang Z, Barnett S, Mickey BE, DeBerardinis RJ, Tu BP, Maher EA, Bachoo RM. Acetate is a bioenergetic substrate for human glioblastoma and brain metastases. *Cell*. 2014;159(7):1603-1614. PMID: 25525878.
80. Bae JM, Kim JH, Oh HJ, Park HE, Lee TH, Cho NY, Kang GH. Downregulation of acetyl-CoA synthetase 2 is a metabolic hallmark of tumor progression and aggressiveness in colorectal carcinoma. *Mod Pathol*. 2017;30(2):267-277. PMID: 27713423.
81. Sun L, Kong Y, Cao M, Zhou H, Li H, Cui Y, Fang F, Zhang W, Li J, Zhu X, Li Q, Song T, Zhang T. Decreased expression of acetyl-CoA synthase 2 promotes metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci*. 2017;108(7):1338-1346. PMID: 28387999.
82. Yoshii Y, Furukawa T, Saga T, Fujibayashi Y. Acetate/acetyl-CoA metabolism associated with cancer fatty acid synthesis: overview and application. *Cancer Lett*. 2014;356(2 Pt A):211-216. PMID: 24569091.
83. He X, Luo M, Wang C, Kong L, Li J, Tan J, Chen J, Nie Y, Chen H, Zou Z, Su Z, Lin L. Acetyl-CoA synthase 1 mediates metabolic reprogramming to promote proliferation and metastasis of osteosarcoma. *J Orthop Translat*. 2026;57:101052. PMID: 41993096.
84. Fu X, Zhu Y, Lu X, Gao X, Xin L, Ren Y, Liu X, Ge L, Hao J, Yao Z, Shi L, Yang J. ACSS1 co-opts acetyl-CoA metabolism to drive DNA repair and undermine radiotherapy efficacy in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2026;17(1):119. PMID: 41413018.
85. Chen J, Guccini I, Di Mitri D, Brina D, Revandkar A, Sarti M, Pasquini E, Alajati A, Pinton S, Losa M, Civenni G, Catapano CV, Sgrignani J, Cavalli A, D'Antuono R, Asara JM, Morandi A, Chiarugi P, Crotti S, Agostini M, Montopoli M, Masgras I, Rasola A, Garcia-Escudero R, Delaleu N, Rinaldi A, Bertoni F, Bono J, Carracedo A, Alimonti A. Compartmentalized activities of the pyruvate dehydrogenase complex sustain lipogenesis in prostate cancer. *Nat Genet*. 2018;50(2):219-228. PMID: 29335542.
86. Wang X, Zhang J, Yuan J, Wen L, Ying T, Xu Z, Zhou Z, Chen S, Zhou Q, Sheng J, Luo C, Teng L, Wang W. Fatty acid oxidation drives acetyl-CoA-dependent H3K9ac reprogramming to promote adaptive resistance to BRAF inhibition in thyroid cancer. *Cell Death Dis*. 2026;17(1). doi:10.1038/s41419-026-08575-7. PMID: 41862440.
87. Yuan L, Jiang H, Jia Y, Liao Y, Shao C, Zhou Y, Li J, Liao Y, Huang H, Pan Y, Wen W, Zhao X, Chen L, Jing X, Pan C, Wang W, Yao S, Zhang C. Fatty Acid Oxidation Supports Lymph Node Metastasis of Cervical Cancer via Acetyl-CoA-Mediated Stemness. *Adv Sci (Weinh)*. 2024;11(21):e2308422. PMID: 38520724.
88. Torrano V, Valcarcel-Jimenez L, Cortazar AR, Liu X, Urosevic J, Castillo-Martin M, Fernández-Ruiz S, Morciano G, Caro-Maldonado A, Guiu M, Zúñiga-García P, Graupera M, Bellmunt A, Pandya P, Lorente M, Martín-Martín N, Sutherland JD, Sanchez-Mosquera P, Bozal-Basterra L, Zabala-Letona A, Arruabarrena-Aristorena A, Berenguer A, Embade N, Ugalde-Olano A, Lacasa-Viscasillas I, Loizaga-Iriarte A, Unda-Urzaiz M, Schultz N, Aransay AM, Sanz-Moreno V, Barrio R, Velasco G, Pinton P, Cordon-Cardo C, Locasale JW, Gomis RR, Carracedo A. The metabolic co-regulator PGC1 α suppresses prostate cancer metastasis. *Nat Cell Biol*. 2016;18(6):645-656. PMID: 27214280.
89. Röhrig F, Schulze A. The multifaceted roles of fatty acid synthesis in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2016;16(11):732-749. PMID: 27658529.
90. Rysman E, Brusselmans K, Scheys K, Timmermans L, Derua R, Munck S, Van Veldhoven PP, Waltregny D, Daniëls VW, Machiels J, Vanderhoydonc F, Smans K, Waelkens E, Verhoeven G, Swinnen JV. De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res*. 2010;70(20):8117-8126. PMID: 20876798.
91. Madison BB, Liu Q, Zhong X, Hahn CM, Lin N, Emmett MJ, Stanger BZ, Lee JS, Rustgi AK. LIN28B promotes growth and tumorigenesis of the intestinal epithelium via Let-7. *Genes Dev*. 2013;27(20):2233-2245. PMID: 24142874.
92. Zhang Y, Li C, Hu C, Wu Q, Cai Y, Xing S, Lu H, Wang L, Huang D, Sun L, Li T, He X, Zhong X, Wang J, Gao P, Smith ZJ, Jia W, Zhang H. Lin28 enhances de novo fatty acid synthesis to promote cancer progression via SREBP-1. *EMBO Rep*. 2019;20(10):e48115. PMID: 31379107.
93. Moon SH, Huang CH, Houlihan SL, Regunath K, Freed-Pastor WA, Morris JP, Tschaharganeh DF, Kastenhuber ER, Barsotti AM, Culp-Hill R, Xue W, Ho YJ, Baslan T, Li X, Mayle A, de Stanchina E, Zender L, Tong DR, D'Alessandro A, Lowe SW, Prives C. p53 Represses the Mevalonate Pathway to Mediate Tumor Suppression. *Cell*. 2018;176(3):564-580.e19. PMID: 30580964.
94. Freed-Pastor WA, Mizuno H, Zhao X, Langerød A, Moon SH, Rodriguez-Barrueco R, Barsotti A, Chicas A, Li W, Polotskaia A, Bissell MJ, Osborne TF, Tian B, Lowe SW, Silva JM, Børresen-Dale AL, Levine AJ, Bargonetti J, Prives C. Mutant p53 disrupts mammary tissue architecture via the mevalonate pathway. *Cell*. 2012;148(1-2):244-258. PMID: 22265415.
95. Carrer A, Trefely S, Zhao S, Campbell SL, Norgard RJ, Schultz KC, Sidoli S, Parris JLD, Affronti HC, Sivanand S, Egolf S, Sela Y, Trizzino M, Gardini A, Garcia BA, Snyder NW, Stanger BZ, Wellen KE. Acetyl-CoA

- Metabolism Supports Multistep Pancreatic Tumorigenesis. *Cancer Discov.* 2019;9(3):416-435. PMID: 30626590.
96. Chen G, Bao B, Cheng Y, Tian M, Song J, Zheng L, Tong Q. Acetyl-CoA metabolism as a therapeutic target for cancer. *Biomed Pharmacother.* 2023;168:115741. PMID: 37864899.
 97. Zhao S, Jang C, Liu J, Uehara K, Gilbert M, Izzo L, Zeng X, Trefely S, Fernandez S, Carrer A, Miller KD, Schug ZT, Snyder NW, Gade TP, Titchenell PM, Rabinowitz JD, Wellen KE. Dietary fructose feeds hepatic lipogenesis via microbiota-derived acetate. *Nature.* 2020;579(7800):586-591. PMID: 32214246.
 98. Comerford SA, Huang Z, Du X, Wang Y, Cai L, Witkiewicz AK, Walters H, Tantawy MN, Fu A, Manning HC, Horton JD, Hammer RE, McKnight SL, Tu BP. Acetate dependence of tumors. *Cell.* 2014;159(7):1591-1602. PMID: 25525877.
 99. Lauby-Secretan B, Scoccianti C, Loomis D, Grosse Y, Bianchini F, Straif K. Body Fatness and Cancer — Viewpoint of the IARC Working Group. *N Engl J Med.* 2016;375(8):794-798. PMID: 27557308.
 100. Teras LR, Kitahara CM, Birmann BM, Hartge PA, Wang SS, Robien K, Patel AV, Adami HO, Weiderpass E, Giles GG, Singh PN, Alavanja M, Beane Freeman LE, Bernstein L, Buring JE, Colditz GA, Fraser GE, Gapstur SM, Gaziano JM, Giovannucci E, Hofmann JN, Linet MS, Neta G, Park Y, Peters U, Rosenberg PS, Schairer C, Sesso HD, Stampfer MJ, Visvanathan K, White E, Wolk A, Zeleniuch-Jacquotte A, de González AB, Purdue MP. Body size and multiple myeloma mortality: a pooled analysis of 20 prospective studies. *Br J Haematol.* 2014;166(5):667-676. PMID: 24861847.
 101. Li Z, Liu H, He J, Wang Z, Yin Z, You G, Wang Z, Davis RE, Lin P, Bergsagel PL, Manasanch EE, Wong STC, Esnaola NF, Chang JC, Orlowski RZ, Yi Q, Yang J. Acetyl-CoA Synthetase 2: A Critical Linkage in Obesity-Induced Tumorigenesis in Myeloma. *Cell Metab.* 2021;33(1):78-93.e7. PMID: 33406405.
 102. Yiannikouris F, Gupte M, Putnam K, Thatcher S, Charnigo R, Rateri DL, Daugherty A, Cassis LA. Adipocyte deficiency of angiotensinogen prevents obesity-induced hypertension in male mice. *Hypertension.* 2012;60(6):1524-1530. PMID: 23108647.
 103. Cluntun AA, Huang H, Dai L, Liu X, Zhao Y, Locasale JW. The rate of glycolysis quantitatively mediates specific histone acetylation sites. *Cancer Metab.* 2015;3:10. PMID: 26401273.
 104. Gao X, Lin SH, Ren F, Li JT, Chen JJ, Yao CB, Yang HB, Jiang SX, Yan GQ, Wang D, Wang Y, Liu Y, Cai Z, Xu YY, Chen J, Yu W, Yang PY, Lei QY. Acetate functions as an epigenetic metabolite to promote lipid synthesis under hypoxia. *Nat Commun.* 2016;7:11960. PMID: 27357947.
 105. Sivanand S, Rhoades S, Jiang Q, Lee JV, Benci J, Zhang J, Yuan S, Viney I, Zhao S, Carrer A, Bennett MJ, Minn AJ, Weljie AM, Greenberg RA, Wellen KE. Nuclear Acetyl-CoA Production by ACLY Promotes Homologous Recombination. *Mol Cell.* 2017;67(2):252-265.e6. PMID: 28689661.
 106. Matsuda S, Adachi J, Ihara M, Tanuma N, Shima H, Kakizuka A, Ikura M, Ikura T, Matsuda T. Nuclear pyruvate kinase M2 complex serves as a transcriptional coactivator of arylhydrocarbon receptor. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(2):636-647. PMID: 26405201.
 107. Lee JV, Berry CT, Kim K, Sen P, Kim T, Carrer A, Trefely S, Zhao S, Fernandez S, Barney LE, Schwartz AD, Peyton SR, Snyder NW, Berger SL, Freedman BD, Wellen KE. Acetyl-CoA promotes glioblastoma cell adhesion and migration through Ca²⁺-NFAT signaling. *Genes Dev.* 2018;32(7-8):497-511. PMID: 29674394.
 108. Henry RA, Kuo YM, Andrews AJ. Differences in specificity and selectivity between CBP and p300 acetylation of histone H3 and H3/H4. *Biochemistry.* 2013;52(34):5746-5759. PMID: 23862699.
 109. Henry RA, Kuo YM, Bhattacharjee V, Yen TJ, Andrews AJ. Changing the selectivity of p300 by acetyl-CoA modulation of histone acetylation. *ACS Chem Biol.* 2015;10(1):146-156. PMID: 25325435.
 110. Zheng Y, Thomas PM, Kelleher NL. Measurement of acetylation turnover at distinct lysines in human histones identifies long-lived acetylation sites. *Nat Commun.* 2013;4:2203. PMID: 23892279.
 111. Zheng B, Gold S, Iwanaszko M, Howard BC, Wang L, Shilatfard A. Distinct layers of BRD4-PTEFb reveal bromodomain-independent function in transcriptional regulation. *Mol Cell.* 2023;83(16):2896-2910.e4. PMID: 37442129.
 112. Lovén J, Hoke HA, Lin CY, Lau A, Orlando DA, Vakoc CR, Bradner JE, Lee TI, Young RA. Selective inhibition of tumor oncogenes by disruption of super-enhancers. *Cell.* 2013;153(2):320-334. PMID: 23582323.
 113. French CA, Ramirez CL, Kolmakova J, Hickman TT, Cameron MJ, Thyne ME, Kutok JL, Toretsky JA, Tadavarthy AK, Kees UR, Fletcher JA, Aster JC. BRD-NUT oncoproteins: a family of closely related nuclear proteins that block epithelial differentiation and maintain the growth of carcinoma cells. *Oncogene.* 2008;27(15):2237-2242. PMID: 17934517.
 114. Sharma SV, Lee DY, Li B, Quinlan MP, Takahashi F, Maheswaran S, McDermott U, Azizian N, Zou L, Fischbach MA, Wong KK, Brandstetter K, Wittner B, Ramaswamy S, Classon M, Settleman J. A chromatin-mediated reversible drug-tolerant state in cancer cell subpopulations. *Cell.* 2010;141(1):69-80. PMID: 20371346.
 115. Seligson DB, Horvath S, Shi T, Yu H, Tze S, Grunstein M, Kurdستاني SK. Global histone modification patterns predict risk of prostate cancer recurrence. *Nature.* 2005;435(7046):1262-1266. PMID: 15988529.
 116. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, Collins HM, Soria D, Garibaldi JM, Paish CE, Ammar AA, Grainge MJ, Ball GR, Abdelghany MK, Martinez-Pomares L, Heery DM, Ellis IO. Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome. *Cancer Res.* 2009;69(9):3802-3809. PMID: 19366799.
 117. Lee HS, Jung W, Lee E, Chang H, Choi JH, Kim HG, Kim A, Kim BH. SIRT7, H3K18ac, and ELK4 Immunohistochemical Expression in Hepatocellular Carcinoma. *J Pathol Transl Med.* 2016;50(5):337-344. PMID: 27498548.

118. Wang H, Yi X, Wang X, Yang Y, Zhang H, Wang H, Chen J, Zhang B, Guo S, Wu L, Du J, Chen Y, Sun N, Gao T, Zhang R, Bian H, Jia L, Li C, Guo W. Nucleo-cytosolic acetyl-CoA drives tumor immune evasion by regulating PD-L1 in melanoma. *Cell Rep.* 2024;43(12):115015. PMID: 39602308.
119. Hansen BK, Gupta R, Baldus L, Lyon D, Narita T, Lammers M, Choudhary C, Weinert BT. Analysis of human acetylation stoichiometry defines mechanistic constraints on protein regulation. *Nat Commun.* 2019;10(1):1055. PMID: 30837475.
120. Weinert BT, Moustafa T, Iesmantavicius V, Zechner R, Choudhary C. Analysis of acetylation stoichiometry suggests that SIRT3 repairs nonenzymatic acetylation lesions. *EMBO J.* 2015;34(21):2620-2632. PMID: 26358839.
121. Aksnes H, Van Damme P, Goris M, Starheim KK, Marie M, Støve SI, Hoel C, Kalvik TV, Hole K, Glomnes N, Furnes C, Ljostveit S, Ziegler M, Niere M, Gevaert K, Arnesen T. An organellar α -acetyltransferase, naa60, acetylates cytosolic N termini of transmembrane proteins and maintains Golgi integrity. *Cell Rep.* 2015;10(8):1362-1374. PMID: 25732826.
122. Varland S, Aksnes H, Kryuchkov F, Impens F, Van Haver D, Jonckheere V, Ziegler M, Gevaert K, Van Damme P, Arnesen T. N-terminal Acetylation Levels Are Maintained During Acetyl-CoA Deficiency in. *Mol Cell Proteomics.* 2018;17(12):2309-2323. PMID: 30150368.
123. Yi CH, Pan H, Seebacher J, Jang IH, Hyberts SG, Heffron GJ, Vander Heiden MG, Yang R, Li F, Locasale JW, Sharfi H, Zhai B, Rodriguez-Mias R, Luithardt H, Cantley LC, Daley GQ, Asara JM, Gygi SP, Wagner G, Liu CF, Yuan J. Metabolic regulation of protein N-alpha-acetylation by Bcl-xL promotes cell survival. *Cell.* 2011;146(4):607-620. PMID: 21854985.
124. Inuzuka H, Gao D, Finley LW, Yang W, Wan L, Fukushima H, Chin YR, Zhai B, Shaik S, Lau AW, Wang Z, Gygi SP, Nakayama K, Teruya-Feldstein J, Tokar A, Haigis MC, Pandolfi PP, Wei W. Acetylation-dependent regulation of Skp2 function. *Cell.* 2012;150(1):179-193. PMID: 22770219.
125. Lv L, Li D, Zhao D, Lin R, Chu Y, Zhang H, Zha Z, Liu Y, Li Z, Xu Y, Wang G, Huang Y, Xiong Y, Guan KL, Lei QY. Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol Cell.* 2011;42(6):719-730. PMID: 21700219.
126. Hu H, Zhu W, Qin J, Chen M, Gong L, Li L, Liu X, Tao Y, Yin H, Zhou H, Zhou L, Ye D, Ye Q, Gao D. Acetylation of PGK1 promotes liver cancer cell proliferation and tumorigenesis. *Hepatology.* 2017;65(2):515-528. PMID: 27774669.
127. Latorre-Muro P, Baeza J, Hurtado-Guerrero R, Hicks T, Delso I, Hernández-Ruiz C, Velázquez-Campoy A, Lawton AJ, Angulo J, Denu JM, Carrodegua JA. Self-acetylation at the active site of phosphoenolpyruvate carboxykinase (PCK1) controls enzyme activity. *J Biol Chem.* 2021;296:100205. PMID: 33334880.
128. Schwer B, Bunkenborg J, Verdin RO, Andersen JS, Verdin E. Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103(27):10224-10229. PMID: 16788062.
129. Sykes SM, Mellert HS, Holbert MA, Li K, Marmorstein R, Lane WS, McMahon SB. Acetylation of the p53 DNA-binding domain regulates apoptosis induction. *Mol Cell.* 2006;24(6):841-851. PMID: 17189187.
130. Faiola F, Liu X, Lo S, Pan S, Zhang K, Lyman E, Farina A, Martinez E. Dual regulation of c-Myc by p300 via acetylation-dependent control of Myc protein turnover and coactivation of Myc-induced transcription. *Mol Cell Biol.* 2005;25(23):10220-10234. PMID: 16287840.
131. Okumura K, Mendoza M, Bachoo RM, DePinho RA, Cavenee WK, Furnari FB. PCAF modulates PTEN activity. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26562-26568. PMID: 16829519.
132. Meng Z, Jia LF, Gan YH. PTEN activation through K163 acetylation by inhibiting HDAC6 contributes to tumour inhibition. *Oncogene.* 2015;35(18):2333-2344. PMID: 26279303.
133. Hou J, Shi M, Hong J, Liu Y, Song X, Rao H, Ma Y, Huang C, Hu Z, He L, Guo Z, Pan F. PCAF-mediated acetylation regulates RAD51 dynamic localization on chromatin during HR repair. *EMBO Rep.* 2025;26(16):4100-4123. PMID: 40664718.
134. Minten EV, Kapoor-Vazirani P, Li C, Zhang H, Balakrishnan K, Yu DS. SIRT2 promotes BRCA1-BARD1 heterodimerization through deacetylation. *Cell Rep.* 2021;34(13):108921. PMID: 33789098.
135. Luo Y, Zeng Y, Liu Y, Liu S, Dai Y, Pan W, Zhang L, Zhu R, Feng D, Du K, Zhang X, Jia B, Tian F, Zhou L, Gu C. ACSL5 regulated acetyl-CoA to promote bladder cancer cellular senescence via 53BP1 acetylation. *Oncogene.* 2025;44(34):3096-3112. PMID: 40595416.
136. Gao Y, Nihira NT, Bu X, Chu C, Zhang J, Kolodziejczyk A, Fan Y, Chan NT, Ma L, Liu J, Wang D, Dai X, Liu H, Ono M, Nakanishi A, Inuzuka H, North BJ, Huang YH, Sharma S, Geng Y, Xu W, Liu XS, Li L, Miki Y, Sicinski P, Freeman GJ, Wei W. Acetylation-dependent regulation of PD-L1 nuclear translocation dictates the efficacy of anti-PD-1 immunotherapy. *Nat Cell Biol.* 2020;22(9):1064-1075. PMID: 32839551.
137. Xu FF, Sun HM, Fang RP, Zhang L, Shi H, Wang X, Fu XL, Li XM, Shi XH, Wu Y, Ye K, Zhang WY, Ye LH. The modulation of PD-L1 induced by the oncogenic HBXIP for breast cancer growth. *Acta Pharmacol Sin.* 2022;43(2):429-445. PMID: 33824459.
138. Park S, Mossmann D, Chen Q, Wang X, Dazert E, Colombi M, Schmidt A, Ryback B, Ng CKY, Terracciano LM, Heim MH, Hall MN. Transcription factors TEAD2 and E2A globally repress acetyl-CoA synthesis to promote tumorigenesis. *Mol Cell.* 2022;82(22):4246-4261.e11. PMID: 36400009.
139. Hubbert C, Guardiola A, Shao R, Kawaguchi Y, Ito A, Nixon A, Yoshida M, Wang XF, Yao TP. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature.* 2002;417(6887):455-458. PMID: 12024216.
140. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ, Hekking B, Imahiyerobo TA, Miller C, Frye R, Ploegh H, Kessler BM, Sinclair DA. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell.* 2004;13(5):627-638. PMID: 15023334.

141. Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem.* 2005;280(29):26729-26734. PMID: 15937340.
142. Wang B, Rong X, Palladino END, Wang J, Fogelman AM, Martín MG, Alrefai WA, Ford DA, Tontonoz P. Phospholipid Remodeling and Cholesterol Availability Regulate Intestinal Stemness and Tumorigenesis. *Cell Stem Cell.* 2018;22(2):206-220.e4. PMID: 29395055.
143. Wang YY, Attané C, Milhas D, Dirat B, Dauvillier S, Guerard A, Gilhodes J, Lazar I, Alet N, Laurent V, Le Gonidec S, Biard D, Hervé C, Bost F, Ren GS, Bono F, Escourrou G, Prentki M, Nieto L, Valet P, Muller C. Mammary adipocytes stimulate breast cancer invasion through metabolic remodeling of tumor cells. *JCI Insight.* 2017;2(4):e87489. PMID: 28239646.
144. Piskounova E, Agathocleous M, Murphy MM, Hu Z, Huddleston SE, Zhao Z, Leitch AM, Johnson TM, DeBerardinis RJ, Morrison SJ. Oxidative stress inhibits distant metastasis by human melanoma cells. *Nature.* 2015;527(7577):186-191. PMID: 26466563.
145. Protani M, Coory M, Martin JH. Effect of obesity on survival of women with breast cancer: systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;123(3):627-635. PMID: 20571870.
146. Rios Garcia M, Steinbauer B, Srivastava K, Singhal M, Mattijssen F, Maida A, Christian S, Hess-Stumpp H, Augustin HG, Müller-Decker K, Nawroth PP, Herzig S, Berriel Diaz M. Acetyl-CoA Carboxylase 1-Dependent Protein Acetylation Controls Breast Cancer Metastasis and Recurrence. *Cell Metab.* 2017;26(6):842-855.e5. PMID: 29056512.
147. Assante G, Chandrasekaran S, Ng S, Tournai A, Chung CH, Isse KA, Banks JL, Soffientini U, Filippi C, Dhawan A, Liu M, Rozen SG, Hoare M, Campbell P, Ballard JWO, Turner N, Morris MJ, Chokshi S, Youngson NA. Acetyl-CoA metabolism drives epigenome change and contributes to carcinogenesis risk in fatty liver disease. *Genome Med.* 2022;14(1):67. PMID: 35739588.
148. Brunner SF, Roberts ND, Wylie LA, Moore L, Aitken SJ, Davies SE, Sanders MA, Ellis P, Alder C, Hooks Y, Abascal F, Stratton MR, Martincorena I, Hoare M, Campbell PJ. Somatic mutations and clonal dynamics in healthy and cirrhotic human liver. *Nature.* 2019;574(7779):538-542. PMID: 31645727.
149. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, Weinrauch Y, Zychlinsky A. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science.* 2004;303(5663):1532-1535. PMID: 15001782.
150. Lu M, Zhu WW, Wang X, Tang JJ, Zhang KL, Yu GY, Shao WQ, Lin ZF, Wang SH, Lu L, Zhou J, Wang LX, Jia HL, Dong QZ, Chen JH, Lu JQ, Qin LX. ACOT12-Dependent Alteration of Acetyl-CoA Drives Hepatocellular Carcinoma Metastasis by Epigenetic Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition. *Cell Metab.* 2019;29(4):886-900.e5. PMID: 30661930.
151. Pan JJ, Xie SZ, Zheng X, Xu JF, Xu H, Yin RQ, Luo YL, Shen L, Chen ZR, Chen YR, Yu SZ, Lu L, Zhu WW, Lu M, Qin LX. Acetyl-CoA metabolic accumulation promotes hepatocellular carcinoma metastasis via enhancing CXCL1-dependent infiltration of tumor-associated neutrophils. *Cancer Lett.* 2024;592:216903. PMID: 38670307.
152. Yang L, Liu Q, Zhang X, Liu X, Zhou B, Chen J, Huang D, Li J, Li H, Chen F, Liu J, Xing Y, Chen X, Su S, Song E. DNA of neutrophil extracellular traps promotes cancer metastasis via CCDC25. *Nature.* 2020;583(7814):133-138. PMID: 32528174.
153. Roy J, Dibaeinia P, Fan TM, Sinha S, Das A. Global analysis of osteosarcoma lipidomes reveal altered lipid profiles in metastatic versus nonmetastatic cells. *J Lipid Res.* 2019;60(2):375-387. PMID: 30504231.
154. Sen U, Coleman C, Sen T. Stearoyl coenzyme A desaturase-1: multitasker in cancer, metabolism, and ferroptosis. *Trends Cancer.* 2023;9(6):480-489. PMID: 37029018.
155. Izzo LT, Trefely S, Demetriadou C, Drummond JM, Mizukami T, Kuprasertkul N, Farria AT, Nguyen PTT, Murali N, Reich L, Kantner DS, Shaffer J, Affronti H, Carrer A, Andrews A, Capell BC, Snyder NW, Wellen KE. Acetylcarnitine shuttling links mitochondrial metabolism to histone acetylation and lipogenesis. *Sci Adv.* 2023;9(18):eadf0115. PMID: 37134161.
156. Chang CH, Qiu J, O'Sullivan D, Buck MD, Noguchi T, Curtis JD, Chen Q, Gindin M, Gubin MM, van der Windt GJ, Tonc E, Schreiber RD, Pearce EJ, Pearce EL. Metabolic Competition in the Tumor Microenvironment Is a Driver of Cancer Progression. *Cell.* 2015;162(6):1229-1241. PMID: 26321679.
157. Ho PC, Bihuniak JD, Macintyre AN, Staron M, Liu X, Amezcua R, Tsui YC, Cui G, Micevic G, Perales JC, Kleinstein SH, Abel ED, Insogna KL, Feske S, Locasale JW, Bosenberg MW, Rathmell JC, Kaech SM. Phosphoenolpyruvate Is a Metabolic Checkpoint of Anti-tumor T Cell Responses. *Cell.* 2015;162(6):1217-1228. PMID: 26321681.
158. Brand A, Singer K, Koehl GE, Kolitzus M, Schoenhammer G, Thiel A, Matos C, Bruss C, Klobuch S, Peter K, Kastenberger M, Bogdan C, Schleicher U, Mackensen A, Ullrich E, Fichtner-Feigl S, Kesselring R, Mack M, Ritter U, Schmid M, Blank C, Dettmer K, Oefner PJ, Hoffmann P, Walenta S, Geissler EK, Pouyssegur J, Villunger A, Steven A, Seliger B, Schreml S, Haferkamp S, Kohl E, Karrer S, Berneburg M, Herr W, Mueller-Klieser W, Renner K, Kreutz M. LDHA-Associated Lactic Acid Production Blunts Tumor Immunosurveillance by T and NK Cells. *Cell Metab.* 2016;24(5):657-671. PMID: 27641098.
159. Deng S, Hu Q, Zhang H, Yang F, Peng C, Huang C. HDAC3 Inhibition Upregulates PD-L1 Expression in B-Cell Lymphomas and Augments the Efficacy of Anti-PD-L1 Therapy. *Mol Cancer Ther.* 2019;18(5):900-908. PMID: 30824609.
160. Wang H, Fu C, Du J, Wang H, He R, Yin X, Li H, Li X, Wang H, Li K, Zheng L, Liu Z, Qiu Y. Enhanced histone H3 acetylation of the PD-L1 promoter via the COP1/c-Jun/HDAC3 axis is required for PD-L1 expression in drug-resistant cancer cells. *J Exp Clin Cancer Res.* 2020;39(1):29. PMID: 32024543.

161. Romeo MA, Gilardini Montani MS, Santarelli R, Benedetti R, Arena A, Cirone M. Acetylation increases expression, interaction with TRAPPC4 and surface localization of PD-L1. *Discov Oncol.* 2023;14(1):152. PMID: 37603071.
162. Wartewig T, Daniels J, Schulz M, Hameister E, Joshi A, Park J, Morrish E, Venkatasubramani AV, Cernilogar FM, van Heijster FHA, Hundshammer C, Schneider H, Konstantinidis F, Gabler JV, Klement C, Kurniawan H, Law C, Lee Y, Choi S, Guitart J, Forne I, Giustinani J, Müschen M, Jain S, Weinstock DM, Rad R, Ortonne N, Schilling F, Schotta G, Imhof A, Brenner D, Choi J, Ruland J. PD-1 instructs a tumor-suppressive metabolic program that restricts glycolysis and restrains AP-1 activity in T cell lymphoma. *Nat Cancer.* 2023;4(10):1508-1525. PMID: 37723306.
163. Scharping NE, Menk AV, Moreci RS, Whetstone RD, Dadey RE, Watkins SC, Ferris RL, Delgoffe GM. The Tumor Microenvironment Represses T Cell Mitochondrial Biogenesis to Drive Intratumoral T Cell Metabolic Insufficiency and Dysfunction. *Immunity.* 2016;45(2):374-388. PMID: 27496732.
164. Scharping NE, Rivadeneira DB, Menk AV, Vignali PDA, Ford BR, Rittenhouse NL, Peralta R, Wang Y, Wang Y, DePeaux K, Poholek AC, Delgoffe GM. Mitochondrial stress induced by continuous stimulation under hypoxia rapidly drives T cell exhaustion. *Nat Immunol.* 2021;22(2):205-215. PMID: 33398183.
165. Zhang Y, Kurupati R, Liu L, Zhou XY, Zhang G, Hudaihed A, Filisio F, Giles-Davis W, Xu X, Karakousis GC, Schuchter LM, Xu W, Amaravadi R, Xiao M, Sadek N, Krepler C, Herlyn M, Freeman GJ, Rabinowitz JD, Ertl HCJ. Enhancing CD8T Cell Fatty Acid Catabolism within a Metabolically Challenging Tumor Microenvironment Increases the Efficacy of Melanoma Immunotherapy. *Cancer Cell.* 2017;32(3):377-391.e9. PMID: 28898698.
166. Hunt EG, Hurst KE, Riesenberger BP, Kennedy AS, Gandy EJ, Andrews AM, Del Mar Alicea Pauneto C, Ball LE, Wallace ED, Gao P, Meier J, Serody JJ, Coleman MF, Thaxton JE. Acetyl-CoA carboxylase obstructs CD8+ T cell lipid utilization in the tumor microenvironment. *Cell Metab.* 2024;36(5):969-983.e10. PMID: 38490211.
167. Ma X, Bi E, Lu Y, Su P, Huang C, Liu L, Wang Q, Yang M, Kalady MF, Qian J, Zhang A, Gupte AA, Hamilton DJ, Zheng C, Yi Q. Cholesterol Induces CD8T Cell Exhaustion in the Tumor Microenvironment. *Cell Metab.* 2019;30(1):143-156.e5. PMID: 31031094.
168. Lee J, Walsh MC, Hoehn KL, James DE, Wherry EJ, Choi Y. Regulator of fatty acid metabolism, acetyl coenzyme a carboxylase 1, controls T cell immunity. *J Immunol.* 2014;192(7):3190-3199. PMID: 24567531.
169. Qiu J, Villa M, Sanin DE, Buck MD, O'Sullivan D, Ching R, Matsushita M, Grzes KM, Winkler F, Chang CH, Curtis JD, Kyle RL, Van Teijlingen Bakker N, Corrado M, Haessler F, Alfei F, Edwards-Hicks J, Maggi LB, Zehn D, Egawa T, Bengsch B, Klein Geltink RI, Jenuwein T, Pearce EJ, Pearce EL. Acetate Promotes T Cell Effector Function during Glucose Restriction. *Cell Rep.* 2019;27(7):2063-2074.e5. PMID: 31091446.
170. Kaymak I, Watson MJ, Oswald BM, Ma S, Johnson BK, DeCamp LM, Mabvakure BM, Luda KM, Ma EH, Lau K, Fu Z, Muhire B, Kitchen-Goosen SM, Vander Ark A, Dahabieh MS, Samborska B, Vos M, Shen H, Fan ZP, Roddy TP, Kingsbury GA, Sousa CM, Krawczyk CM, Williams KS, Sheldon RD, Kaech SM, Roy DG, Jones RG. ACLY and ACSS2 link nutrient-dependent chromatin accessibility to CD8+ T cell effector responses. *J Exp Med.* 2024;221(9):e20231820. PMID: 39150482.
171. Ma S, Dahabieh MS, Mann TH, Zhao S, McDonald B, Song WS, Chung HK, Farsakoglu Y, Garcia-Rivera L, Hoffmann FA, Xu S, Du VY, Chen D, Fargiuele J, LaPorta MA, Jacobs E, DeCamp LM, Oswald BM, Sheldon RD, Ellis AE, Liu L, He P, Wang Y, Jang C, Jones RG, Kaech SM. Nutrient-driven histone code determines exhausted CD8+ T cell fates. *Science.* 2025;387(6734):eadj3020. PMID: 39666821.
172. Miller KD, O'Connor S, Pniewski KA, Kannan T, Acosta R, Mirji G, Papp S, Hulse M, Mukha D, Hlavaty SI, Salcido KN, Bertolazzi F, Srikanth YVV, Zhao S, Wellen KE, Shinde RS, Claiborne DT, Kossenkova A, Salvino JM, Schug ZT. Acetate acts as a metabolic immunomodulator by bolstering T-cell effector function and potentiating antitumor immunity in breast cancer. *Nat Cancer.* 2023;4(10):1491-1507. PMID: 37723305.
173. Christofides A, Strauss L, Yeo A, Cao C, Charest A, Boussiotis VA. The complex role of tumor-infiltrating macrophages. *Nat Immunol.* 2022;23(8):1148-1156. PMID: 35879449.
174. Shen L, Wang S, Gao C, Li Q, Feng S, Sun W, Liu X, Ba Y, Chu Y, Zhou Y, Pan J, Xu H, Zhang X, Zhu W, Qin L, Lu M. Tumour-associated macrophages serve as an acetate reservoir to drive hepatocellular carcinoma metastasis. *Nat Metab.* 2025;7(11):2268-2283. PMID: 41116081.
175. Shi L, Chen X, Zang A, Li T, Hu Y, Ma S, Lü M, Yin H, Wang H, Zhang X, Zhang B, Leng Q, Yang J, Xiao H. TSC1/mTOR-controlled metabolic-epigenetic cross talk underpins DC control of CD8+ T-cell homeostasis. *PLoS Biol.* 2019;17(8):e3000420. PMID: 31433805.
176. Svensson RU, Parker SJ, Eichner LJ, Kolar MJ, Wallace M, Brun SN, Lombardo PS, Van Nostrand JL, Hutchins A, Vera L, Gerken L, Greenwood J, Bhat S, Harriman G, Westlin WF, Harwood HJ, Saghatelian A, Kapeller R, Metallo CM, Shaw RJ. Inhibition of acetyl-CoA carboxylase suppresses fatty acid synthesis and tumor growth of non-small-cell lung cancer in preclinical models. *Nat Med.* 2016;22(10):1108-1119. PMID: 27643638.
177. Nicosia L, Spencer GJ, Brooks N, Amaral FMR, Basma NJ, Chadwick JA, Revell B, Wingelhofer B, Maiques-Diaz A, Sinclair O, Camera F, Ciceri F, Wiseman DH, Pegg N, West W, Knurowski T, Frese K, Clegg K, Campbell VL, Cavet J, Copland M, Searle E, Somervaille TCP. Therapeutic targeting of EP300/CBP by bromodomain inhibition in hematologic malignancies. *Cancer Cell.* 2023;41(12):2136-2153.e13. PMID: 37995682.
178. Escribano-Díaz C, Orthwein A, Fradet-Turcotte A, Xing M, Young JT, Tkáč J, Cook MA, Rosebrock AP, Munro M, Canny MD, Xu D, Durocher D. A cell cycle-dependent regulatory circuit composed of 53BP1-RIF1 and BRCA1-CtIP controls DNA repair pathway choice. *Mol Cell.* 2013;49(5):872-883. PMID: 23333306.

179. Hsiao KY, Mizzen CA. Histone H4 deacetylation facilitates 53BP1 DNA damage signaling and double-strand break repair. *J Mol Cell Biol.* 2013;5(3):157-165. PMID: 23329852.
180. Luo J, Hong Y, Lu Y, Qiu S, Chaganty BK, Zhang L, Wang X, Li Q, Fan Z. Acetyl-CoA carboxylase rewires cancer metabolism to allow cancer cells to survive inhibition of the Warburg effect by cetuximab. *Cancer Lett.* 2017;384:39-49. PMID: 27693630.
181. Hardie DG, Pan DA. Regulation of fatty acid synthesis and oxidation by the AMP-activated protein kinase. *Biochem Soc Trans.* 2002;30(Pt 6):1064-1070. PMID: 12440973.
182. García-Bautista A, Cenigaonandia-Campillo A, Rio-Vilariño A, Sanz-Criado L, Selva-Giménez M, Perez-Antolín R, Cebrián A, García-García L, Fernández-Aceñero MJ, Baños-Herraiz N, Mozas-Vivar L, Núñez-Delicado E, García-Foncillas J, Aguilera Ó. Metabolic regulation of histone acetylation by ACLY supports MDR1 expression in colorectal cancer and highlights a targetable vulnerability. *Neoplasia.* 2026;77:101314. PMID: 42066427.
183. Wen J, Shen M, Zhao H, Liu L, Hua Q, Zhao X, Liu J, Feng H, Huang G. Deacetylation of ACLY mediates RNA m6A-modification of NOXA and promotes chemoresistance of colorectal cancer. *Adv Sci (Weinh).* 2025;12(47):e03323. PMID: 41038802.