

**UNIVERSIDAD DE VALLADOLID**

**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR, Y FISIOLÓGIA**



**iBGM**  
INSTITUTO DE BIOLOGÍA  
Y GENÉTICA MOLECULAR



MASTER  
EN INVESTIGACIÓN  
BIOMÉDICA

# **REPROGRAMACIÓN METABÓLICA Y TRANSCRIPCIONAL EN CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE**

---

**Cristina Mancebo Tejera**

**Tutores:**

**Dr. Mariano Sánchez Crespo**

**Dra. M<sup>a</sup> Nieves Fernández García**

Valladolid, Septiembre 2017

---

## ÍNDICE

---

<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1. EL SISTEMA INMUNE .....	1
1.1. Las respuestas inmunes innata y adaptativa .....	1
1.2. Las células dendríticas .....	1
1.3. Reconocimiento de patógenos.....	2
2. INMUNOMETABOLISMO .....	3
2.1. Vías metabólicas .....	4
2.1.1. La vía glicolítica .....	4
2.1.2. El ciclo de los ácidos tricarbóxicos.....	4
2.2. Reprogramación metabólica en células dendríticas.....	4
3. CITOCINAS.....	4
4. EL PAPEL DEL METABOLISMO EN LA REPROGRAMACIÓN TRANSCRIPCIONAL .....	5
4.1. La acetilación de histonas.....	5
4.2. Producción de acetil-CoA.....	6
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b> .....	<b>8</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>9</b>
1. CULTIVOS CELULARES .....	9
1.1. Obtención de monocitos y diferenciación a células dendríticas: .....	9
2. TÉCNICAS PARA EL ANÁLISIS DE PROTEÍNAS .....	10
2.1. Obtención de extractos celulares .....	10
2.2. Inmunodetección ( <i>Western blot</i> ).....	10
3. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA.....	11
3.1. Extracción del RNA total .....	11
3.2. Síntesis del DNA complementario .....	11
3.3. Análisis mediante PCR a tiempo real .....	12
4. INMUNOPRECIPITACIÓN DE CROMATINA (CHIP) .....	13
4.1. Fragmentación de la cromatina.....	13
4.2. CHIP.....	13
4.3. Visualización de la cromatina .....	14
5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	14
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>15</b>
1. REPROGRAMACIÓN METABÓLICA Y PRODUCCIÓN DE CITOCINAS. ....	15
1.1. Acetil-CoA y producción de citocinas. ....	17
1.2. Vías alternativas de producción de acetil-CoA en células dendríticas.....	19
2. INFLUENCIA DE LA DISPONIBILIDAD DE ACETIL-COÁ SOBRE LA ACETILACIÓN DE HISTONAS.....	22
<b>DISCUSIÓN</b> .....	<b>24</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>26</b>
<b>REFERENCIAS</b> .....	<b>27</b>

## ABREVIATURAS

---

2-DG: 2-desoxiglucosa	IL-1 $\beta$ : interleuquina 1 $\beta$
AcCoA: acetil-Coenzima A	IL-10: interleuquina 10
ACLY: ATP citrato liasa	IL-12p70: interleuquina 12
ACPEs: enzimas productoras de Acetil-Coenzima A	IL-23: interleuquina 23
ACSS2: acetil-CoA sintetasa 2	IL-4: interleuquina 4
ACSS2i: N-(2,3-di-2-thienil-6-quinoxalilil)-NO-(2-metoxetil) urea	INF- $\gamma$ : interferón gamma
ADP: adenosín difosfato	LPS: lipopolisacárido bacteriano
APC: células presentadoras de antígeno	MHC: complejo mayor de histocompatibilidad
ATP: adenosín trifosfato	moDC: célula dendrítica derivada de monocito
BMS303141: inhibidor de la ATP citrato liasa	MR: receptor de manosa
CD: célula dendrítica	NAD <sup>+</sup> /NADH: nicotinamida adenina dinucleótido
cDC: célula dendrítica convencional	NADPH: nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
cDNA: DNA complementario	OXPHOS: fosforilación oxidativa
CLR: receptores lectina tipo C	PAMPs: patrones moleculares asociados a patógenos
CRAT: carnitina acetil transferasa	PD-L1: programmed death-ligand 1 checkpoint inhibitor
DAMPs: señales endógenas asociadas a daño tisular	pDC: célula dendrítica plasmocitoide
DC-SIGN: cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin receptor	PDC: complejo de la piruvato deshidrogenasa
DCA: inhibidor de la piruvato deshidrogenasa kinasa	PKM2: piruvato kinasa isoforma 2
DNA: ácido desoxirribonucleico	PRR: receptor de reconocimiento de patrones
FADH <sub>2</sub> : flavina adenina dinucleótido	RNA: ácido ribonucleico
GAPDH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa	SLC25A1: transportador de citrato al citosol
GM-CSF: factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos	TCA: ciclo de los ácidos tricarbóxicos
HAT: histona acetiltransferasa	TCR: receptor de linfocitos T
HDAC: histona desacetilasa	TLR: Toll-like receptors
HIF1 $\alpha$ : factor 1 inducible por hipoxia	TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral $\alpha$

# INTRODUCCIÓN

---

## 1. El Sistema Inmune

El sistema inmune está constituido por un conjunto de células y elementos humorales cuya función es la detección y eliminación de los microorganismos patógenos que afectan a la supervivencia de los organismos pluricelulares. Esta propiedad del sistema inmune se sintetizó por Burnet en los años 60 en el concepto de la capacidad para reconocer lo propio de lo extraño "*self non-self model*". Posteriormente, Janeway modificó esta idea añadiendo que la propiedad característica de las células inmunes era la distinción de "*Lo propio no infeccioso de lo infeccioso no propio*", lo que dio carta de naturaleza al reconocimiento de los patrones moleculares como elementos fundamentales en el reconocimiento de patógenos.

En el sistema inmune participan de forma coordinada elementos celulares y humorales para responder eficientemente a la infección. En los organismos superiores se pueden diferenciar la respuesta inmune innata y la adaptativa, teniendo en cuenta la especificidad de cada una de ellas.

La inmunidad innata y la adaptativa persiguen la detección y eliminación del patógeno. Para lo que siguen una estrategia común que consiste en identificar al patógeno, activar la célula o molécula adecuada y desplegar la función efectora asociada a esa célula o sistema de activación.

### 1.1. Las respuestas inmunes innata y adaptativa

Aunque la inmunidad es única, sus componentes se asocian en dos grandes grupos que funcionan de forma coordinada para mantener la homeostasis, la respuesta inmune innata, inespecífica e inmediata y la respuesta inmune adaptativa, específica y adquirida.

La inmunidad innata y la adquirida se diferencian, en primer lugar, en la fase de reconocimiento. Los sistemas de reconocimiento de la inmunidad innata identifican las moléculas comunes a los grandes grupos de patógenos<sup>1</sup>, mientras que en la inmunidad adquirida el reconocimiento se realiza a través de unos receptores sumamente específicos, capaces de diferenciar moléculas muy similares propias de agentes concretos, a las que denominamos antígenos.

Ambas respuestas se conectan especialmente por las células presentadoras de antígeno (APCs), particularmente las células dendríticas y los macrófagos que reconocen, procesan y presentan los antígenos a los linfocitos T<sup>2</sup>. La respuesta inmune adaptativa se inicia cuando las células T reconocen péptidos "no propios" unidos a moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) expresadas en la superficie de las APCs a través del receptor de células T (TCR). El reconocimiento mediante este estímulo no es suficiente para la activación de las células T y se requiere la formación de un complejo de unión con moléculas coestimuladoras como CD80 y CD86 en las APCs, así como la liberación de citocinas por las APCs que permite la diferenciación de los linfocitos T y la expansión clonal para dar lugar a una respuesta inmunitaria a gran escala<sup>3</sup>.

### 1.2. Las células dendríticas

Prácticamente todas las células del sistema inmunitario se originan a partir de células primordiales pluripotenciales de la médula ósea que siguen dos líneas fundamentales de diferenciación: el linaje mieloide y el linaje linfoide.

Un importante grupo de células del sistema inmunitario con actividad fagocítica está constituido por macrófagos o células dendríticas. Sus precursores, los monocitos de la médula ósea, viajan

por el torrente sanguíneo y pueden migrar a los diferentes tejidos, donde sufren los procesos de diferenciación, para convertirse en macrófagos y CD's maduras.

Todas las células nucleadas del organismo expresan moléculas MHC de clase I en su membrana y son, por lo tanto, susceptibles de presentar péptidos a los linfocitos T. Sin embargo, solo unos pocos tipos celulares con funciones inmunológicas son capaces de expresar moléculas MHC de clase II en su superficie. Éstas células privilegiadas serán, por lo tanto, las únicas capaces de presentar péptidos a los linfocitos Th, por lo que estas células son reconocidas con el nombre de células presentadoras de antígeno (APCs) "profesionales". Entre las más importantes se encuentran las células dendríticas (CDs), que poseen pseudópodos retráctiles de gran envergadura que les permiten fagocitar y atrapar patógenos. Existen cuatro subclases principales de DCs en humanos: células dendríticas derivadas de monocitos (moDCs), DCs convencionales (cDCs), células dendríticas plasmocitoides (pDCs) y células de Langerhans.

El proceso de diferenciación de monocitos a células dendríticas se controla por citocinas que actúan como factores de crecimiento y diferenciación. En presencia del factor estimulador de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e interleuquina-4 (IL-4), se generan las células dendríticas (moCDs) *in vitro*. Estas células poseen la capacidad de capturar y procesar antígenos y presentan en su superficie altos niveles de MHC, CD1, FcγRII, CD40, complejo B7 (CD80/CD86), CD44, ICAM-1 y CD11c; y a diferencia de los monocitos, escasa expresión de CD14<sup>4</sup>.

### 1.3. Reconocimiento de patógenos

Para llevar a cabo la presentación de antígenos en la sinapsis inmune, las células del sistema inmune innato están dotadas de unos receptores de reconocimiento de patrones (PRRs), que reconocen patrones altamente conservados asociados a patógenos (PAMPs) y señales endógenas ocasionadas durante el daño tisular (DAMPs), que realmente son los activadores microbianos de la respuesta inmune innata<sup>5</sup>. Este paso es esencial para la activación de los mecanismos innatos internos.

Entre la gran variedad de PRRs expresados en mamíferos, los mejor caracterizados son los receptores de membrana tipo *Toll-like receptors* (TLRs). Cada TLR confiere la capacidad de reconocer un número discreto de ligandos, entre los que se encuentran componentes de la pared bacteriana, proteínas virales o ácidos nucleicos. Otro tipo de receptores PRRs lo forman la familia de los receptores de lectina tipo-C (CLRs) que son capaces de reconocer y unirse a moléculas con estructuras de glucanos y mananos presentes en patógenos fúngicos<sup>6</sup>.

Los TLRs se expresan de forma predominante en las células presentadoras de antígeno (APCs). En humanos se expresan los TLRs del 1 al 10. Los CLRs forman una gran familia receptores como el receptor de manosa (MR), dectin-1, dectin-2, *dendritic cell-specific ICAM-3-grabbing non-integrin receptor* (DC-SIGN) y las colectinas que están implicados en la defensa frente a la infección fúngica al intervenir en el reconocimiento, captación y eliminación del patógeno. Asimismo, contribuyen al inicio de la respuesta inmune adaptativa<sup>7</sup>.

Los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) son estructuras y moléculas (lípidos, hidratos de carbono, proteínas, ácidos nucleicos) que comparten ciertos grupos de microorganismos (un ejemplo es el lipopolisacárido de las bacterias Gram negativas), no se encuentran en los mamíferos, por lo que representan una diana ideal para el reconocimiento de lo "infeccioso no propio". Son estructuras altamente conservadas a lo largo de la evolución porque intervienen en mecanismos indispensables para la supervivencia del microbio.

El lipopolisacárido bacteriano (LPS) está presente en la membrana exterior de la mayoría de las bacterias Gram negativas. Estructuralmente está formado por tres porciones, de las que dos son hidrofílicas: una porción central compuesta por motivos repetidos de polisacáridos y la porción denominada antígeno O y un dominio hidrofóbico compuesto por seis cadenas de ácidos grasos, al que se denomina lípido A y que es el componente biológicamente activo del LPS. El LPS es reconocido por el receptor TLR4 y da lugar a la producción de mediadores inflamatorios<sup>8</sup>. El zimosan es una preparación insoluble y particulada de la pared celular de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Se utiliza desde hace más de 50 años como modelo de estímulo fagocítico e inflamatorio. Se compone principalmente de  $\beta(1-3)$  y  $\beta(1-6)$  glucanos y  $\alpha$ -mananos además de quitinas, proteínas y lípidos. Es reconocido principalmente por TLR2 y dectin-1<sup>9</sup>.

Cuando estos receptores reaccionan con su ligando en el agente patógeno, se inicia una cascada de señales intracelulares que culminan con el internamiento del patógeno, la secreción de citocinas y mediadores lipídicos y la expresión de los genes implicados en la respuesta inmune.

## 2. Inmunometabolismo

La activación, el crecimiento y la proliferación, sus funciones efectoras y el retorno a la normalidad de las células inmunes están íntimamente relacionados con cambios en el metabolismo celular. A partir de observaciones realizadas hace más de 40 años a las que se ha prestado más atención en la actualidad, se ha reconocido que cuando las células del sistema inmune innato se activan por PAMPs, DAMPs o citocinas, se produce una remodelación metabólica significativa.

En este sentido, las células inmunes poseen la capacidad de percibir y adaptarse a diferentes condiciones ambientales y a la disponibilidad de nutrientes. La activación, el crecimiento y la proliferación celular, sus funciones efectoras y el retorno al estado basal dependen de cambios dinámicos en el metabolismo celular. Este hecho ha dado lugar al término, inmunometabolismo, que se refiere a los cambios en el metabolismo celular de las células inmunes que determina su comportamiento funcional<sup>10</sup> y que, en último término, hace referencia a la importancia del metabolismo energético en la respuesta inmune.

De acuerdo con estos conceptos, tras la activación de las células del sistema inmune se produce una reprogramación metabólica necesaria para hacer frente a las necesidades energéticas, que implica la producción de ATP y de intermediarios biosintéticos necesarios para permitir la proliferación y ejercer sus funciones efectoras. Esta reprogramación metabólica depende del tipo celular y de su función efectora. Mientras que las células T vírgenes utilizan principalmente la fosforilación oxidativa (OXPHOS) para producir ATP durante su activación, las células dendríticas aumentan la glicólisis y reducen paralelamente la OXPHOS, incluso en presencia de oxígeno<sup>11</sup>. Este fenómeno es similar al denominado efecto *Warburg* de las células tumorales que conduce a la acumulación de lactato en el medio tumoral.

Aunque este hecho tenga consecuencias negativas para la producción de ATP, el cambio metabólico permite la activación de la vía de las pentosas fosfato, la generación de equivalentes reductores en forma de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), la síntesis de ácidos grasos y la producción de ligandos lipídicos de los receptores hormonales nucleares. En ciertas circunstancias, las células del sistema inmune precisan utilizar otras fuentes anapleróticas para la producción de acetil-CoA, que es necesario para la acetilación de histonas y proteínas reguladoras. Esto tiene gran importancia para la regulación transcripcional y la expresión génica, lo que permite la adquisición de nuevas funciones como la migración, la producción diferencial de citocinas y/o el crecimiento y la división celular. Estos hechos explican el creciente interés por comprender como el metabolismo celular regula las funciones efectoras de las células inmunes y como éstas utilizan distintas rutas metabólicas para ejercer sus funciones efectoras.

## 2.1. Vías metabólicas

La necesidad de producir ATP para proporcionar energía para la función celular es por supuesto esencial tanto en las células en reposo como activadas. La glucosa se utiliza para alimentar este proceso a través de dos vías interconectadas.

### 2.1.1. La vía glicolítica

La glicólisis comienza con la captación de glucosa y su procesamiento en el citosol hasta la formación de piruvato y lactato<sup>10</sup>. La vía glicolítica es una vía relativamente ineficaz puesto que rinde dos moléculas de ATP por cada glucosa incorporada. Sin embargo, proporciona beneficios clave para las células ya que reduce  $\text{NAD}^+$  a  $\text{NADH}$ , además de permitir el desvío de numerosos intermediarios metabólicos que se usan en rutas anabólicas, tales como la síntesis de ácidos grasos, aminoácidos y de nucleótidos. Por estos motivos, se considera la glicólisis como una ruta esencial para las células en fase de crecimiento y proliferación<sup>10</sup>.

### 2.1.2. El ciclo de los ácidos tricarboxílicos

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) genera intermediarios reductores como  $\text{NADH}$  y  $\text{FADH}_2$  que donan electrones a la cadena de transporte de electrones para alimentar la fosforilación oxidativa (OXPHOS), proceso por el que se genera ATP en la mitocondria. Ambas vías se conectan cuando el piruvato producido por la glicólisis entra en la mitocondria para convertirse en acetil-CoA y alimentar el TCA. Esta vía es más eficiente, ya que rinde 32-36 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa y es usada por las células quiescentes. Las células tienen la posibilidad de metabolizar otros sustratos como glutamina o ácidos grasos. El TCA es por tanto un amplio aceptor de nutrientes<sup>10</sup>.

Las células inmunes tienen gran plasticidad para orientar su metabolismo en la forma más eficiente dependiendo en gran medida de la disponibilidad de glucosa, glutamina y ácidos grasos, y de la presencia de oxígeno necesaria para la OXPHOS<sup>12</sup>.

## 2.2. Reprogramación metabólica en células dendríticas

Estudios recientes han mostrado la importancia de la glicólisis para la función de las células inmunes. Esta vía aumenta en las CD<sub>s</sub> activadas<sup>11,13</sup>, que tienden a prescindir del uso del TCA, hecho en cierta manera sorprendente dada su elevada eficiencia para la generación de ATP. Sin embargo, el rápido aumento de la captación de glucosa y la alta tasa glicolítica proporciona intermediarios metabólicos para la síntesis de constituyentes fundamentales.

Un hecho importante para el aumento de la glicólisis es la regulación de la piruvato quinasa isoenzima M2 (PKM2), que genera piruvato y ATP a partir de fosfoenolpiruvato y ADP durante la glicólisis<sup>14</sup>.

## 3. Citocinas

Las citocinas son un conjunto de proteínas de bajo peso molecular, a menudo glicosiladas y generalmente monoméricas, que sintetizan las células del sistema inmune en respuesta a los patógenos, a sus productos o a otras señales relacionadas. Para ejercer su función necesitan unirse a receptores de membrana en las células diana, que suelen ser glucoproteínas compuestas por varias subunidades, cuya función es transmitir las señales de activación al interior celular, para iniciar cambios en la expresión génica y funciones complementarias que determinan la naturaleza de la respuesta inmune<sup>15</sup>. Entre las citocinas estudiadas en este trabajo se encuentran:

♦ **Interleuquina-12 p70 (IL-12 p70)**. Es una proteína heterodimérica compuesta por dos subunidades unidas por puentes disulfuro, p35 y p40, codificadas por genes independientes

(*IL12A* para IL12p35 e *IL12B* para IL12p40)<sup>16</sup>. Se produce principalmente por macrófagos, células dendríticas y neutrófilos y su liberación favorece la producción de interferón gamma (INF- $\gamma$ ) por las células T y *natural killers* (NK) y la polarización a células Th1.

♦**Interleuquina-23 (IL-23)**. Pertenece a la familia de la IL12, y se secreta en forma de heterodímero. Está formada por dos subunidades, p40 que es común a la IL-12p70 y p19 (codificada por el gen *IL23A*). Se produce por las mismas células que la IL-12p70, y su función es el mantenimiento de la polarización de las células Th17.

Ambas citocinas se producen en respuesta a numerosos estímulos, sin embargo, el hecho de que cada una posea una subunidad específica hace que la regulación transcripcional de esas cadenas sea el principal mecanismo de regulación del balance IL-12 p70/IL-23 y, en consecuencia determine la polarización de la respuesta inmune en los tipos Th1 y Th17.

#### 4. El papel del metabolismo en la reprogramación transcripcional

##### 4.1. La acetilación de histonas

La activación de las células del sistema inmune innato induce una remodelación del metabolismo que incluye el aumento de la glicólisis y la disminución paralela de la OXPHOS. Sin embargo, dado el papel del acetil-CoA como sustrato de las reacciones implicadas en la activación de la transcripción, es necesario buscar una explicación que compatibilice la caída de la actividad del TCA con la formación de acetil-CoA para las reacciones de acetilación.

El DNA en las células eucariotas está compactado en una estructura denominada cromatina y fuertemente asociado a las histonas. Las histonas forman el núcleo de los nucleosomas, unidad fundamental de organización de la cromatina, que están compuestos por DNA envuelto alrededor de un octámero de histonas (2 copias de: H2a, H2b, H3 y H4)<sup>17</sup> (Figura 1). La accesibilidad del DNA y la estructura de dicha cromatina se regula, principalmente, por modificaciones dinámicas de las histonas. Dichas modificaciones incluyen numerosos grupos reactivos que permiten metilaciones, acetilaciones, fosforilaciones y sumoilaciones<sup>19</sup>.

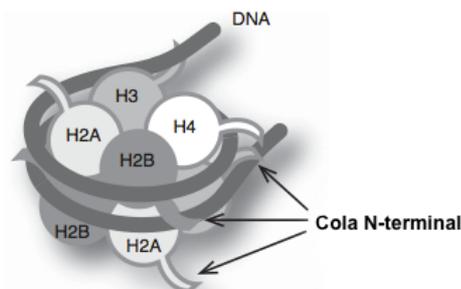


FIGURA 1. Organización fundamental de la cromatina en nucleosomas, formados por un octámero de histonas envueltas por DNA. Imagen tomada de Hiroshi Kimura (2013)<sup>20</sup>.

La acetilación es una modificación post-trasduccional producida cuando un grupo acetilo se une al grupo  $\epsilon$ -amino de residuos de lisina y es una modificación reversible, lo que la hace muy adecuada para la regulación de proteínas en respuesta a cambios metabólicos<sup>18</sup>. La incorporación de un grupo acetilo al extremo amino terminal de las histonas implica la reducción de la carga eléctrica positiva de tal manera que se debilita la unión histona-DNA por la relajación de la estructura de la cromatina y ello facilita la interacción con factores de transcripción y, en general

con proteínas implicadas en la transcripción<sup>18,20</sup>. De forma opuesta, la desacetilación de histonas compacta la cromatina y disminuye su accesibilidad<sup>19</sup>.

El proceso dinámico de la acetilación de histonas se cataliza por las actividades opuestas de histonas acetiltransferasas (HAT) e histonas desacetilasas (HDAC). Las histonas acetiltransferasas transfieren el grupo acetilo del acetil-CoA al grupo  $\epsilon$ -amino de las lisinas y relajan la estructura de la cromatina<sup>21</sup>.

Tradicionalmente, se pensaba que la acetilación de las histonas se determinaba por el simple equilibrio entre HAT y HDAC. Sin embargo, dada la dependencia de estas reacciones de sus sustratos, las interpretaciones más recientes relacionan también la acetilación de histonas y la transcripción de genes con la disponibilidad de nutrientes y los niveles de acetil-CoA<sup>22</sup>.

#### 4.2. Producción de acetil-CoA

Existen varias actividades enzimáticas que pueden generar acetil-CoA. El acetil-CoA producido en las mitocondrias no es permeable a las membranas mitocondriales y su estado de alta energía e inestabilidad hacen necesaria su producción en las localizaciones donde se utiliza<sup>22</sup>. Entre las enzimas generadoras de acetil-CoA se incluyen ATP-citrato liasa (ACLY), complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC), acetil-CoA sintetasa 2 (ACSS2) y carnitina acetiltransferasa (CRAT). Todas estas enzimas se han detectado en el núcleo, lo que permite la producción local de acetil-CoA cuando se requiere<sup>22,23,24,25</sup>, evitando de esa manera los trastornos funcionales que podrían derivarse de la ausencia de un metabolito inestable para conectar la regulación epigenética con el metabolismo energético.

##### ♦ATP citrato liasa (ACLY)

Es la enzima encargada de convertir el citrato en acetil-CoA. El citrato se exporta de la mitocondria al citoplasma mediante el transportador SLC25A1 para su transformación en acetil-CoA y oxalacetato en presencia de ATP<sup>23</sup>. El acetil-CoA producido en el citosol puede usarse para la síntesis de ácidos grasos o para la acetilación de histonas. La ACLY puede inhibirse con BMS303141, lo que produce la acumulación de citrato en el citosol y la disminución de los niveles de acetil-CoA y de la acetilación de histonas<sup>24</sup>.

##### ♦Complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC)

El piruvato producido en el citosol por la piruvato quinasa (PK) entra en la mitocondria donde se descarboxila a acetil-CoA por el complejo de la piruvato deshidrogenasa (PDC) y alimenta el ciclo de Krebs. Se trata de una reacción irreversible que se realiza por un complejo compuesto por 3 enzimas catalíticas, la E1 o piruvato deshidrogenasa, implicada en la descarboxilación, la E2 o dihidrolipoamida acetiltransferasa y la E3 o dihidrolipoamida deshidrogenasa. Además se precisa una proteína de anclaje (E3BP)<sup>25</sup>.

Los datos más recientes han mostrado que la PK citoplasmática, específicamente la isoforma PKM2 y la PDC mitocondrial se pueden traslocar al núcleo para producir acetil-CoA a partir de piruvato y permitir la acetilación de histonas y la expresión génica<sup>22,25</sup>. Estos hallazgos han adquirido gran relevancia funcional tras desvelarse nuevas funciones nucleares de la PKM2, que además de su actividad canónica de producir piruvato para su posterior uso por la PDC y generar acetil-CoA, desarrolla una función no canónica como quinasa implicada en la fosforilación de histonas<sup>26</sup>.

### ♦Acetil-CoA sintetasa 2 (ACSS2)

La enzima citoplasmática y nuclear ACSS2 produce acetil-CoA a partir de acetato y CoA libre en presencia de ATP<sup>19</sup>. Aunque es posible producir acetil-CoA a partir de acetato, en el momento actual predomina el criterio de que el acetil-CoA implicado en la acetilación de histonas se produce principalmente a partir del citrato por la ACLY. Sin embargo, estudios muy recientes han modificado parcialmente esta idea al mostrarse que en condiciones de hipoxia y limitación de suero, la ACSS2 nuclear mantiene la acetilación de histonas gracias a la captación del acetato liberado por las HDACs, su conversión en acetil-CoA y su utilización por las HATs. De esta manera se mantendría la acetilación de histonas en condiciones críticas<sup>27</sup>.

La Figura 2 resume las fuentes de acetil-CoA en los diferentes compartimentos subcelulares.

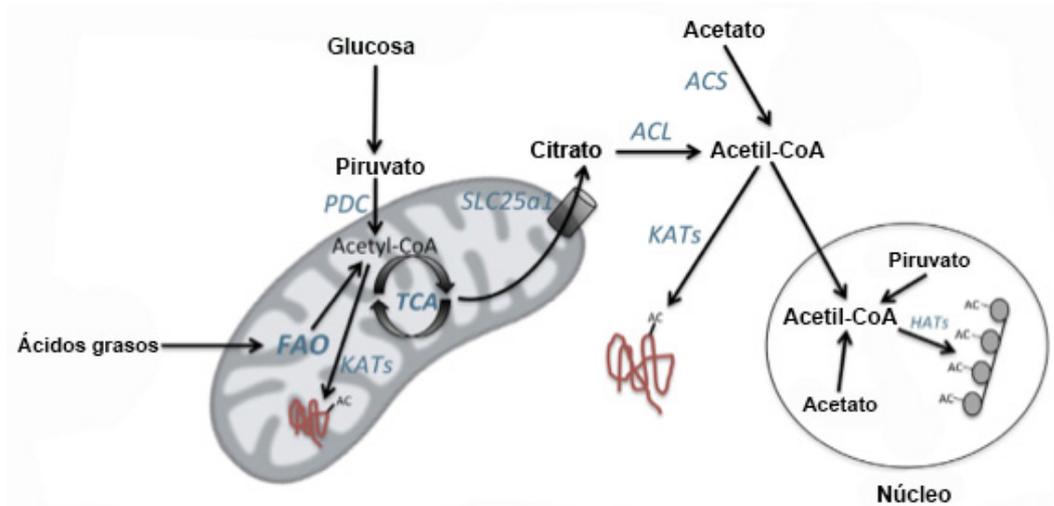


FIGURA 2. Fuentes de acetil-CoA en los diferentes compartimentos subcelulares. En la mitocondria se puede obtener a partir de la oxidación de piruvato por el complejo PDH o por la oxidación de los ácidos grasos. En el citosol se obtiene por la salida de citrato de la mitocondria y la acción de la ACLY o a partir de acetato por la ACSS2. En el núcleo se obtiene a partir de piruvato por el complejo PDH o bien por la ACSS2 a partir de acetato. Imagen modificada de Alanna M. Cameron (2016)<sup>19</sup>.

Estos datos han permitido desvelar el nexo entre el metabolismo y la regulación epigenética y han conducido a poder aplicar el término *moonlighting proteins* a las actividades enzimáticas inicialmente consideradas citosólicas o mitocondriales, pero que también se encuentran en el núcleo ejerciendo las funciones canónicas, producción de metabolitos, y no canónicas, como la actividad proteína quinasa<sup>22</sup>.

## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

---

La activación de las células dendríticas induce una reprogramación metabólica para generar suficiente acetil-CoA para la acetilación de histonas y facilitar la expresión génica. Los cambios de la expresión génica pueden afectar a la producción de citocinas y de esa forma incidir de forma notable en la polarización de la respuesta inmune. Los objetivos de este estudio se han desglosado en la forma siguiente:

1. Determinar el patrón de expresión de citocinas en células dendríticas estimuladas con zimosan y LPS en presencia y ausencia de moduladores farmacológicos activos sobre las distintas enzimas productoras de acetil-CoA.
2. Correlacionar la acetilación de histonas en respuesta a PAMPs con la disponibilidad de acetil-CoA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

---

### 1. Cultivos Celulares

#### 1.1. Obtención de monocitos y diferenciación a células dendríticas:

Las células sanguíneas se obtuvieron a partir de *buffy coats*, término que se refiere a la capa leuco-plaquetaria que aparece entre el plasma y los glóbulos rojos tras la centrifugación de la sangre total. Los *buffy coats* son proporcionados por el Centro Regional de Hemoterapia y Hemodonación de Castilla y León, y provienen de voluntarios sanos.

El concentrado sanguíneo se diluyó 1:1 con PBS (136 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) y se añadió suavemente sobre Ficoll-Paque en proporción 1:3 (sangre-PBS:Ficoll-Paque). Las muestras se centrifugaron a 1900 rpm, 30 minutos, a 20°C sin freno, importante para conseguir la correcta separación de las diferentes fases del *buffy coat*. En la parte superior se encuentra la fase acuosa (PBS y plasma), seguida de un anillo de células mononucleares, otra de Ficoll-Paque y en el fondo del tubo se encuentran las células polimorfonucleares y los eritrocitos (Figura 3). Las células mononucleares se recogieron por aspiración con pipeta Pasteur y se añadieron a un tubo que contiene PBS 1x para su lavado por centrifugación a 1500 rpm, durante 10 minutos, con freno. La fracción celular se resuspendió en 3 ml de OptiPrep, sobre el que se añadieron 7 ml de Ficoll-Paque de densidad 1.072 g/ml, para crear un gradiente discontinuo al añadir una solución de OptiPrep de densidad 1.068 g/ml, suplementada con 0,5% BSA y 1 mM EDTA y una solución tamponada con HEPES. La mezcla se centrifugó a 1900 rpm, durante 25 minutos a 20°C.

Este tratamiento permite una separación en varias fases en función de la densidad: la fase superior se compone de un anillo de monocitos sobre la solución de OptiPrep de densidad 1.068 g/ml, seguido de otro anillo de linfocitos, y al final del tubo el Ficoll-Paque. Se recoge el anillo de monocitos con pipeta Pasteur y se lava con PBS, por centrifugación a 1500 rpm durante 5 minutos a 20°C. El proceso de separación usando soluciones de OptiPrep y Ficoll-Paque de distintas densidades se repite para conseguir la eliminación completa de linfocitos.

Tras esta última purificación, se hace el recuento de monocitos extraídos utilizando una cámara de Malassez y un microscopio óptico. Los monocitos se resuspenden en medio RPMI (suplementado con 10% FBS, 1% L-glutamina, 1% penicilina/estreptomicina), se distribuyen en placas de cultivo y se cultivan a 37°C. Pasadas dos horas, los monocitos se han adherido a las placas y se retira por aspiración el medio con los linfocitos que pudieran estar en suspensión. Posteriormente, se promueve la diferenciación a células dendríticas inmaduras añadiendo medio RPMI (10% FBS, 1% L-Glutamina, 1% penicilina/estreptomicina) suplementado con citocinas; 500 U/ml de IL-4 y 800 U/ml de factor estimulador de colonias de granulocitos y monocitos (GM-CSF) y se mantiene la incubación durante 5 días a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>.

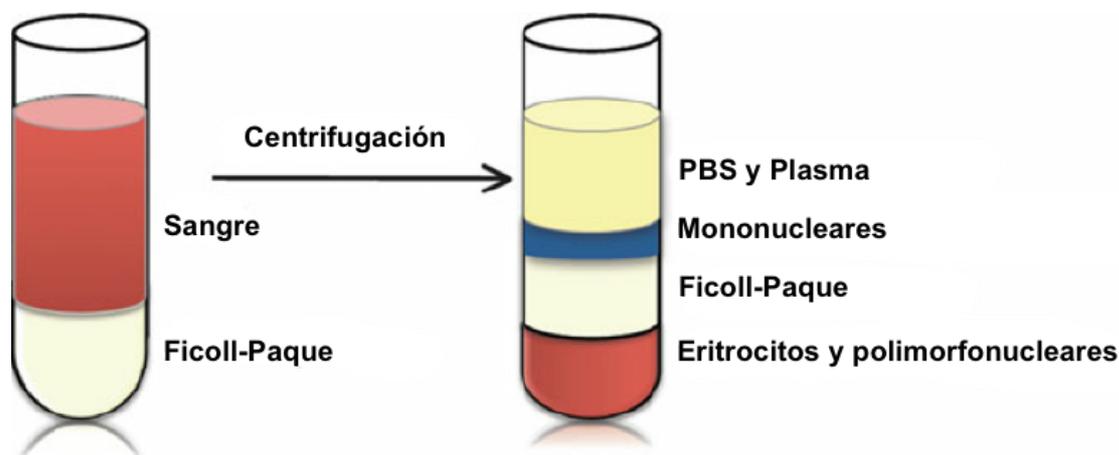


FIGURA 3. Proceso de obtención de monocitos y diferenciación a CD

## 2. Técnicas para el análisis de proteínas

### 2.1. Obtención de extractos celulares

Para la obtención de extractos nucleares a partir de cultivos celulares se emplea el *Nuclear Extract Kit* de Active Motif. Las células se lavaron dos veces con PBS frío y se recogieron en un tampón de lisis con inhibidores de proteasas y fosfatasas para evitar las modificaciones proteicas. A continuación, las células se resuspendieron en un tampón hipotónico para hincharlas y debilitar las membranas plasmáticas, tras lo cual se añadió detergente. Para separar las proteínas citoplasmáticas de la fracción nuclear, se centrifugó la suspensión para conseguir la precipitación de los núcleos celulares. Estos se resuspendieron con un tampón de lisis que se mantuvo durante 30 minutos. Tras centrifugación se obtuvieron las proteínas nucleares disueltas en el sobrenadante. La proteína total de los extractos celulares se cuantificó con el método descrito por Bradford<sup>28</sup> basado en el desplazamiento del máximo de absorbancia de una solución ácida del colorante azul *Coomassie blue* G-250 desde 465 a 595 nm que tiene lugar cuando el reactivo se une a una proteína. La absorbancia aumenta linealmente para concentraciones de proteína entre 1 y 25 µg/ml. La recta de calibrado se realizó con diluciones de albúmina de suero bovino (BSA).

### 2.2. Inmunodetección (*Western Blot*)

Para la separación de las proteínas, las muestras se sometieron a electroforesis en condiciones de desnaturalización y reducción según el protocolo de Laemmli<sup>29</sup>, de tal forma que se separan en función de su tamaño por migración hacia el polo positivo. Se usaron geles de acrilamida al 15% en tampón de electroforesis (25 mM Tris, 0,2 M glicina, 1 g/l SDS). Junto con las muestras, se desarrollaron estándares preteñidos de tamaños moleculares conocidos para poder localizar la proteína problema por su relación con un tamaño molecular conocido del estándar. La electroforesis se desarrolló en 110 minutos a 25 mA en tampón de electroforesis. A continuación, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa. La transferencia se llevó a cabo en condiciones de humedad y frío en una cubeta de electroforesis de *Bio-Rad* usando un tampón de transferencia (25 mM Tris, 0,2 M glicina, 20% metanol (v/v), 1 g/l SDS) a 100 V y 400 mA durante 90 minutos. La membrana de nitrocelulosa se lavó con TTBS y se bloqueó por incubación en una solución rica en proteínas compuesta por TTBS (0,05 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,05% Tween-20, pH 7,6) y 5% de BSA. La incubación se realizó en agitación suave a temperatura ambiente durante una hora.

Para la inmunodetección de las proteínas, las membranas se incubaron en agitación lenta con el anticuerpo primario diluido en la solución de bloqueo durante toda la noche en cámara fría a 4°C.

Tras lo cual, se procedió a lavar la membrana con TTBS con el fin de eliminar completamente el anticuerpo primario no adherido específicamente a la membrana. Posteriormente, se incubó la membrana con el anticuerpo secundario diluido en la solución de bloqueo durante una hora en agitación lenta a temperatura ambiente. Tras esta incubación, se procedió a lavar la membrana de nuevo con TTBS para eliminar el anticuerpo secundario no adherido específicamente a la membrana. Las membranas se incubaron con el reactivo comercial ECL, en agitación durante 1 minuto, lo que permite la detección de anticuerpos conjugados específicamente con peroxidasa, y se expusieron a películas autorradiográficas que se revelaron con un equipo Curix-60 de AGFA. La relación de anticuerpos utilizados para *Western Blot* se resumen en la tabla 1.

TABLA 1: Anticuerpos usados para *Western Blot*, casas comerciales y peso molecular de cada uno de ellos

Anticuerpo	Peso molecular (kD)	Referencia
Anti-Histona H3	15	Abcam ab1791
Anti-P-S10-Histona H3	~ 15	Millipore cat # 04-817
Anti-Acetil-K9 Histona H3	~ 15	Millipore cat # 04-817

### 3. Análisis de la expresión génica

#### 3.1. Extracción del RNA total

La extracción de RNA total de las células se realizó siguiendo el protocolo descrito por Chomezynski y Sacchi utilizando Trizol (Invitrogen). Es un método basado en la diferente solubilidad de los ácidos nucleicos y los contaminantes entre dos fases no miscibles. El trizol está compuesto por una mezcla de fenol, en la que los ácidos nucleicos son insolubles, y tiocianato de guanidina, que actúa como agente desnaturalizante de proteínas e inhibidor de las proteasas a pH 4.5, así se consigue mantener el RNA íntegro durante la extracción. Se añadió 1 ml de Trizol para cada  $5-10 \times 10^6$  células, en placas de 100 mm de diámetro con células adherentes en semiconfluencia, o en el caso de células en suspensión tras ser sedimentadas por centrifugación. Tras conseguir una solución homogénea, se añadieron 200  $\mu$ l de cloroformo, se agitó vigorosamente y se centrifugó a 12000 x g a 4°C durante 15 minutos. De esta forma se obtienen dos fases: la superior acuosa, que contiene el RNA, y la inferior roja que pertenece al fenol y cloroformo y una interfase entre ambas orgánica que contiene el DNA y las proteínas. Se recogió la fase acuosa, y se añadieron 250  $\mu$ l de isopropanol y 250  $\mu$ l de solución salina (0,8 M citrato sódico y 1,2 M cloruro sódico) si las muestras contienen alto contenido en polisacáridos, o bien, 500  $\mu$ l de isopropanol para muestras normales. La muestra se centrifugó de nuevo a 12000 x g durante 10 minutos a 4°C lo que permite la precipitación del RNA. Se lavó el precipitado con 1 ml de etanol al 75% con H<sub>2</sub>O DEPC (H<sub>2</sub>O desionizada (miliQ, Millipore), 0,01% dietilpirocarbonato), se resuspendió en H<sub>2</sub>O DEPC y se almacenó a -80°C hasta su uso. La cantidad de RNA presente en la muestra se determinó mediante su valoración en un NANO DROP utilizando la razón de absorbancias A260/280.

#### 3.2. Síntesis del DNA complementario

Se partió de muestras de 3  $\mu$ g de RNA para obtener 20  $\mu$ l de cDNA en presencia de la enzima transcriptasa inversa (RT). Los 3  $\mu$ g de muestra RNA se diluyeron en 11,1  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O-DEPC y se calentaron a 68°C durante 10 minutos, lo que permite la completa disociación del RNA.

Posteriormente, se añadió al RNA diluido la mezcla de RT: Tampón 5x, 10 mM DTT, 0,5 mM dNTP, 4  $\mu$ M de N6 (Mezcla de hexanucleótidos), 1 U/ $\mu$ l RNasin, 10 U/ $\mu$ l de RT del virus de la leucemia murina (M-MLV) y H<sub>2</sub>O-DEPC hasta completar el volumen de 20  $\mu$ l. Las muestras se incubaron a 37°C durante una hora. El cDNA se almacenó a -20°C.

### 3.3. Análisis mediante PCR a tiempo real

Se amplificaron mediante reacciones de PCR las secuencias específicas de cDNA de los genes de interés. Los cebadores se diseñaron según las secuencias humanas obtenidas del *GeneBank* (Tabla 2). Los cebadores se eligieron en distintos exones con el fin de descartar la contaminación genómica.

TABLA 2. Relación de *primers* utilizados para qPCR

Gen	Número de identificación en <i>GenBank</i>	Secuencias	
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
<i>IL23A</i>	NM_016584	5'-GTTCCCATATCCAGTGTGG-3'	5'-TTAGGGACTCAGGGTTGCTG-3'
<i>IL1<math>\beta</math></i>	NM_000576.2	5'-ATGATGGCTTATTACAGTGGCAA-3'	5'-GTCGGAGATTCGTAGCTGGA-3'
<i>TNF<math>\alpha</math></i>	NM_000594.3	5'-GTTGTAGCAAACCCTCAA-3'	5'-TTGAAGAGGACCTGGGA-3'
<i>IL10</i>	NM_000572.2	5'-GAGAACAGCTGCACCCACTT-3'	5'-GGCCTTGCTCTTGTTCAC-3'
<i>PDL1</i>	NM_014143.3	5'-CAGTTCTGCGCAGCTTCC-3'	5'-CAGCAAATGCCAGTAGGTCA-3'
<i>GAPDH</i>	NM_002046.3	5'-GTCAGTGGTGGACCTGACCT-3'	5'-AGGGGAGATTCAGTGTGGT-3'
<i>ACLY</i>	NM_001096.2	5'-AGGTCTCTCTGCAGCCATGT-3'	5'-CCAACGAGACCAAGTTTCC-3'
<i>ACSS2</i>	NM_001076552.2	5'-TGAGTGGATGAAAGGAGCAA-3'	5'-CACACTTGGACCAGAAGCTG-3'

Para llevar a cabo la PCR se emplean 12,5  $\mu$ l de *SyBr Green I Master* (Roche), 1,5  $\mu$ l de cDNA, 10  $\mu$ M de cada cebador y se completa con H<sub>2</sub>O milliQ hasta un volumen final de 25  $\mu$ l, en un equipo de PCR *LightCycler 480 software* (Roche). Aunque se fue modificando el programa en función del fragmento amplificado y de los oligonucleótidos usados, las condiciones estándares usadas se resumen en la tabla 3.

TABLA 3. Condiciones generales de la qPCR

Condición	Temperatura (°C)	Tiempo	Ciclos
Preincubación	95	5'	1x
Desnaturalización	95	15''	45x
Hibridación	60	20''	
Elongación	72	5''	
Melting	55 a 95	5''	1x
Cooling	40	10'	1x

La curva de fusión se obtuvo midiendo la emisión de fluorescencia para *SyBr Green* durante el cambio paulatino de temperatura de 60°C a 95°C a razón de 0,2° C/seg. Para la verificación de la eficiencia del proceso, se amplificó en todas las muestras un gen con expresión constitutiva, la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (*GAPDH*).

#### 4. Inmunoprecipitación de cromatina (ChIP)

Con el fin de analizar la unión directa de los factores de transcripción y de factores remodeladores de la cromatina y para identificar modificaciones específicas en las histonas nucleosomales en los promotores se realizaron ensayos de ChIP. Los reactivos utilizados fueron de Santa Cruz Biotechnology Inc. (Santa Cruz, CA) siguiendo el protocolo *Chip Lysis Buffer High SALT: cs-45001* y se inmunoprecipitó la cromatina con el anticuerpo frente a anti-K9-histona H3. Los *primers* utilizados para PCR de ChIP fueron los siguientes:

TABLA 4. *Primers* utilizados para ChIP

Promotor	Secuencias	
	Forward	Reverse
<b>IL23A sitio κB</b>	5'-CTGGGTTTCCGATTTTCTCA3'	5'-CCCATGTGACGAAATGACTG-3'
<b>IL10 sitio CRE</b>	5'-GGCAATTTGTCCACGTCAC-3'	5'-TGATTTCTGGGGAGAACAG-3'

##### 4.1. Fragmentación de la cromatina

Se cultivaron 10<sup>6</sup> células dendríticas en placas de 100 mm de diámetro. Tras la estimulación se añadió directamente al medio de cultivo formaldehído al 1% durante 15 minutos a temperatura ambiente para fijar las uniones entre las proteínas y el DNA. Para detener el entrecruzamiento proteína-DNA, se añadió glicina 0.125 M durante 5 minutos. Las células se lavaron con PBS frío, se recogieron en tubos y se dejaron 30 minutos a 4°C con el tampón de lisis. Se centrifugó a 800 x g durante 5 minutos y se lavó el precipitado con PBS frío. El precipitado celular se congeló en nitrógeno líquido y se mantuvo a -80°C. Para proceder a la fragmentación de la cromatina, se utilizó un sonicador *Bioruptor*<sup>TM</sup> (Diagenode). La frecuencia de ultrasonidos producida por el *Bioruptor*<sup>TM</sup> equivale a 20 kHz. Con este fin, las muestras se descongelaron y se resuspendieron en 300 µL de tampón de lisis de alta salinidad. Se sonicaron durante 5 minutos en 4 tandas en presencia de hielo para obtener fragmentos de DNA de tamaño comprendido entre 100 y 1000 pb. Tras la sonicación las muestras se centrifugaron durante 15 minutos a 9300 x g a 4°C.

##### 4.2. ChIP

Las muestras de cromatina se incubaron en un rotor orbital a 4°C durante una hora en presencia de 50 µL de proteína A/G Plus agarosa para disminuir las uniones inespecíficas. Las muestras se centrifugaron durante 5 minutos a máxima velocidad y se añadieron 10 µg del anticuerpo correspondiente. La incubación se mantuvo durante la noche con rotación a 4°C. Posteriormente se añadieron 50 µL de la solución de proteína A/G Plus agarosa durante 2 horas a 4°C y la mezcla se centrifugó a 13400 x g. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las bolas de A/G Plus Agarosa dos veces con un tampón de alta salinidad y cuatro lavados con un tampón de lavado (0,25M LiCl, 1mM EDTA, 1% NP40, 1% ácido deoxicólico, 10 mM Tris-HCl, pH 8,1). Posteriormente para deshacer los entrecruzamientos proteína-DNA y liberar el DNA se añadió medio de elución. Se tomaron 50 µL de la solución de cromatina fragmentada sin incubación con el anticuerpo (input) y se añadieron 300 µL de H<sub>2</sub>O miliQ y 16 µL de NaCl al 5%, para el control de la fragmentación de la cromatina. La muestra se mantuvo durante 4 horas a 68°C para revertir el entrecruzamiento proteína-DNA. Se dejaron atemperar las muestras y se añadieron 400 µL de la solución

fenol/cloroformo/isoamil alcohol, se mezcló y se centrifugó 3 minutos a 14000 x g a temperatura ambiente. Se obtuvo una fase acuosa a la que se le añadieron 40  $\mu$ L de acetato sódico y 1 ml de etanol al 100% y se mantuvieron a -20°C durante toda la noche, para precipitar el DNA, tras lo que las muestras se centrifugaron durante 25 minutos a 14000 x g a 4°C. El precipitado resultante se resuspendió en 100  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O estéril.

#### **4.3. Visualización de la cromatina**

Para llevar a cabo la visualización se tomaron 15  $\mu$ L de solución de cromatina y se cargaron en un gel de agarosa al 1% con marcadores de DNA. Su visualización se realizó mediante tinción GelRed para confirmar que la fragmentación se había realizado correctamente. Tras la purificación de DNA, se realizaron las amplificaciones por qPCR en 25  $\mu$ L de mezcla de reacción empleando los *primers* especificados en la tabla 4.

#### **5. Análisis estadístico**

Los datos se han analizado con el programa estadístico Prism 7.0 (GraphPad software) y se representan como la media  $\pm$  SEM. La comparación entre dos grupos de experimentos se llevó a cabo usando el test t de Student de 2 colas.

## RESULTADOS

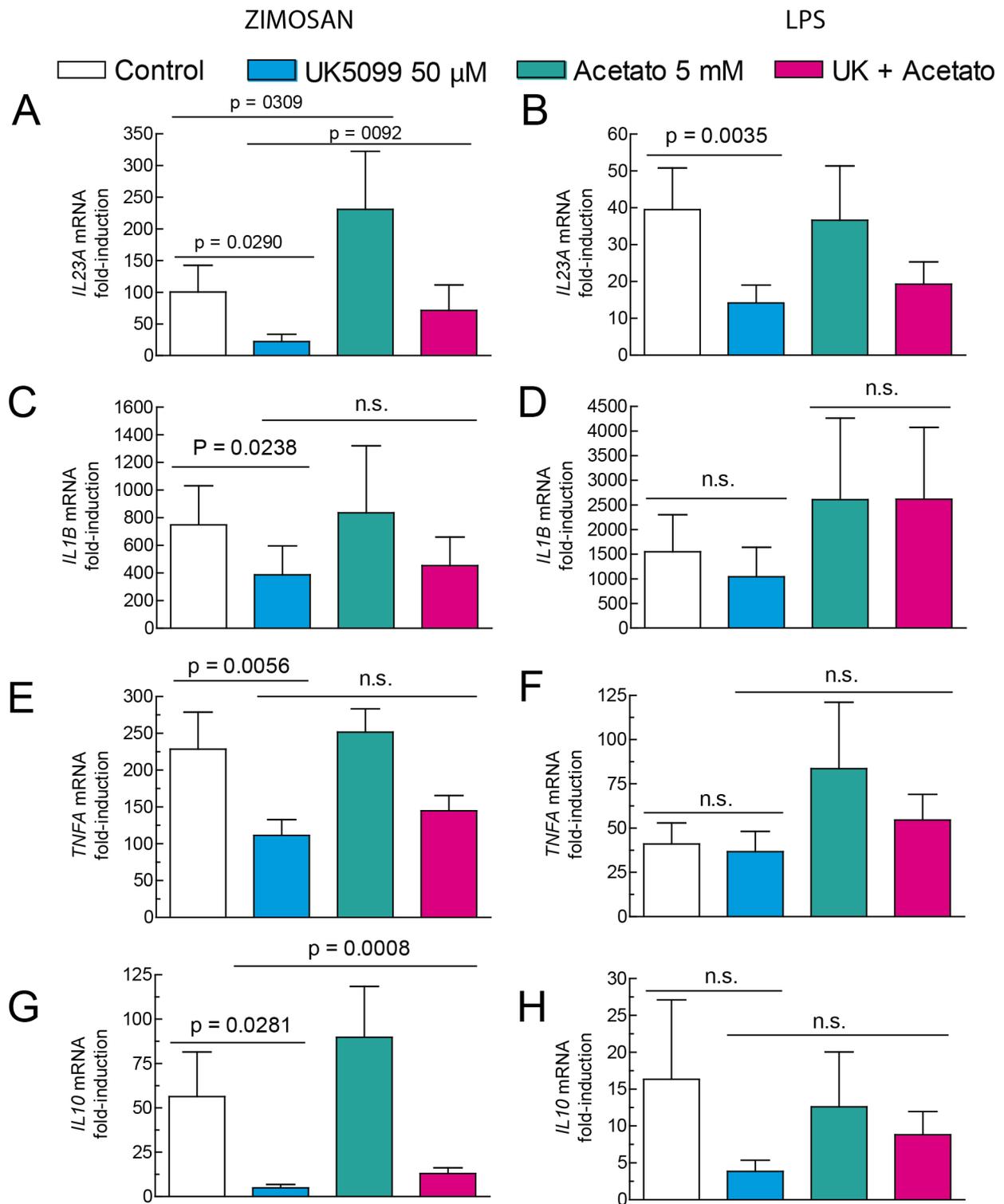
---

### 1. Reprogramación metabólica y producción de citocinas.

La producción de citocinas por las CDs es un proceso biosintético que requiere aporte de energía, por lo que se entiende que pueda influirse por el estado metabólico de las CDs. Sin embargo, no existe acuerdo sobre los cambios producidos durante la reprogramación metabólica, puesto que mientras se acepta que la estimulación de las CDs por patrones moleculares asociados a patógenos aumenta la glicólisis, los datos existentes no concuerdan en lo que se refiere al mantenimiento o la disminución de la OXPHOS. En este sentido, estudios recientes han mostrado que el aumento de la glicólisis no se acompaña de la caída del consumo de oxígeno<sup>30</sup> y que la oxidación del piruvato en la mitocondria es necesaria para la producción de algunas citocinas, en especial TNF $\alpha$ , mientras que otras citocinas como IL-1 $\beta$  muestran menor dependencia de la disponibilidad de piruvato<sup>31</sup>. Estos antecedentes justifican la necesidad de abordar de forma sistemática el papel del piruvato, incluyendo su contribución a la generación de citrato en la mitocondria, su salida al citoplasma y su contribución a la producción de acetil-CoA.

Para determinar el papel del piruvato sobre el patrón de expresión de citocinas, las CDs se estimularon con zimosan y LPS durante 4 horas en presencia del inhibidor del transportador de piruvato a la mitocondria, UK5099, en presencia y en ausencia de acetato. Trascurrido ese tiempo, se extrajo el RNA y se analizó mediante RT-PCR en tiempo real la expresión del RNA mensajero de varias citocinas.

La expresión de *IL23A*, *IL1B*, *TNFA* e *IL10* mostró inhibiciones significativas como se muestra en la Figura 4, si bien el efecto no fue idéntico sobre todas las citocinas ni en presencia de los distintos estímulos. Las inhibiciones más significativas se produjeron en el caso de la *IL23A* y la *IL10*. El efecto de la suplementación con acetato fue más claro sobre la inducción de *IL23A* en respuesta al zimosan y curiosamente, la presencia de acetato compensó la inhibición inducida por el UK5099. Estos datos indican la importancia del transporte del piruvato a la mitocondria para mantener la producción de citocinas, muestran la distinta dependencia de las diferentes citocinas a este proceso y sugieren que el acetato, posiblemente tras su conversión en acetil-CoA está implicado en la expresión de *IL23A* e *IL10*.



**FIGURA 4. Efecto de la inhibición del bloqueo del transporte de piruvato a la mitocondria y de la adición de acetato sódico sobre la expresión de citocinas.** Los paneles de la derecha muestran la respuesta a 1 mg/ml de zimosan y los de la izquierda a 10  $\mu$ g/ml de LPS. Las células dendríticas se preincubaron con UK5099 durante media hora en presencia y ausencia de acetato, y posteriormente se estimularon durante 4 horas con zimosan y LPS para proceder a la extracción del RNA y medida de la expresión del mRNA de las distintas citocinas mediante reacciones de RT-PCR en tiempo real. Los datos corresponden de 3 a 6 experimentos independientes expresados en forma de media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico Prism 7.0 (GraphPad Software). La comparación entre los grupos se llevó a cabo usando el test t de Student de dos colas.

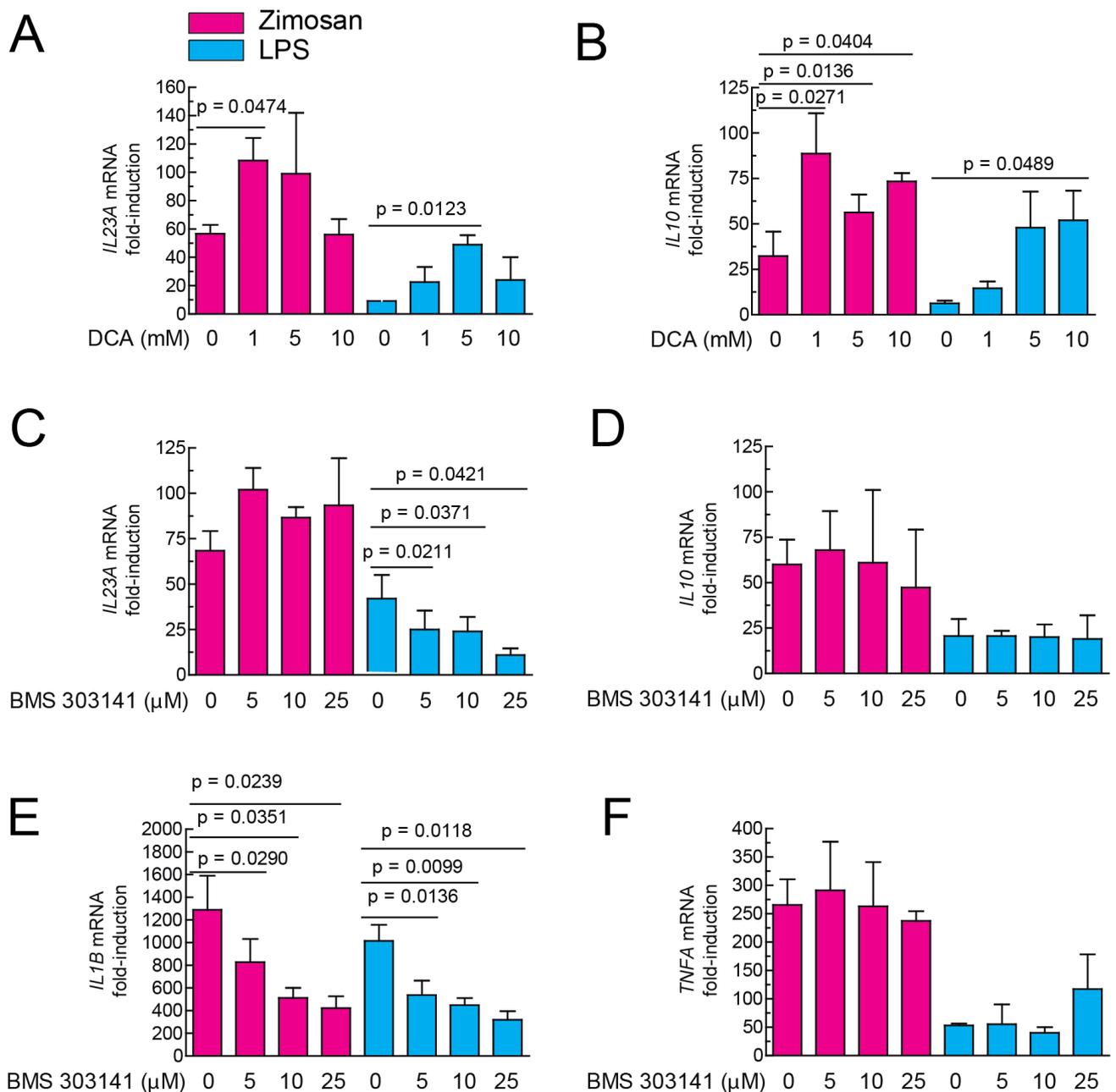
### 1.1. Acetil-CoA y producción de citocinas.

El acetil-CoA puede generarse por distintas enzimas citoplasmáticas y mitocondriales. El hecho de que sea el sustrato para la acetilación de histonas, ha sugerido la necesidad de estudiar su metabolismo en compartimentos extramitocondriales, habiéndose considerado dos contextos distintos. Un compartimento unitario citoplasma/núcleo, y dos compartimentos independientes, uno citoplasmático en el que el acetil-CoA se utiliza exclusivamente para la lipogénesis y un compartimento nuclear en el que el acetil-CoA se utiliza para la acetilación de histonas y factores de transcripción. Dada la disponibilidad de inhibidores farmacológicos de las distintas enzimas implicadas en la producción de acetil-CoA, se utilizaron inicialmente moduladores farmacológicos activos del complejo PDH y sobre la ACLY. El DCA es un inhibidor de la piruvato deshidrogenasa kinasa, que inhibe el complejo PDH por fosforilación, y el compuesto BMS303141 es un inhibidor de la ACLY.

La incubación de las CDs durante 30 min con DCA, previamente a su estimulación con zimosan y LPS durante 4 horas, produjo un aumento de la producción de las citocinas IL23A e IL10 como se muestra en la figura 5. Estos resultados indicarían la importancia de la oxidación del piruvato en la mitocondria al mostrar que la inhibición del principal regulador negativo de la PDH incrementa la expresión de las citocinas, en contraposición a su inhibición por el bloqueo de la entrada del piruvato por el UK5099.

De forma contraria a lo esperado, la inhibición de la ACLY solo fue efectiva sobre la inducción de IL1 $\beta$  en respuesta al zimosan y al LPS (Figura 5E), y en respuesta al LPS en el caso de la IL23A (Figura 5C). Estos datos sugieren tres escenarios inicialmente no contemplados:

- 1) Un efecto particular de ACLY sobre la expresión de IL1 $\beta$ , compatible con los datos referidos<sup>31</sup>.
- 2) El papel de otras enzimas en la producción de acetil-CoA para las reacciones de acetilación en el núcleo.
- 3) La posibilidad de que el efecto observado al inhibir la ACLY no se deba exclusivamente a la disminución de los niveles de acetil-CoA, sino que pudieran ser dependientes de la acumulación de citrato, a la vista de la descripción del efecto farmacológico de la adición de citrato exógeno sobre la proliferación de linfocitos y la producción de citocinas<sup>32</sup>.



**FIGURA 5. Efecto del inhibidor de la piruvato deshidrogenasa quinasa DCA y del inhibidor de la ACLY BMS 303141 sobre la expresión del mRNA de citocinas.**

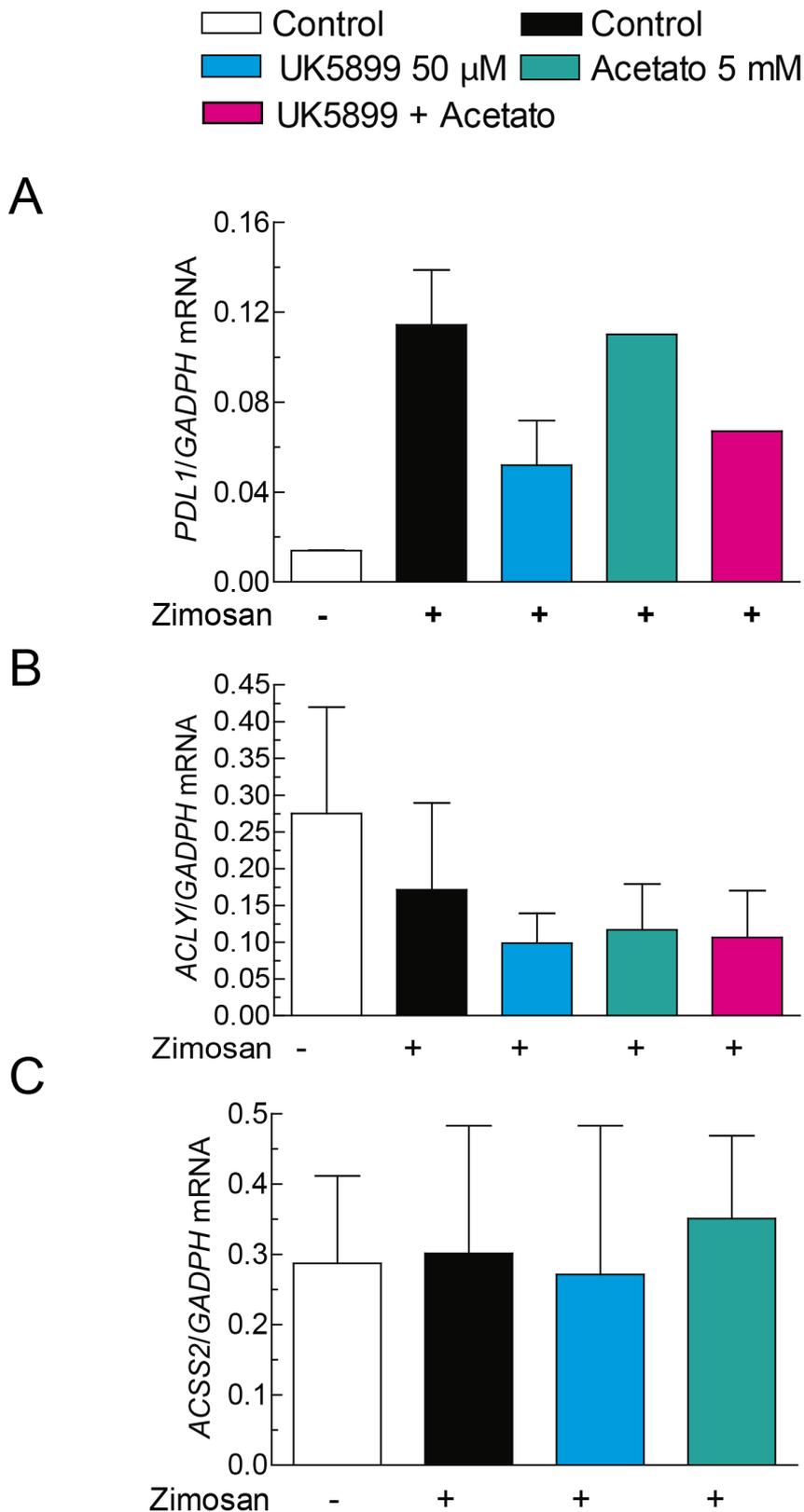
(A) y (B) muestran el efecto del DCA sobre la expresión del mRNA de *IL10* e *IL23A*. El efecto del BMS 303141 se muestra en (C-F). Las células dendríticas se preincubaron con DCA y BMS 303141 a las concentraciones indicadas y se estimularon durante 4 horas con zimosan y LPS antes de proceder a la extracción del RNA. Los datos corresponden a 3-5 experimentos diferentes, están expresados en forma de media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico Prism 7.0 (GraphPad Software). La comparación entre los grupos se llevó a cabo usando el test t de Student de dos colas.

## 1.2. Vías alternativas de producción de acetil-CoA en células dendríticas.

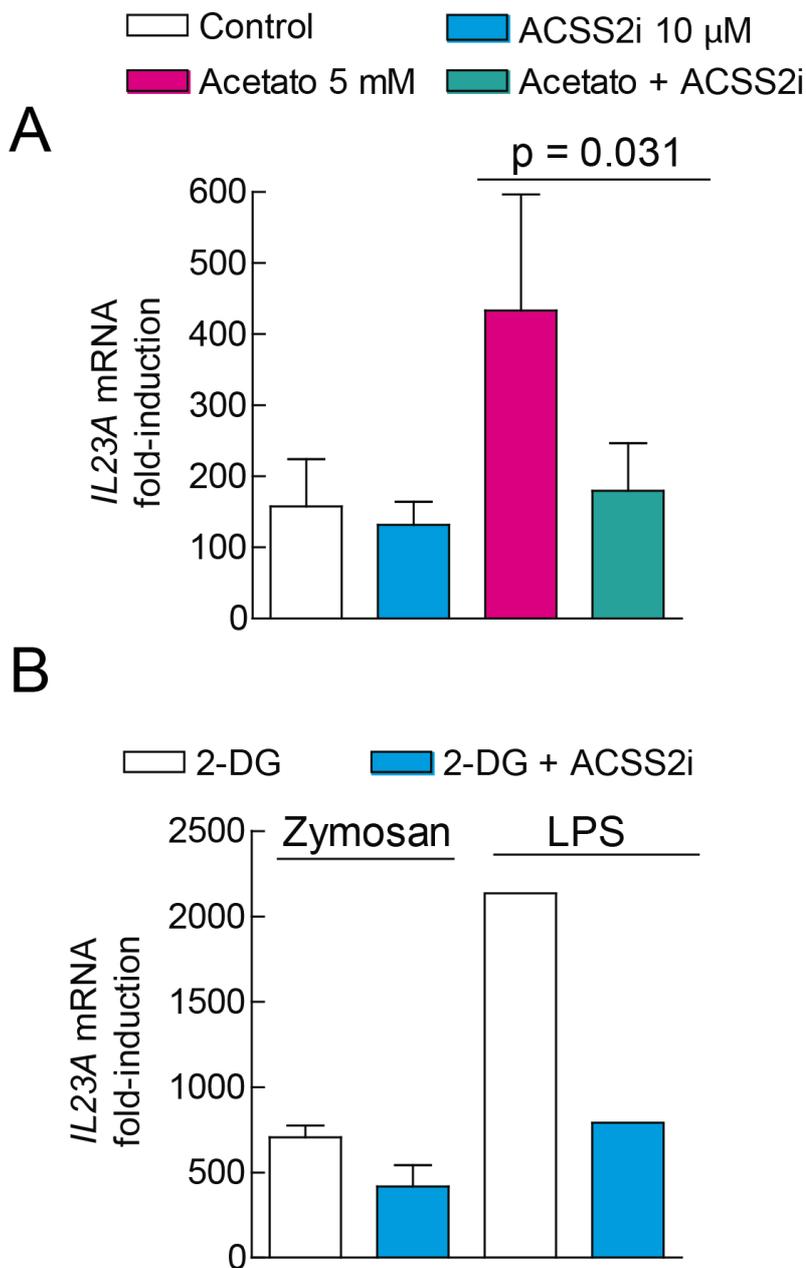
Para determinar el mecanismo por el que el acetato es capaz de revertir el efecto del UK5099 y buscar una explicación al efecto de ACLY sobre el patrón de expresión de citocinas, se estudió la expresión del mRNA de *ACLY* y *ACSS2* en células en reposo y tras estimulación con zymosan. Asimismo, dada la reciente descripción del efecto del piruvato sobre la inducción del *checkpoint inhibitor* PD-L1, se incluyó el estudio de la expresión de este ligando inhibitorio de la respuesta inmune<sup>33</sup>.

Como se muestra en la Figura 6A, la expresión del mRNA de *PDL1* mostró un aumento significativo tras la estimulación con zymosan y una reducción en presencia de UK5099, lo que confirmaría su inducción tras la estimulación y la dependencia de la oxidación del piruvato<sup>33</sup>. El estudio de la expresión de *ACLY* y *ACSS2* mostró un nivel elevado de la expresión del mRNA de ambas enzimas cuando se comparó con la expresión de *GADPH* (Figura 6B y C). Curiosamente, la expresión de *ACLY* mostró una tendencia a disminuir tras la estimulación con zymosan, que contrasta con la descripción de que esta enzima se induce en respuesta a estímulos proinflamatorios<sup>34</sup>.

Con el fin de determinar el papel de la *ACSS2* sobre la expresión de *IL23A*, las CDs se estimularon en presencia del inhibidor N-(2,3-di-2-thienil-6-quinoxalinil)-NO -(2-metoxetil)urea (*ACSS2i*)<sup>35</sup>. Como se muestra en la Figura 7A, el *ACSS2i* sólo inhibió significativamente la inducción del mRNA de *IL23A* cuando las células se incubaron en presencia de acetato, lo que sugiere que en ausencia de acetato exógeno, las CDs disponen de una fuente suficiente de acetil-CoA para la regulación transcripcional de la expresión de las citocinas. Sin embargo, el efecto del acetato exógeno se podría explicar mediante su conversión en acetil-CoA por la *ACSS2*. Dado que recientemente se ha descrito que la inhibición del metabolismo de la glucosa por el análogo de glucosa 2-desoxiglucosa (2-DG), que actúa sobre la hexokinasa y la fosfoglucosa isomerasa, aumenta significativamente la expresión del mRNA de *IL23A*<sup>36</sup>, se estudió el efecto del *ACSS2i* en estas condiciones. Como se muestra en la Figura 7B, el *ACSS2i* mostró un efecto similar al observado en presencia de acetato exógeno, lo que sugeriría el papel de esta vía de producción de acetil-CoA en condiciones que dificultan su generación a partir del piruvato.



**FIGURA 6. Expresión de *PDL1*, *ACLY* y *ACSS2* en células dendríticas.** La expresión del RNAm de *PDL1* en relación con la expresión de *GADPH* se muestra en (A), lo que permite apreciar además de su nivel relativo, el incremento tras la estimulación con zimosan. La expresión del RNAm de *ACLY* se muestra en (B) y la expresión del RNAm de *ACSS2* en (C). Las células dendríticas se preincubaron con UK5099 y acetato durante media hora, y se estimularon con zimosan durante 4 horas antes de la extracción del RNA. Los datos corresponden a 2-3 experimentos diferentes expresados en forma de media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico Prism 7.0 (GraphPad Software). La comparación entre los grupos se llevó a cabo usando el test t de Student de dos colas.



**FIGURA 7. Efecto del inhibidor de la ACSS2, N-(2,3-di-2-thienil-6-quinoxalinil)-NO-(2-metoxetil)urea (ACSS2i), sobre la expresión de *IL23A*.** (A) Las células dendríticas se estimularon durante 4 horas con zymsoan en presencia y ausencia de ACSS2i y acetato durante 4 horas a las concentraciones indicadas. (B) Efecto del ACSS2i sobre la expresión del mRNA de *IL23A* en presencia de 2-DG y ACSS2i. Las células dendríticas se estimularon durante 4 horas en presencia de 2-desoxiglucosa 10 mM y ACSS2i 10 μM. Tras finalizar ese periodo se extrajo el RNA para el análisis del mRNA de *IL23A*. Los datos corresponden a 3 experimentos diferentes expresados en forma de media  $\pm$  error estándar de la media. Las diferencias estadísticas se analizaron con el programa estadístico Prism 7.0 (GraphPad Software). La comparación entre los grupos se llevó a cabo usando el test t de Student de dos colas.

## 2. Influencia de la disponibilidad de acetil-CoA sobre la acetilación de histonas

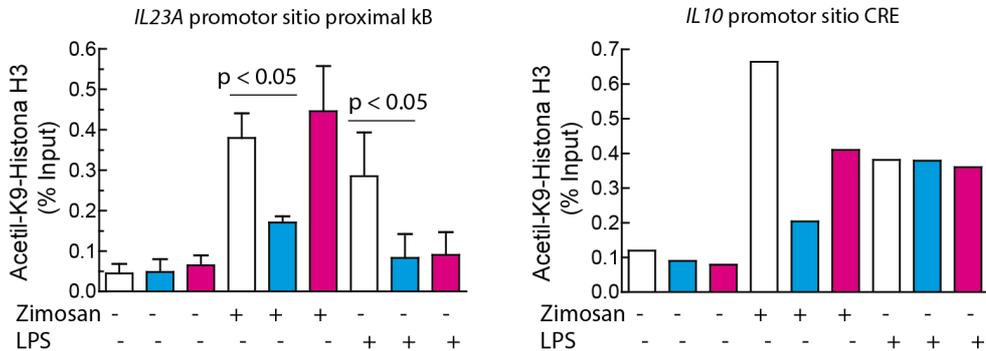
En base a los resultados obtenidos y teniendo en cuenta la influencia de la disponibilidad de acetil-CoA nuclear para la acetilación de histonas nos planteamos estudiar si dicha modificación ocurre de manera selectiva, en los promotores de ciertas citocinas, dado los resultados dispares obtenidos en cuanto a la expresión de mRNA de las citocinas o por el contrario es un efecto global. De esa forma que las acetilaciones específicas en histonas de promotores serían una consecuencia de la acción de la ACSS2 en un microentorno, bien por la producción local de acetil-CoA a partir de acetato, bien por la reacetilación de histonas usando el acetato liberado de los procesos de desacetilación en el núcleo<sup>27</sup>.

Se procedió a realizar un ensayo de inmunoprecipitación de la cromatina con anticuerpo anti-acetil-K9-histona-H3 para los sitios de unión al promotor  $\kappa$ B de la *IL23A* y CRE de la *IL10*. El hecho de elegir la acetilación de la lisina 9 es debido a que estudios anteriores refieren que esta modificación está implicada en el control de la expresión de muchos genes glicolíticos, incluyendo HIF1 $\alpha$ <sup>19</sup>. Para ello, las células dendríticas se estimularon con zimosan y LPS durante 4 horas y se incubaron en presencia de UK5099 durante media hora en ausencia y presencia de acetato, tras lo cual se inmunoprecipitó la cromatina. La estimulación con zimosan y la presencia de UK5099 redujo la unión del anticuerpo frente a la histona acetilada en los promotores de la *IL23A* y la *IL10* como se muestra en la Figura 8A. La presencia de acetato muestra una tendencia a revertir el efecto del UK5099, sobre todo en el promotor de la *IL23A* cuando las CDs fueron estimuladas con zimosan. Con el fin de estudiar la influencia del complejo PDH y la ACLY en la acetilación específica de histonas, se estimularon las CDs con zimosan y LPS y se añadieron los compuestos DCA y BMS303141. La inhibición de la ACLY no supuso ningún cambio significativo como se muestra en la Figura 8B, mientras que la estimulación del complejo PDH aumentó significativamente la acetilación de la K9-histona H3 en los promotores de ambas citocinas.

Para determinar si la acetilación de histonas tenía un carácter global, se estudió el efecto del UK5099 y el acetato sobre la histona H3 en lisados proteicos como se muestra en la Figura 8C. Asimismo se estudió la fosforilación en la serina 10 de la histona H3, modificación que suele preceder y facilitar la acetilación. Esta fosforilación se observó en condiciones basales y aumentó ligeramente cuando las células se estimularon con zimosan. Dado que los cambios observados son más notables a nivel de los promotores, los resultados sugieren que no son consecuencia de una disminución global de las acetilaciones, sino que ocurren de forma selectiva en los promotores de algunas citocinas.

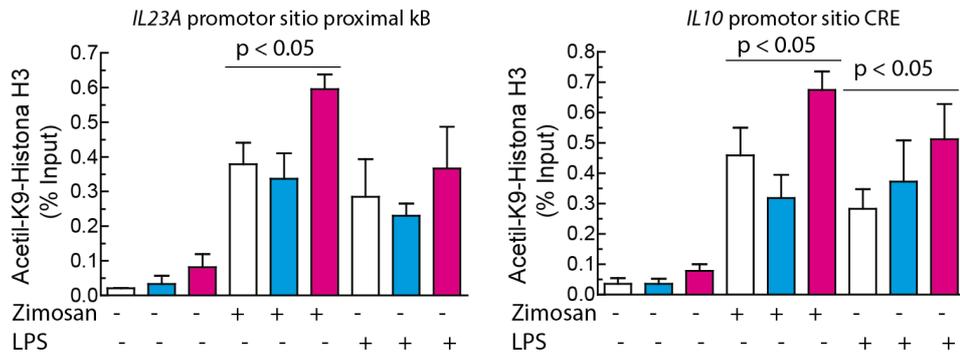
**A**

Control UK5099 50 mM Acetato 5 mM

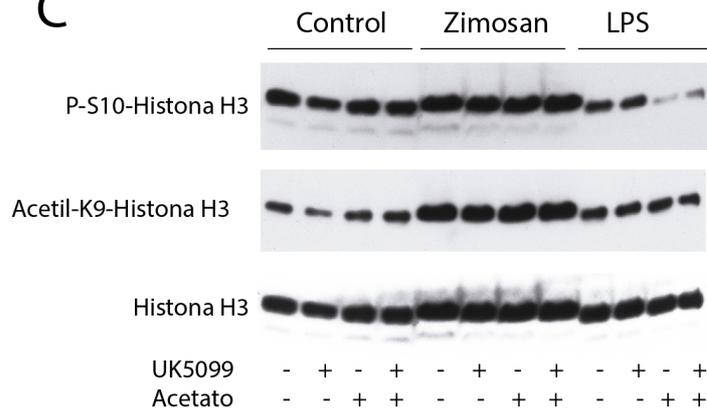


**B**

Control BMS 303141 10 μM DCA 5 mM



**C**



**FIGURA 8. Efecto de la estimulación y de compuestos activos sobre el metabolismo energético sobre la acetilación de la K9 de la histona H3 en los promotores de *IL23A* e *IL10* y sobre la acetilación global de las histonas en lisados celulares.** El efecto de la inhibición del transporte del piruvato a la mitocondria en respuesta al zimosan y al LPS se muestra en (A). El efecto de la inhibición de ACLY y de la piruvato deshidrogenasa se muestra en (B). El efecto del UK5099 y el acetato sobre la fosforilación de la S10 de la histona H3 y la acetilación de la K9 en presencia y ausencia de acetato se muestra en (C).

## DISCUSIÓN

---

Este estudio se ha iniciado a la vista de la creciente importancia que se ha atribuido recientemente a la reprogramación metabólica de las células del sistema inmune tras su activación por patrones moleculares derivados de patógenos. Estos estudios han permitido perfilar un modelo en el que el aumento de la glicolisis va acompañado de una caída paralela de la fosforilación oxidativa y del consumo de oxígeno. La relevancia de estos cambios para el funcionalismo de las células del sistema inmune se explica por su asociación con cambios paralelos en el patrón de transcripción, que se refleja especialmente en la producción de citocinas, denominada *cytokine signature* en idioma inglés. Asimismo, la funcionalidad de esta reprogramación metabólica se ha relacionado con la necesidad de dirigir el metabolismo hidrocarbonado a la síntesis de productos como lípidos y ácidos nucleicos necesarios para la proliferación de las células del sistema inmune y la defensa del organismo.

Sobre la base de un estudio previo en el que se observó que el aumento de la glicolisis no se acompañaba de la reducción de la fosforilación oxidativa<sup>36</sup> y de otro estudio en el que se mostraba que el piruvato era necesario para la producción de algunas citocinas, como el TNF $\alpha$  y otras moléculas proinflamatorias como iNOS e Irg1, pero no IL-1 $\beta$ <sup>31</sup>, nos planteamos un estudio detallado del papel del piruvato en las células dendríticas humanas. Los resultados utilizando el inhibidor del transportador de piruvato a la mitocondria UK5099 a la concentración 50  $\mu$ M, una concentración más baja que la empleada en la mayor parte de los estudios, han mostrado un papel central del piruvato para mantener la expresión de varias citocinas, aunque la dependencia no era la misma para todas ellas ni para los distintos estímulos. En este sentido, la expresión de *IL23A* e *IL10* fue más sensible a la oxidación del piruvato, mientras que el efecto sobre *TNFA* e *IL1B* fue menos intenso. Ante la sospecha de que el efecto del piruvato dependiera de su capacidad para mantener la formación de citrato en el ciclo de Krebs y la disponibilidad de acetil-CoA en el citoplasma, que generalmente se ha atribuido a la conversión del citrato en acetil-CoA y oxalacetato, se complementaron los experimentos con la adición de acetato exógeno. De nuevo los experimentos mostraron un distinto efecto del acetato sobre las citocinas analizadas. El efecto fue claramente significativo en el caso de la *IL23A* y la *IL10*, observándose que la simple adición de acetato aumentaba el efecto de la estimulación, pero sobre todo, que el acetato exógeno neutralizaba en gran parte el efecto inhibitorio del UK5099. Estos datos sugerían que el efecto del piruvato dependería de su capacidad para generar acetil-CoA y que en ausencia de transporte de piruvato al interior de la mitocondria debe existir una fuente alternativa capaz de producir acetil-CoA.

A la vista de la reciente descripción del papel del acetato como fuente energética alternativa a la glucosa, al menos en células tumorales<sup>37</sup>, nos planeamos explorar el posible papel de la ACSS2, enzima presente en el compartimento citoplasma/núcleo cuya funcionalidad en el citoplasma sería la lipogénesis y en el núcleo se encargaría de reacetilar las histonas capturando el acetato liberado por las histonas para convertirlo en acetil-CoA<sup>27</sup>. De esa manera, el acetato nuclear estaría atrapado en ese compartimento y garantizaría la acetilación de histonas y otras proteínas nucleares incluso en condiciones de deprivación intensa de nutrientes. Como paso previo a la comprobación experimental de esta hipótesis nos planteamos analizar la expresión de la ACSS2 en las células dendríticas. Los experimentos mostraron un nivel abundante de expresión del mRNA de la enzima, al igual que la expresión de *ACLY*, lo que indica que estas dos rutas capaces de generar acetil-CoA en el compartimento citoplasma/núcleo pueden ser operativas en estas células.

Sobre estas bases nos planteamos los experimentos con inhibidores farmacológicos para determinar el papel de estas enzimas sobre la expresión de citocinas. Mientras que la modulación de la actividad de la piruvato deshidrogenasa mediante la inhibición de su regulador negativo, la piruvato deshidrogenasa quinasa produjo un aumento de la expresión del mRNA de *IL23A* e *IL10*, la inhibición de la actividad de la ACLY sólo mostró un efecto inhibitorio sobre la expresión del mRNA de *IL1B* y de *IL23A* en respuesta al LPS, lo que de nuevo muestra los diferentes mecanismos de regulación de la expresión de las distintas citocinas. Como posible interpretación de la falta de efecto de la inhibición de ACLY sobre la totalidad de las citocinas, podría argumentarse el papel primordial de ACSS2 o la inducción de mecanismos secundarios relacionados con la acumulación de citrato como se ha descrito recientemente<sup>32,38</sup>.

A la vista de estos resultados nos planteamos analizar el efecto de la inhibición de la ACSS2 con un inhibidor recientemente descrito obtenido de un *screening* exhaustivo de una librería de más de 200000 moléculas con capacidad potencial como fármacos<sup>35</sup>. Notablemente, la inhibición de la ACSS2 no modificó la producción de *IL23A* durante la estimulación con zymosan y LPS, lo que sugeriría que existe una fuente suficiente de acetil-CoA, que verosímilmente correspondería a la actividad de la ACLY, que en presencia de piruvato sería la responsable de la producción de acetil-CoA. Sin embargo, el ACSS2i fue capaz de inhibir prácticamente en su totalidad el aumento de la expresión de *IL23A* observado en presencia de acetato exógeno.

Tomados en conjunto, estos resultados muestran que la producción de citocinas, por las células dendríticas, especialmente la IL-23 y la IL-10, dependen del metabolismo mitocondrial del piruvato. Esta dependencia del metabolismo del piruvato se explica a través de su conversión en citrato, su transporte al citoplasma y su conversión en acetil-CoA por la ACLY. Asimismo, estos resultados muestran que existe una fuente alternativa de producción de acetil-CoA en el compartimento citoplasma/núcleo a través de la ACSS2, cuyo papel se manifiesta en presencia de un aporte de acetato exógeno, o en el caso del núcleo, por su capacidad para reciclar el acetato generado en las reacciones de acetilación/desacetilación de las histonas, lo que según estudios recientes ocurriría con independencia de la actividad de la ACSS2 del compartimento citoplasmático, a la que recientemente se ha asignado una función exclusiva en la lipogénesis.

Los experimentos de acetilación de los promotores y la comparación con los niveles de acetilación global de histonas, muestran la selectividad de estos cambios sobre la expresión de citocinas y sugerirían la distinción entre el compartimento citoplasmático y el nuclear en lo que se refiere a la utilización del acetil-CoA.

## CONCLUSIONES

---

1. La producción de citocinas por las células dendríticas derivadas de monocitos precisa la utilización del piruvato en las mitocondrias. Este efecto es más prominente sobre la producción de las citocinas IL-10 e IL-23
2. La función del piruvato se demuestra por su dependencia del transporte al interior de la mitocondria y por el aumento de la respuesta tras la inhibición de la piruvato deshidrogenasa kinasa, que es el principal regulador negativo del complejo PDC.
3. El efecto producido por la inhibición del metabolismo del piruvato se revierte, en gran parte, por la adición de acetato exógeno, lo que indicaría que el efecto del piruvato depende de la actividad del ciclo de Krebs y la formación de acetil-CoA a partir del citrato transportado al citoplasma. Este efecto puede compensarse por la conversión del acetato en acetil-CoA por la enzima ACSS2.
4. La formación de acetil-CoA a partir del acetato es operativa en condiciones de privación de nutrientes y ocurre en el núcleo, que se comportaría como un compartimento independiente del citoplasma, donde existe una fuente de acetato endógeno generado por la desacetilación de las histonas.
5. Los cambios en el patrón de acetilación de las histonas se producen de forma selectiva, al menos en los promotores de la IL-23 y la IL-10, sin que se observen cambios significativos en la acetilación global.

---

### *Reflexión final:*

---

La activación de las CDs induce una reprogramación metabólica en la que el aumento de la glicólisis no se acompaña necesariamente de la disminución de la actividad mitocondrial. Para una correcta función efectora es necesaria la oxidación del piruvato en la mitocondria a través del complejo PDC. La necesidad de disponer de acetil-CoA en el compartimento citoplasma/núcleo, explica la relevancia que durante la deprivación de nutrientes pueda tener la vía alternativa de producción de acetil-CoA a través de la ACSS2.

## REFERENCIAS

---

1. Beutler, B. (2004). Innate immunity: an overview. *Molecular Immunology*, 40(12), 845-859.
2. Medzhitov, R., & Janeway Jr, C. A. (1998, October). Innate immune recognition and control of adaptive immune responses. In *Seminars in Immunology* (Vol. 10, No. 5, pp. 351-353). Academic Press.
3. Barton, G. M., & Medzhitov, R. (2002). Control of adaptive immune responses by Toll-like receptors. *Current Opinion in Immunology*, 14(3), 380-383.
4. Sallusto, F., & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*, 179(4), 1109-1118.
5. Janeway, C. A. (1989). Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. In *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology* (Vol. 54, pp. 1-13). Cold Spring Harbor Laboratory Press.
6. Geijtenbeek, T. B., van Vliet, S. J., Engering, A., 't Hart, B. A., & van Kooyk, Y. (2004). Self-and nonself-recognition by C-type lectins on dendritic cells. *Annual Review Immunology*, 22, 33-54.
7. Geijtenbeek, T. B., & Gringhuis, S. I. (2009). Signalling through C-type lectin receptors: shaping immune responses. *Nature Reviews. Immunology*, 9(7), 465-479.
8. Lu, Y. C., Yeh, W. C., & Ohashi, P. S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine*, 42(2), 145-151.
9. Dillon, S., Agrawal, S., Banerjee, K., Letterio, J., Denning, T. L., Oswald-Richter, K., & Ziegler, S. (2006). Yeast zymosan, a stimulus for TLR2 and dectin-1, induces regulatory antigen-presenting cells and immunological tolerance. *Journal of Clinical Investigation*, 116(4), 916-928.
10. O'Neill, L. A., Kishton, R. J., & Rathmell, J. (2016). A guide to immunometabolism for immunologists. *Nature Reviews Immunology*, 16(9), 553-565
11. Everts, B., Amiel, E., Huang, S. C. C., Smith, A. M., Chang, C. H., Lam, W. Y., & Artyomov, M. N. (2014). TLR-driven early glycolytic reprogramming via the kinases TBK1-IKK  $\epsilon$  supports the anabolic demands of dendritic cell activation. *Nature Immunology*, 15(4), 323-332.
12. Pearce, E. L., & Pearce, E. J. (2013). Metabolic pathways in immune cell activation and quiescence. *Immunity*, 38(4), 633-643.
13. Krawczyk, C. M., Holowka, T., Sun, J., Blagih, J., Amiel, E., DeBerardinis, R. J., & Pearce, E. J. (2010). Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*, 115(23), 4742-4749.
14. Palsson-McDermott, E. M., Curtis, A. M., Goel, G., Lauterbach, M. A., Sheedy, F. J., Gleeson, L. E., & Jiang, J. K. (2015). Pyruvate kinase M2 regulates Hif-1 $\alpha$  activity and IL-1 $\beta$  induction and is a critical determinant of the warburg effect in LPS-activated macrophages. *Cell Metabolism*, 21(1), 65-80.

15. Blanco, P., Palucka, A. K., Pascual, V., & Banchereau, J. (2008). Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19(1), 41-52.
16. Hölscher, C. (2004). The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Medical Microbiology and Immunology*, 193(1), 1-17.
17. Luger, K., Mader, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., & Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 angstrom resolution. *Nature*, 389(6648), 251.
18. Kurdistani, S. K., & Grunstein, M. (2003). Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 4(4), 276.
19. Cameron, A. M., Lawless, S. J., & Pearce, E. J. (2016, October). Metabolism and acetylation in innate immune cell function and fate. In *Seminars in Immunology* (Vol. 28, No. 5, pp. 408-416). Academic Press.
20. Kimura, H. (2013). Histone modifications for human epigenome analysis. *Journal of Human Genetics*, 58(7), p439-445.
21. Fan, J., Krautkramer, K. A., Feldman, J. L., & Denu, J. M. (2015). Metabolic regulation of histone post-translational modifications. *ACS Chemical Biology*, 10(1), 95-108.
22. Boukouris, A. E., Zervopoulos, S. D., & Michelakis, E. D. (2016). Metabolic enzymes moonlighting in the nucleus: metabolic regulation of gene transcription. *Trends in Biochemical Sciences*, 41(8), 712-730.
23. Wellen, K. E., Hatzivassiliou, G., Sachdeva, U. M., Bui, T. V., Cross, J. R., & Thompson, C. B. (2009). ATP-citrate lyase links cellular metabolism to histone acetylation. *Science*, 324(5930), 1076-1080.
24. Shah, S., Carriveau, W. J., Li, J., Campbell, S. L., Kopinski, P. K., Lim, H. W., & Koumenis, C. (2016). Targeting ACLY sensitizes castration-resistant prostate cancer cells to AR antagonism by impinging on an ACLY-AMPK-AR feedback mechanism. *Oncotarget*, 7(28), 43713.
25. Sutendra, G., Kinnaird, A., Dromparis, P., Paulin, R., Stenson, T. H., Haromy, A., & Michelakis, E. D. (2014). A nuclear pyruvate dehydrogenase complex is important for the generation of acetyl-CoA and histone acetylation. *Cell*, 158(1), 84-97.
26. Yang, W., Xia, Y., Hawke, D., Li, X., Liang, J., Xing, D., & Lu, Z. (2012). PKM2 phosphorylates histone H3 and promotes gene transcription and tumorigenesis. *Cell*, 150(4), 685-696.
27. Bulusu, V., Tumanov, S., Michalopoulou, E., van den Broek, N. J., MacKay, G., Nixon, C., & Gottlieb, E. (2017). Acetate Recapturing by Nuclear Acetyl-CoA Synthetase 2 Prevents Loss of Histone Acetylation during Oxygen and Serum Limitation. *Cell reports*, 18(3), 647-658.
28. Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2), 248-254.
29. Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature*, 227(5259), 680-685.
30. Dong, H., & Bullock, T. N. (2014). Metabolic influences that regulate dendritic cell function in tumors. *Frontiers in Immunology*, 5:24. doi: 10.3389/fimmu.2014.00024.
31. Meiser, J., Krämer, L., Sapcariu, S. C., Battello, N., Ghelfi, J., D'Herouel, A. F., & Hiller, K. (2016). Pro-inflammatory macrophages sustain pyruvate oxidation through pyruvate

dehydrogenase for the synthesis of itaconate and to enable cytokine expression. *Journal of Biological Chemistry*, 291(8), 3932-3946.

32. MacPherson, S., Horkoff, M., Gravel, C., Hoffmann, T., Zuber, J., & Lum, J. J. (2017). STAT3 Regulation of Citrate Synthase Is Essential during the Initiation of Lymphocyte Cell Growth. *Cell Reports*, 19(5), 910-918.

33. Watanabe, R., Shirai, T., Namkoong, H., Zhang, H., Berry, G. J., Wallis, B. B., & Goronzy, J. J. (2017). Pyruvate controls the checkpoint inhibitor PD-L1 and suppresses T cell immunity. *The Journal of Clinical Investigation*, 127(7), 2725-2738.

34. Infantino, V., Iacobazzi, V., Palmieri, F., & Menga, A. (2013). ATP-citrate lyase is essential for macrophage inflammatory response. *Biochemical and biophysical research communications*, 440(1), 105-111.

35. Comerford, S. A., Huang, Z., Du, X., Wang, Y., Cai, L., Witkiewicz, A. K., & Horton, J. D. (2014). Acetate dependence of tumors. *Cell*, 159(7), 1591-1602.

36. Márquez, S., Fernández, J. J., Terán-Cabanillas, E., Herrero, C., Alonso, S., Azogil, A., & Crespo, M. S. (2017). Endoplasmic Reticulum Stress Sensor IRE1 $\alpha$  Enhances IL-23 Expression by Human Dendritic Cells. *Frontiers in Immunology*, 8:639. doi: 10.3389/fimmu.2017.00639.

37. Schug, Z. T., Peck, B., Jones, D. T., Zhang, Q., Grosskurth, S., Alam, I. S., & McGarry, L. (2015). Acetyl-CoA synthetase 2 promotes acetate utilization and maintains cancer cell growth under metabolic stress. *Cancer Cell*, 27(1), 57-71.

38. Ashbrook, M. J., McDonough, K. L., Pituch, J. J., Christopherson, P. L., Cornell, T. T., Selewski, D. T., & Blatt, N. B. (2015). Citrate modulates lipopolysaccharide-induced monocyte inflammatory responses. *Clinical & Experimental Immunology*, 180(3), 520-530.