

Moya-Garzon MD, Wang M, Li VL, et al. A β -hydroxybutyrate shunt pathway generates anti-obesity ketone metabolites. Cell. 2024 Nov 7:S0092-8674(24)01214-5.

Una via metabolica alternativa del β -idrossibutirrato genera metaboliti chetogenici anti-obesità.

Durante periodi di scarso introito di carboidrati, come nel digiuno oppure in conseguenza di una dieta chetogenica, i livelli corporei di β -idrossibutirrato (BHB), uno dei principali corpi chetonici, aumentano; BHB viene poi utilizzato come substrato per la sintesi di ATP in organi ad alta richiesta energetica come il cervello o il cuore. BHB viene prodotto nel fegato mediante una via di sintesi dove l'acetyl-CoA prodotto dalla β -ossidazione degli acidi grassi viene convertito in BHB tramite una via enzimatica che coinvolge, in sequenza, gli enzimi HMGCS2 (3-hydroxymethylglutaryl-CoA synthase 2), HMGCL (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA lyase), e BDH1 (3-hydroxybutyrate dehydrogenase). Una volta immesso in circolo, il BHB viene poi assimilato e ossidato da organi extraepatici mediante il catabolismo operato da BDH1, SCOT (succinyl-CoA:3-ketoacid CoA transferase) e il ciclo di Krebs (o TCA - tricarboxylic acid cycle). Ad oggi, questa è l'unica via metabolica caratterizzata sia per la sintesi che per l'ossidazione di BHB e non sono stati descritti altri composti chetonici secondari metabolicamente attivi.

Recentemente è stato dimostrato come la condensazione di acido lattico (o lattato) e amminoacidi (AA) mediante l'enzima CNBP2 (carnosine dipeptidase 2) generi metaboliti attivi (N-lactoyl amino acids), il più abbondante dei quali N-lactoylphenylalanine (Lac-Phe) è prodotto in risposta sia all'esercizio fisico che alla metformina ed è in grado di sopprimere l'assunzione di cibo (food intake – FI) e di diminuire il peso corporeo (body weight – BW); ciò indica che le vie metaboliche del lattato si estendono oltre la glicolisi e, interagendo con il metabolismo degli amminoacidi, generano metaboliti secondari in grado di stimolare la spesa energetica. BHB e il lattato hanno una struttura chimica molto simile ed in questo lavoro gli autori hanno perciò approfondito se anche il BHB possa, tramite coniugazione enzimatica con amminoacidi, formare altri composti metabolicamente attivi (fig.1)

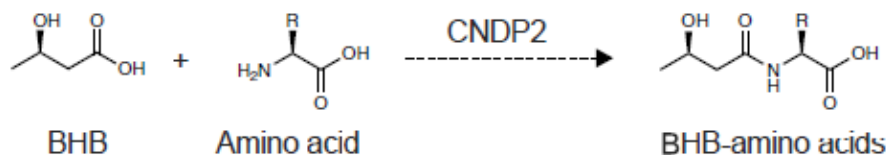


Fig.1 Meccanismo di sintesi di BHB-AA da parte di CNDP2

Come primo step, gli autori hanno incubato BHB e fenilalanina (Phe) in lisati cellulari di HEK293 dopo overespressione di CNDP2 o, come controllo, GFP. I risultati hanno mostrato che l'incubazione in presenza di CNDP2 aumentava la sintesi di BHB-Phe più di 140 volte rispetto all'incubazione in presenza di GFP (fig.2B); CNDP2 era inoltre in grado di coniugare Phe con BHB e con lattato (formando il già citato Lac-Phe), ma non con altri acidi organici (acetato o octanoato) (fig.2C). Oltre a ciò, la massima attività di coniugazione di BHB avveniva solo con Phe e, in misura minore, con altri AA, mentre non si otteneva alcuna reazione con la maggior parte dei rimanenti AA (fig.2D). Questi dati dimostravano quindi la selettività della reazione di coniugazione di BHB con Phe (BHB-ylation) e pochi altri specifici AA

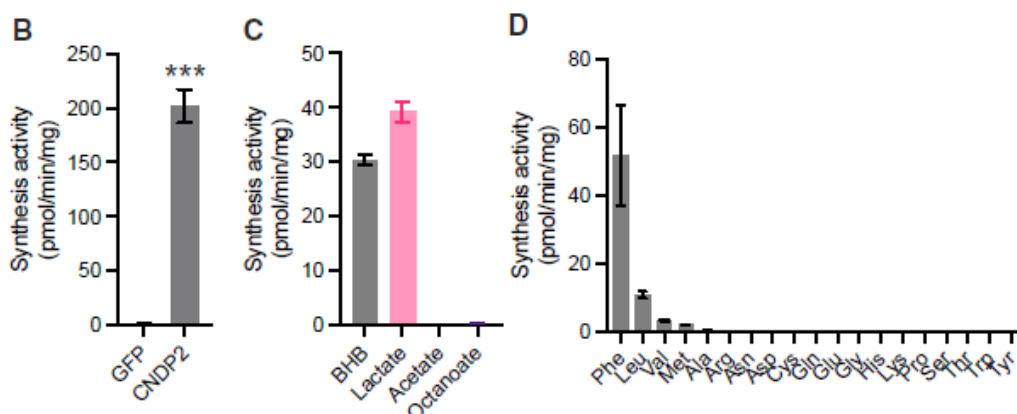


Fig.2 Sintesi di BHB-AA in lisati cellulari trasfettati con CNDP2 o GFP e con diversi substrati

Successivamente, gli autori hanno verificato se CNDP2 fosse in grado di catalizzare anche BHB-ylation *in vivo*, misurando la sintesi di BHB-Phe in lisati di diversi organi di topo. Come mostrato in fig.3B, l'attività di sintesi di BHB-Phe era massima nel rene e intestino, mentre nel cervello, fegato e quadricipite si osservava un'attività minore, ma comunque rilevabile; l'attività correlava inoltre con l'espressione proteica di CNDP2 (fig.3A) negli stessi tessuti ed era assente nei topi knockout per CNDP2 (fig.3B). Da notare come, utilizzando negli stessi organi Leucina (Leu) e Valina (Val) come

substrati in luogo di Phe si osservava anche un'elevata sintesi di BHB-Leu e BHB-Val, anch'essa abolita negli animali CNDP2-KO (fig.3C,D).

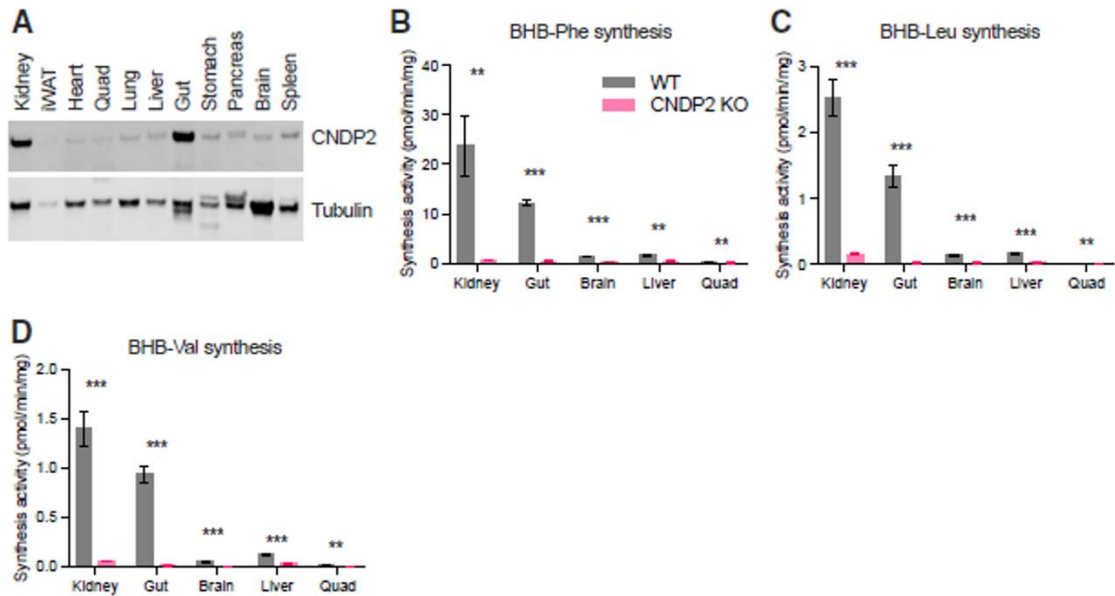


Fig.3 Espressione di CNDP2 in diversi tessuti e attività di sintesi di BHB-Phe in tessuti di topi WT o CNDP2 KO

Dal momento che metaboliti endogeni del BHB non sono mai stati descritti, gli autori hanno effettuato un'analisi di metabolomica mirata in plasma di topi tramite cromatografia liquida/spettrometria di massa/(LC/MS) (fig.4). L'analisi ha rivelato la presenza nel plasma murino sia di BHB-Phe (A) che degli altri metaboliti del BHB, come BHB-Val (B), BHB-Leu (C) e BHB-Met (D).

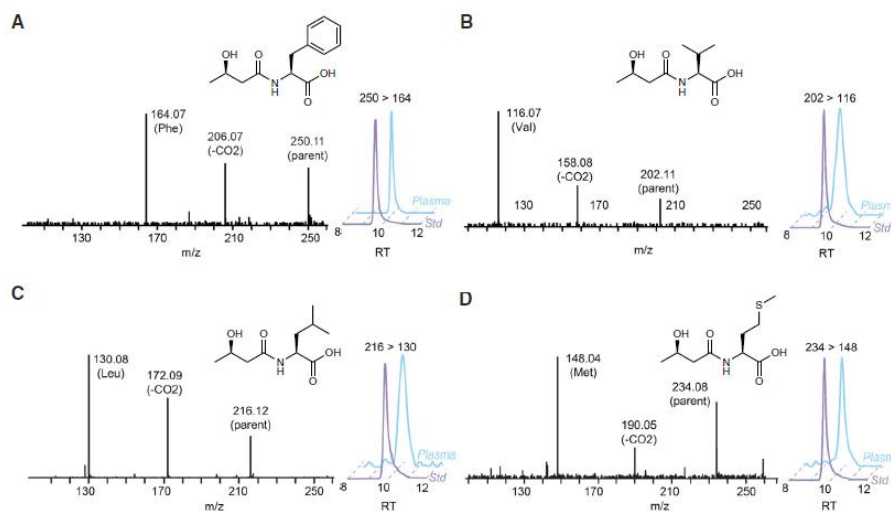


Fig.4 Determinazione dei metaboliti di BHB nel plasma dei topi

Inoltre, è stata anche analizzata la regolazione nutrizionale di questi metaboliti in animali alimentati per una settimana con dieta chetogenica, sottoposti a 24 ore di digiuno, o dopo gavage di una bevanda a base di esteri chetonici. I risultati hanno mostrato che tutte le condizioni aumentavano da 2 a 10 volte i livelli plasmatici di ognuno dei BHB-AA, con il massimo aumento ottenuto in seguito a dieta chetogenica, ma con variazioni significative anche in seguito a digiuno e bevanda con esteri chetonici (fig.5E-H). Questi dati quindi dimostravano che i BHB-AA sono metaboliti endogeni e inducibili da chetosi.

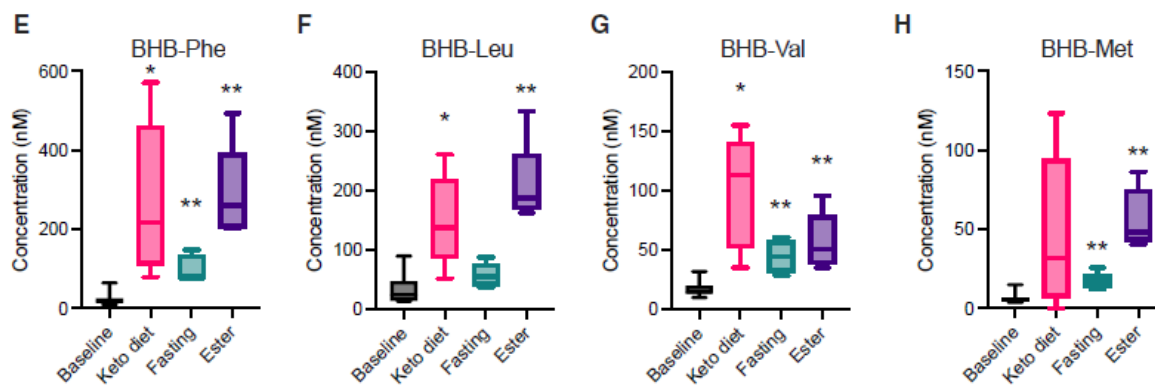


Fig.5 Livelli di BHB-AA nel plasma murino in diverse condizioni nutrizionali

Allo scopo di verificare l'effetto di BHB-AA su diversi parametri metabolici, gli autori hanno quindi somministrato BHB-Phe (50 mg/Kg intraperitoneale) a topi obesi (obesità indotta da dieta- DIO). Una singola somministrazione in acuto di BHB-Phe non modificava né attività locomotoria né produzione di O₂/rilascio CO₂, mentre riduceva il FI e, in accordo con quest'ultimo, il quoziente respiratorio (RER) (fig. 6A-E). La riduzione del FI indotta da somministrazione (giornaliera) in cronico di BHB-Phe risultava di conseguenza in una diminuzione del BW (fig.6 F,G) in misura simile ai controlli pair-fed, dimostrando quindi l'assenza di influenza diretta del BHB-Phe sulla spesa energetica (fig. 6H). Inoltre, soltanto BHB-Phe, ma non i singoli Phe o BHB avevano alcun effetto sia su FI che BW (fig. 6I). Allo stesso modo, né un altro metabolita correlato strutturalmente a BHB-Phe come BHB-Lys, né i dipeptidi Phe-Phe o Leu-Leu influenzavano FI o BW (fig. 6 J,K). A questo punto, gli autori hanno testato, su topi obesi DIO, anche l'effetto di altri BHB-AA la cui sintesi era dipendente da CNDP2 (vedi fig.3), come BHB-Met e i due amminoacidi a catena ramificata (BCAA) BHB-Leu e BHB-Val. Come mostrato in fig. 6L, ognuno dei tre BHB-AA diminuivano sia il FI che il BW; questi dati dimostravano quindi che tutti i BHB-AA prodotti da CNDP2 avevano effetti anoressigenici, mentre i BHB coniugati ad altri AA essenziali, come BHB-Lys erano inefficaci (vedi fig. 6J,K).

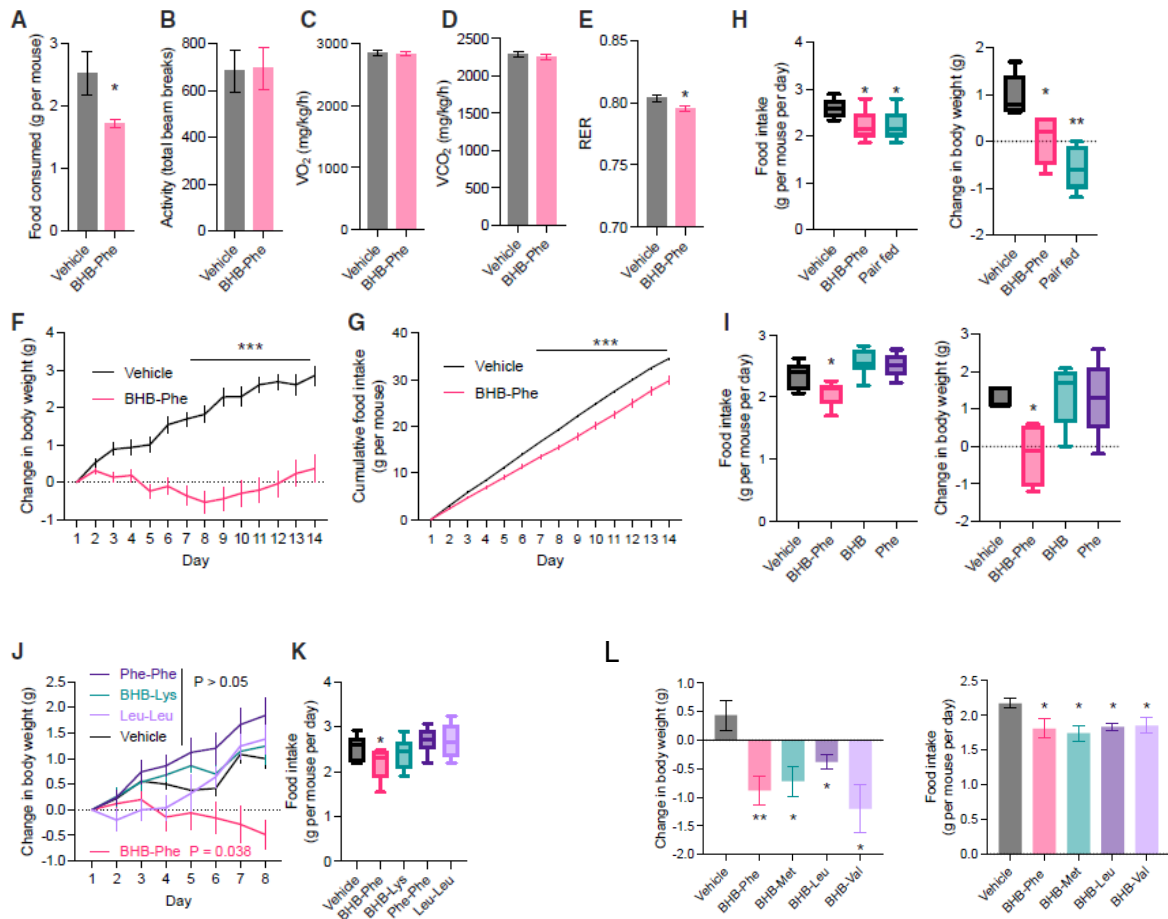


Fig.6 Effetto di BHB-Phe e altri metaboliti su FI e BW

Su questa base, è stata quindi indagato in maniera più approfondita il ruolo di CNBP2 nel bilancio energetico e la sua regolazione nutrizionale; gli autori avevano infatti già osservato in un precedente lavoro che gli animali CNBP2-KO sottoposti soltanto a dieta high-fat (HFD) per 8 settimane mostravano un BW e FI simile a quello dei topi wild-type (WT), e ciò faceva ipotizzare che il fenotipo metabolico della deficienza da CNBP2 si manifestasse solo in seguito ad opportuni stimoli fisiologici/farmacologici che ne aumentassero il lattato disponibile per la formazione di Lac-Phe; infatti, dopo esercizio fisico o somministrazione di metformina, la differenza di peso e FI tra i due ceppi diventava evidente (Li VL et al. Nature. 2022;606). Su questa base, dato il contesto nutrizionale della sintesi di BHB-Phe, gli autori hanno quindi sottoposto topi WT e CNBP2-KO, resi obesi da HFD, a due diversi stimoli nutrizionali; topi alimentati con dieta HFD (60% grassi, 20% proteine e 20% carboidrati) e sottoposti a gavage da esteri chetonici (KE) (3 g/kg/dd), e topi alimentati con dieta chetogenica (80% grassi, 15% proteine e 5 % carboidrati). I risultati hanno mostrato che dopo 12 giorni di trattamento, KE induceva perdita di peso e diminuzione di FI negli animali WT rispetto ai valori iniziali, che era invece assente nei topi KO (fig.7 L,M); allo stesso modo, al termine del periodo

di dieta chetogenica, gli animali KO guadagnavano più peso e assumevano più cibo rispetto ai WT (fig.7 F).

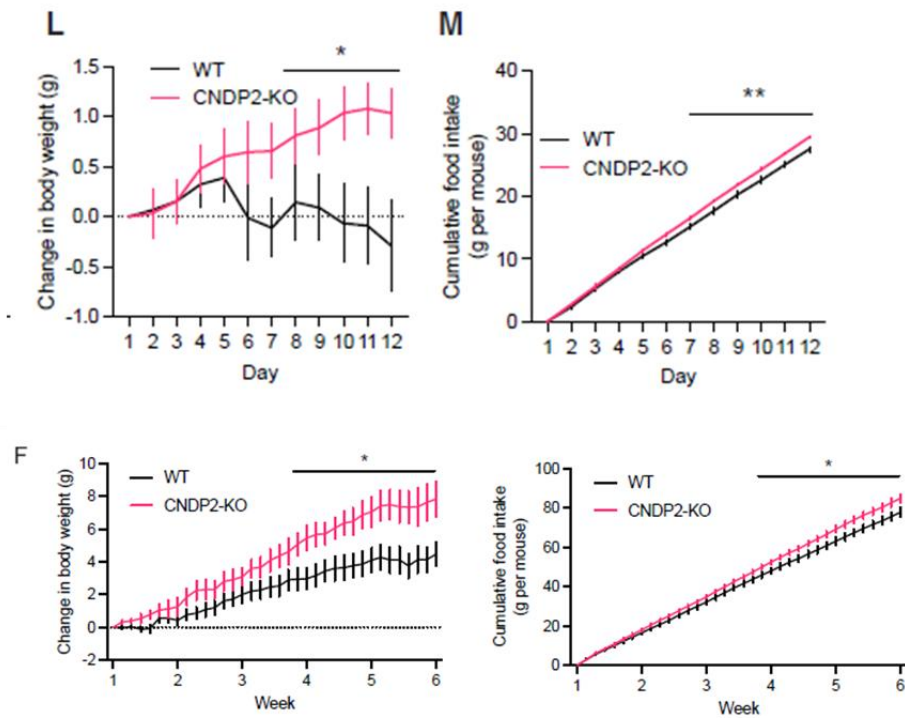


Fig.7 Effetto di dieta chetogenica o gavage con KE in topi WT e CNDP2KO

Questi risultati dimostravano quindi che l'attività di CNDP2 dipende fortemente dagli stimoli fisiologici/nutrizionali a cui è sottoposto. A questo punto, utilizzando diversi approcci genetici e farmacologici, gli autori hanno approfondito il meccanismo di soppressione del FI da parte di BHB-Phe, analizzando le tre vie di segnalazione maggiormente coinvolte nella regolazione centrale dell'assunzione di cibo: melanocortina ipotalamica, recettore per il glucagon-like peptide-1 (GLP-1R), o brainstem GDNF family receptor alpha-like (GFRAL). L'effetto di BHB-Phe su FI e BW era simile sia negli animali WT che in quelli KO per il recettore della melanocortina 4 (MC4R) (fig.8 A,B) e exendin 1 (antagonista di GLP-1R) bloccava l'effetto anoressizzante e anti-obesità di GLP-1 ma non quello di BHB-Phe (fig.8 C-F); inoltre, anche un anticorpo anti-GFRAL era inefficace nei confronti dell'effetto di BHB-Phe su FI e BW, mentre inibiva quello del GDF15 ricombinante sugli stessi parametri (fig.8 G-I).

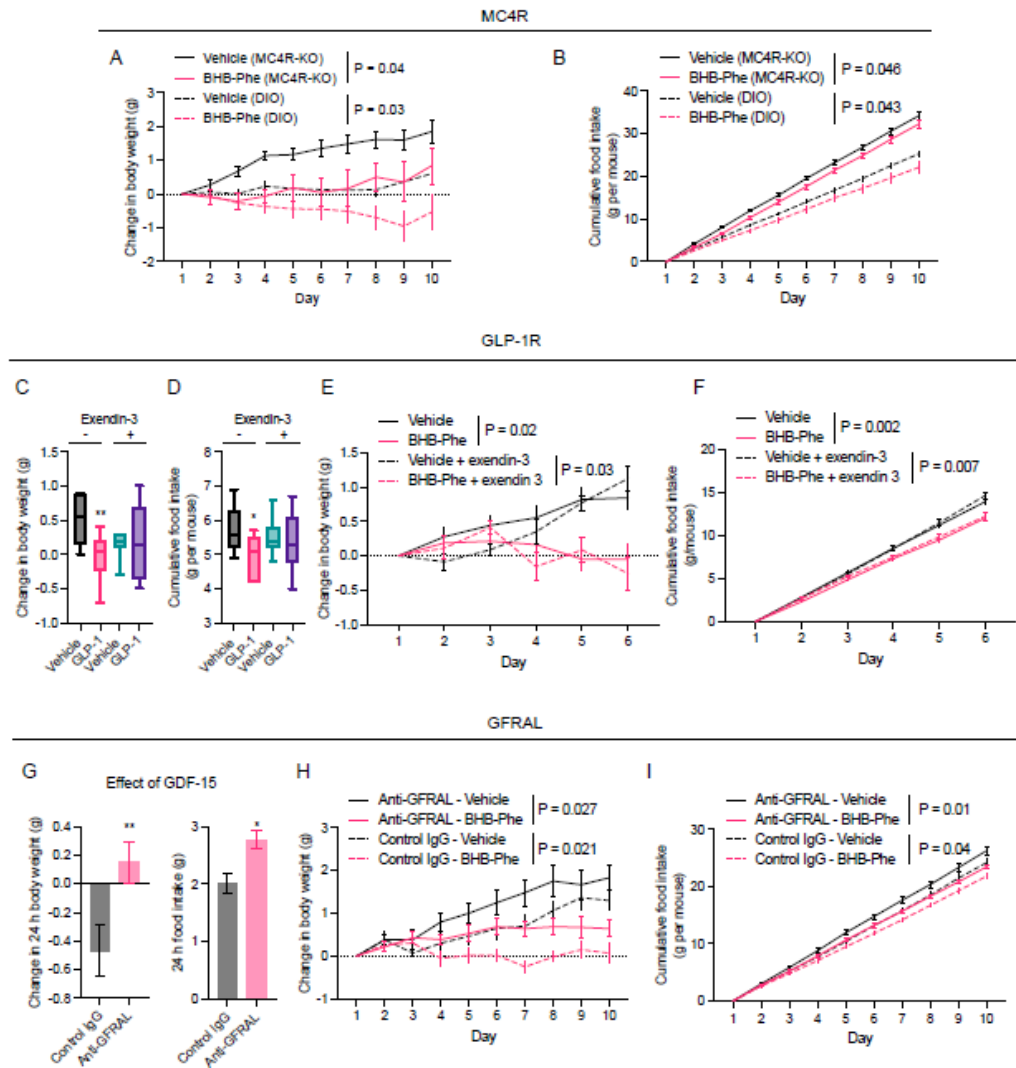


Fig.8 Analisi del ruolo di diversi regolatori centrali del FI nell'effetto di BHB-Phe

Per identificare quindi le regioni neuronali coinvolte nell'azione di BHB-Phe, gli autori hanno utilizzato la tecnologia targeted recombination in active populations (TRAP); brevemente, questa tecnica utilizza ceppi di topi che esprimono la ricombinasi CRE (attivata da tamossifene - TX) sotto il controllo di geni altamente attivi nel SNC (es. il gene Fos); dopo somministrazione di TX, le cellule attivate dallo stimolo (ma non quelle inattive) subiranno ricombinazione ed esprimeranno un reporter (nel caso tdTomato) o il gene endogeno. In questo lavoro, i topi TRAP2, esprimenti il reporter (TRAP2/Rosa26-LSL-tdTomato) venivano prima trattati con BHB-Phe e poi con TX per indurre ricombinazione; 2 settimane dopo, gli stessi animali ricevevano anche Lac-Phe e venivano sacrificati e sottoposti ad immunohistochemica per c-Fos (fig.9A); in questo modo, venivano identificati sia i neuroni attivati da BHB-Phe (marcati da tdTomato), sia da Lac-Phe (c-Fos positivi). L'esperimento ha mostrato che, rispetto al veicolo, BHB-Phe e Lac-Phe attivavano molteplici regioni come il nucleo ipotalamico paraventricolare (PVC), dorsomediale (DMH) e ventromediale (VMH), nucleo

sopra-chiasmatico (SCN), il nucleo arcuato dell'ipotalamo (ARH), l'ipotalamo laterale (LH), il nucleo parabrachiale laterale e il nucleo del tratto solitario (NTS) (fig.9D); da notare che soltanto una piccola frazione di neuroni veniva attivata da entrambi gli stimoli (rivelata dalla doppia marcatura TRAP+ c-Fos +), mentre la maggior parte delle popolazioni neuronali mostrava una attivazione separata per BHB-Phe o Lac-Phe (fig.9B,C).

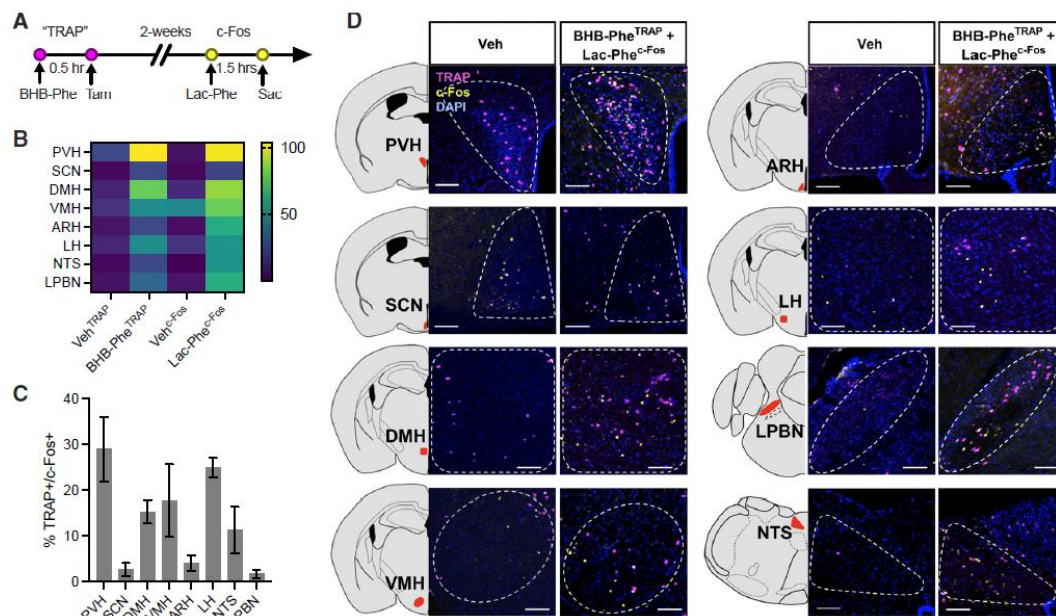


Fig.9 Analisi delle popolazioni neuronali coinvolte nell'effetto di soppressione del FI da parte di BHB-Phe e Lac-Phe

Gli autori quindi concludono che la somministrazione di BHB-Phe attiva numerose aree ipotalamiche e del tronco encefalico implicate nel comportamento alimentare distinta da quelle attivate da Lac-Phe. Infine, gli autori hanno verificato se l'attività di CNDP2 di coniugazione con BHB fosse presente nell'uomo; a tale scopo, sono state prima identificate tre linee cellulari umane che esprimevano hCNDP2 (macrofagi U937, Caco-2 – cellule intestinali e PANC-1 – linea pancreatic), nelle quali l'enzima è stato poi silenziato tramite CRISPR-Cas9, e ciò risultava in una quasi completa eliminazione dell'attività di sintesi di BHB-Phe in ognuna delle linee in esame (fig.10 C). Inoltre, sono stati anche misurati i livelli plasmatici di diversi BHB-AA in volontari sani dopo ingestione di un supplemento a base di KE. I risultati hanno mostrato che, 1 ora dopo la supplementazione, i livelli plasmatici di BHB, BHB-Phe, BHB-Leu, BHB-Val, and BHB-Met, ma non quelli di Phe, Lac-Phe o lattato erano significativamente aumentati (fig.10 F,G), dimostrando che l'attività di CNDP2 e la produzione di BHB-AA è conservata anche nella specie umana.

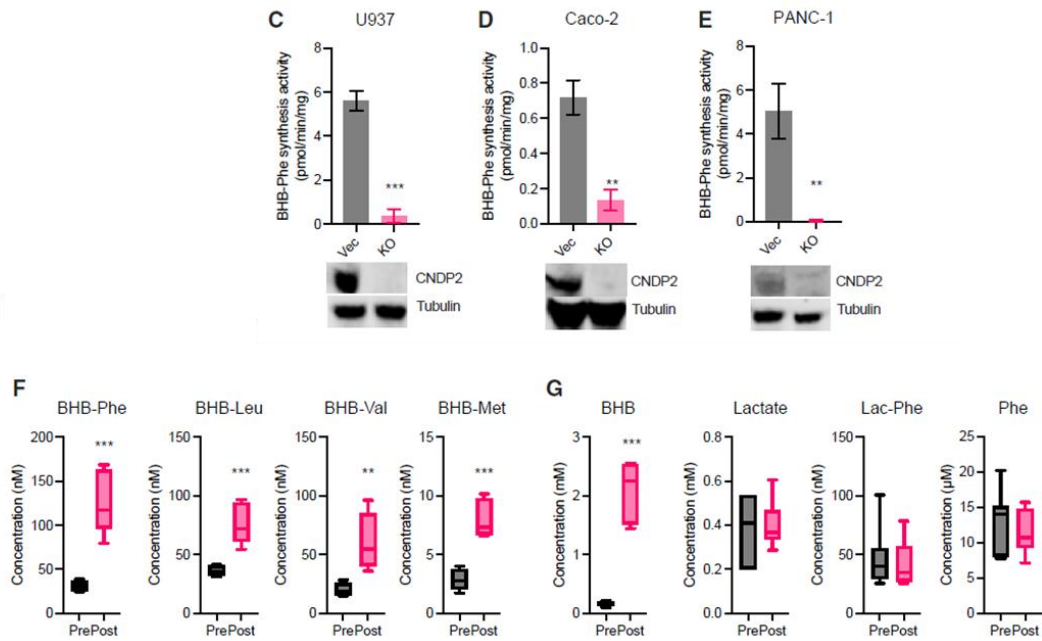


Fig.10 Livelli di BHB-Phe in linee cellulari umane WT e CNDP2KO, e concentrazioni plasmatiche di BHB-AA, lattato, Lac-Phe o Phe in plasma di volontari umani

Commenti

Il pathway metabolico dei corpi chetonici è stato finora ben caratterizzato come una canonica e diretta via di sintesi (epatica) – catabolismo (extraepatico), attivata in seguito a diete low-carb/elevato apporto proteico/lipidico o durante il digiuno fisiologico; in questo lavoro, gli autori dimostrano invece che l'enzima CNDP2 controlla uno “shunt” metabolico secondario della via chetogenica, producendo aminoacidi coniugati al BHB, tra i quali il più abbondante (BHB-Phe) è analogo strutturalmente e funzionalmente al Lac-Phe, derivato a sua volta dalla coniugazione con lattato, prodotto da esercizio fisico e metformina, e in grado di ridurre FI e BW (Li VL, et al. An exercise-inducible metabolite that suppresses feeding and obesity. *Nature*. 2022;606). Ciò suggerisce che, allo stesso modo di sensori metabolici come AMPK e mTOR che, in risposta allo status energetico (livelli intracellulari di molecole segnale) attivano l'opportuna risposta cellulare, CNDP2 agisca invece come sensore di “flussi” metabolici, attivato in risposta ad aumenti del flusso glicolitico o chetogenico, coniugando il prodotto finale a specifici AA (anche Leu, Val e Met, oltre alla già citata Phe), producendo molecole metabolicamente attive. Da notare che il pathway è operativo, almeno *in vitro*, anche in tipi cellulari non noti per essere chetogenici, (macrofagi, intestino e pancreas) sottolineando così l'esistenza di un meccanismo più ampio. In questo contesto, è di grande importanza anche rimarcare il ruolo degli AA; è noto come anche gli AA ed in particolare quelli essenziali (EAAs), oltre

al loro ruolo canonico di precursori della sintesi proteica, siano ormai noti per svolgere funzioni eterogenee, come singoli substrati energetici del ciclo di Krebs, signaling intracellulare, ligandi e regolatori centrali del FI e del comportamento. La specifica coniugazione del lattato e di BHB, da parte di CNBP2, con EAAs (Phe, Leu, Val e Met) amplia ulteriormente il campo di azione degli EAAs. E' già nota, ad esempio, l'interazione di specifici EAA a catena ramificata (BCAAs) con il metabolismo lipidico, risultante nella formazione di Monomethyl branched chain fatty acids (mmBCFA), anche essi metabolicamente attivi e in grado di prevenire steatosi epatica quando prodotti in risposta a diete ad alto contenuto proteico. In più, mmBCFA aumentano in risposta alla termogenesi nel tessuto adiposo bruno e sono negativamente correlati con il BW in pazienti obesi. Questo lavoro conferma quindi la loro natura di molecole dotate di grande versatilità, la loro capacità di *cross-talk* anche con altre vie metaboliche (glicolisi e chetogenesi), e la loro importanza anche come regolatori del bilancio energetico, interagendo con i principali pathways metabolici.

Dal punto di vista traslazionale, vista la grande varietà di contesti di impiego della chetosi, come patologie neurovegetative, muscolari o infiammatorie, la supplementazione con EAA potrebbe quindi aumentare l'efficienza delle diete chetogeniche/supplementi chetonici anche in tali contesti. In questo lavoro, i livelli di BHB-Phe o degli altri BHB-AA aumentano in risposta ad aumenti di BHB (prodotti da dieta chetogenica o KE), suggerendo che CNBP2 agisca tramite un semplice meccanismo di sintesi in risposta ad aumento del substrato; se i livelli di BHB-Phe, Lac-Phe o degli altri BHB-AA aumentino anche in risposta alla supplementazione/arricchimento dietetico di EAAs rimane da determinare e potrebbe essere interessante da esaminare in futuri studi.

Ulteriori letture:

Li VL, He Y, Contrepois K, et al. An exercise-inducible metabolite that suppresses feeding and obesity. *Nature*. 2022;606(7915):785-790.

Jansen RS, Addie R, Merks R, et al. N-lactoyl-amino acids are ubiquitous metabolites that originate from CNBP2-mediated reverse proteolysis of lactate and amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015;112(21):6601-6606.

Garcia Caraballo SC, Comhair TM, Houten SM, Dejong CH, Lamers WH, Koehler SE. High-protein diets prevent steatosis and induce hepatic accumulation of monomethyl branched-chain fatty acids. *J Nutr Biochem*. 2014;25(12):1263-1274.

Yoneshiro T, Wang Q, Tajima K, et al. BCAA catabolism in brown fat controls energy homeostasis through SLC25A44. *Nature*. 2019;572(7771):614-619.

Mika A, Stepnowski P, Kaska L, et al. A comprehensive study of serum odd- and branched-chain fatty acids in patients with excess weight. *Obesity (Silver Spring)*. 2016;24(8):1669-1676.