

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PERUGIA



DIPARTIMENTO DI CHIMICA, BIOLOGIA E BIOTECNOLOGIE

Corso di Laurea in Biotecnologie

PROVA FINALE

***LIPIDI CON CATENE DISPARI: STUDIO METABOLOMICO
IN CELLULE TUMORALI TRAMITE LC/MS***

RELATORE

Dott. Roberto Maria Pellegrino

LAUREANDO

Gaia Patasce

Anno Accademico 2020/2021

INDICE

1. Lipidomica	4
1.1. Classificazione, nomenclatura e struttura dei lipidi.....	5
a. Classificazione	5
b. Nomenclatura.....	6
c. Struttura.....	8
1.2. Analisi del profilo lipidico tramite LC/MS.....	9
a. Cromatografia liquida	9
b. Spettrometria di massa.....	10
1.3. <i>Tools</i> bioinformatici come approccio alla lipidomica	12
2. Pathways biosintetici dei lipidi	13
2.1. Lipidi con catene a numero dispari di atomi di carbonio	14
a. OCFAs	14
b. mmBCFAs	15
3. Metabolismo lipidico e cancro	18
a. Lipogenesi.....	19
b. Lipidi saturi ed insaturi.....	20
c. Stress metabolico	21
3.1. Cellule tumorali LNCaP	23
3.2. Lipidi dispari in cellule tumorali.....	24
4. Obiettivi	26
5. Materiali e metodi	28
5.1. Prodotti chimici e strumentazione	28
5.2. Colture cellulari	29
5.3. Estrazione lipidica.....	30

5.4.	Elaborazione della matrice dati.....	31
5.5.	Analisi statistica	32
6.	Risultati.....	33
6.1.	Ricerca di eventuali <i>outlier</i>	33
6.2.	Profilo lipidico del terreno RPMI addizionato di FBS	35
6.3.	Profilo lipidico delle cellule tumorali LNCaP	36
6.4.	Lunghezza delle catene lipidiche nel terreno RPMI addizionato di FBS ...	37
6.5.	Lunghezza delle catene lipidiche nelle cellule tumorali LNCaP.....	38
6.6.	Lunghezza delle catene lipidiche PC nelle cellule LNCaP e nel terreno ...	39
6.7.	Lunghezza delle catene lipidiche PE nelle cellule LNCaP e nel terreno....	41
6.8.	Studio della correlazione tra lipidi cellulari e del terreno.....	43
7.	Conclusioni	45
	Bibliografia.....	47

1. Lipidomica

La lipidomica può essere definita come l'identificazione quantitativa di tutti i lipidi presenti in un tipo di organismo, tessuto, fluido o cellula. I lipidi stessi vengono descritti come piccole molecole idrofobiche (o anfipatiche) che possono originarsi, in tutto o in parte, da condensazioni a base di carbanioni di tioesteri (es. acili grassi) e/o da condensazioni a base di carbocationi di unità isopreniche (es. prenoli, steroli) (H. Alex Brown et al., 2009).

I lipidi sono molecole fondamentali per il mantenimento del corretto equilibrio fisiologico. L'errata regolazione del metabolismo lipidico, che può essere causata da un'alterazione nell'attività enzimatica, induce l'insorgenza di patologie quali il cancro, diabete, malattie infettive e neurodegenerative. Nonostante ciò, il quantitativo di dati forniti dalla genomica, trascrittomica e proteomica non è stato accompagnato da un analogo avanzamento nel mondo dei lipidi.

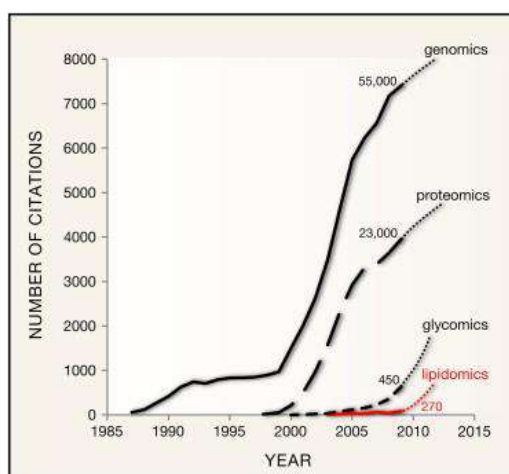


Fig. 1 - La lipidomica è un campo emergente. Probabilmente è stata la mancanza di un'adeguata strumentazione a svantaggiare la lipidomica rispetto le altre scienze omiche (Markus R. Wenk, 2010).

L'ideazione di approcci analitici quali la cromatografia liquida accoppiata alla spettrometria di massa (LC/MS) insieme alla possibilità di interfacciare questi sistemi con *tools* bioinformatici, rendono la lipidomica un'area promettente per la ricerca biomedica, con una varietà di applicazioni nello sviluppo di biomarkers e farmaci (Markus R. Wenk, 2005).

1.1. Classificazione, nomenclatura e struttura dei lipidi

a. Classificazione

I lipidi sono un gruppo vario e composto di molecole che svolgono numerose funzioni biologiche: strutturali (componenti delle membrane cellulari), fonti d'energia e segnalazione. I molteplici processi in cui sono coinvolti si riflettono nella diversità delle loro strutture. Questo livello di complessità delle molecole lipidiche rende essenziale lo sviluppo di un sistema esaustivo di classificazione. Dal 2005 LIPID MAPS ha fornito una categorizzazione dei lipidi basata su principi biochimici, utilizzando un framework estensibile. Per comprendere la vastità delle molecole lipidiche, queste vengono scomposte in *building blocks*. Il sistema di classificazione adottato da LIPID MAPS si basa su due blocchi biosintetici fondamentali: *Ketoacyl* e *Isoprene*.

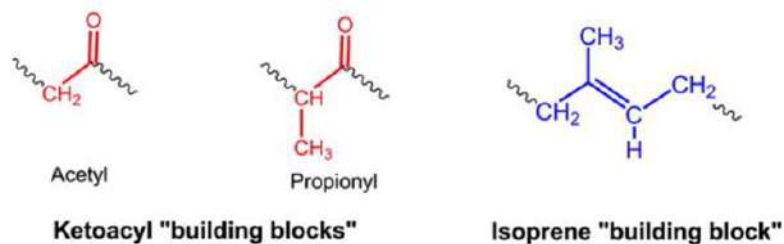


Fig. 2 - Building blocks dei lipidi. Il gruppo *Ketoacyl* e *Isoprene* sono i due blocchi che utilizza LIPID MAPS per classificare i lipidi (Eoin Fahy et al., 2011).

Basandosi su questo sistema di classificazione, i lipidi vengono divisi in otto categorie: acili grassi (FA), glicerolipidi (GL), glicerofosfolipidi (GP), sfingolipidi (SP), saccarolipidi (SL), policheti (PK), lipidi prenolici (PR) e steroli (ST). La categoria degli acidi grassi (Fatty Acid, FA) comprende anche loro varianti come alcoli, aldeidi, ammine ed esteri. Le strutture lipidiche con il glicerolo sono rappresentate da due categorie: glicerolipidi (GL) e glicerofosfolipidi (GP). Questi sono caratterizzati dalla presenza di un gruppo fosfato esterificato ad uno dei gruppi idrossilici del glicerolo. I lipidi prenolici (PR) e steroli (ST) condividono lo stesso pathway biosintetico, ma differiscono per struttura e funzione. Un'altra categoria ben definita è quella degli sfingolipidi (SP), caratterizzati da una base azotata a lunga

catena come core strutturale. I saccarolipidi (SL) presentano il gruppo acilico grasso nel legame glicosidico. Infine, i policheti (PK) sono diversi gruppi di metaboliti che provengono da animali, piante e microrganismi (Eoin Fahy et al., 2011).

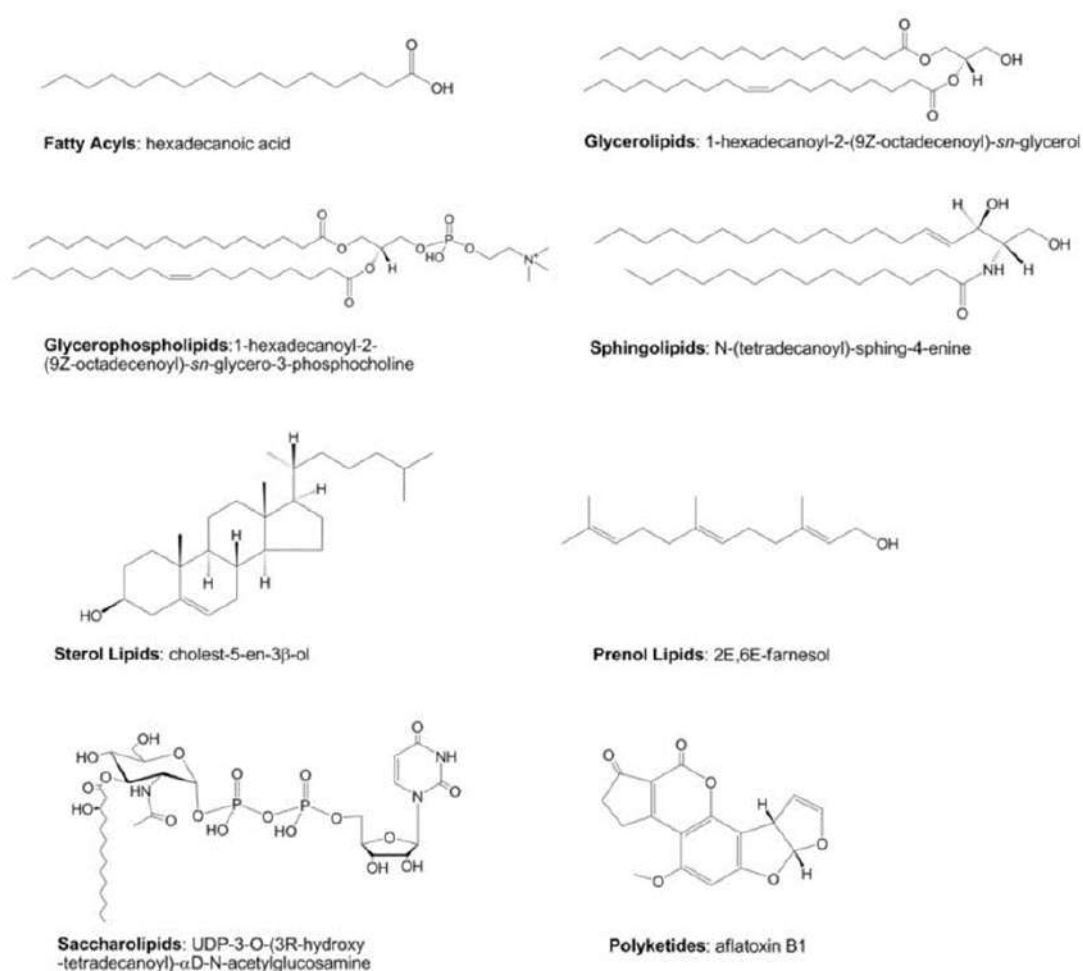


Fig. 3 – Esempi di classi lipidiche. Strutture che rappresentano le otto categorie lipidiche individuate da LIPID MAPS (Eoin Fahy et al., 2011).

b. Nomenclatura

Per l'archiviazione e comunicazione dei dati è fondamentale utilizzare un sistema completo e standardizzato. La nomenclatura adottata da LIPID MAPS segue le linee guida definite dalla IUPAC-IUBMB. Il lipide è annotato in forma abbreviata per garantirne l'immediata identificazione. Le designazioni E/Z definiscono la geometria del doppio legame, R/S la stereochimica delle molecole. La numerazione specifica (*sn*) si riferisce ai glicerolipidi e glicerofosfolipidi. Il glicerolo è solitamente acilato

o alchilato in posizione *sn1* e/o *sn2*. Le strutture delle catene laterali dei glicerofosfolipidi sono indicate tra parentesi, nel formato “*Headgroup (sn1/sn2)*”. Le abbreviazioni dei gliceroli (MG, DG, TG) si riferiscono alle specie con una, due e tre catene laterali indicate nel formato “*Headgroup (sn1/sn2/sn3)*”. Il legame etere alchilico è indicato con il prefisso “O-” (Eoin Fahy et al., 2005).

Glicerofosfolipidi:

Class	Abbreviation	Examples
Glycerophosphocholines	PC (LPC for lyso species)	PC(P-16:0/18:2(9Z,12Z))
Glycerophosphoethanolamines	PE (LPE for lyso species)	PE(O-16:0/20:4(5Z,8Z,11Z,14Z))
Glycerophosphoserines	PS (LPS for lyso species)	PS(16:0/18:1(9Z))
Glycerophosphoglycerols	PG (LPG for lyso species)	-
Glycerophosphates	PA (LPA for lyso species)	PA(16:0/0:0) or LPA(16:0)
Glycerophosphoinositols	PI (LPI for lyso species)	PI(18:0/18:0)
Glycerophosphoinositol monophosphates	PIP	-
Glycerophosphoinositol bis-phosphates	PIP2	-
Glycerophosphoinositol tris-phosphates	PIP3	-
Glycerophosphoglycerophosphoglycerols (Cardiolipins)	CL	CL(1'-[16:0/18:1(11Z)],3'-[16:0/18:1(11Z)])
Glycerophosphoglycerophosphates	PGP	-
Glyceropyrophosphates	PPA	-
CDP-glycerols	CDP-DG	-
Glycosylglycerophospholipids	[glycan]-GP	-
Glycerophosphoinositolglycans	[glycan]-PI	-
Glycerophosphonocholines	PnC	-
Glycerophosphonoethanolamines	PnE	-

Glicerolipidi:

Class	Abbreviation	Examples
Monoradylglycerolipids	MG	MG(16:0/0:0/0:0)
Diradylglycerolipids	DG	DG(16:0/18:1(9Z)/0:0)
Triradylglycerolipids	TG	TG(16:0/18:1(9Z)/16:0)

Sfingolipidi:

Class	Abbreviation	Examples
Ceramides	Cer	Cer(d18:1/16:0)
Sphingomyelins	SM	SM(d18:1/24:1(15Z))
Glycosphingolipids	[glycan]-Cer	NeuAc α 2-3Gal β 1-4Glc β -Cer(d18:1/16:0)

Fig. 4 - Nomenclatura adottata da LIPID MAPS. Le tabelle riportano: classe lipidica, abbreviazione ed esempio (The LIPID MAPS Lipidomics Gateway, <https://www.lipidmaps.org/>).

c. Struttura

La diversità nelle strutture lipidiche è data da molteplici fattori: lunghezza delle catene, trasformazioni biochimiche ossidative, riduttive, sostitutive, di formazione di anelli nonché di modificazioni con residui di zucchero ed altri gruppi funzionali.

I lipidi stimati sono nell'ordine dei 200.000. In realtà i prodotti naturali conosciuti sono di più, per la maggior parte d'origine prenolica o polichetidica.

Sono numerose le risorse online disponibili per consultare database di strutture lipidiche ed ottenere informazioni spettrali e biochimiche. Il database LIPIDAT si focalizza sulle proprietà biofisiche di glicerofosfolipidi, glicerolipidi e sfingolipidi; contiene più di 12.000 strutture molecolari. Il database LipidBank presenta più di 7.000 strutture di varie classi lipidiche ed è una ricca risorsa per l'associazione di dati spettrali, proprietà biologiche e riferimenti letterali.

LIPID MAPS ha stabilito le linee guida per garantire una chiara e coerente rappresentazione dei lipidi. Molte classi lipidiche si prestano bene per il disegno automatizzato, grazie al loro layout bidimensionale. È stata sviluppata ed implementata una suite di *tools* per il disegno che consente la generazione di strutture, nomi sistematici ed abbreviazioni (Eoin Fahy et al., 2009).

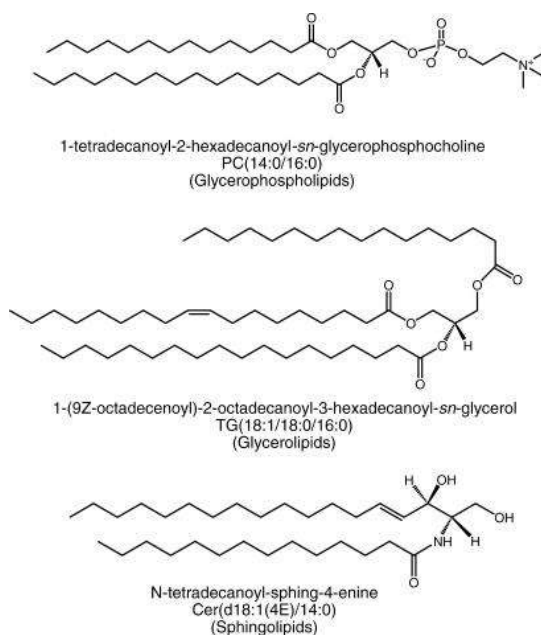


Fig. 5 - Esempi di strutture lipidiche. Le tre illustrazioni permettono di apprezzare la relazione stereochimica tra glicerofosfolipidi, glicerolipidi e sfingolipidi (Eoin Fahy et al., 2009).

1.2. Analisi del profilo lipidico tramite LC/MS

La cromatografia liquida-spettrometria di massa (LC/MS) è una tecnica che può essere applicata ad una vasta gamma di molecole biologiche. La spettrometria di massa è interfacciata con le tecniche cromatografiche in quanto fornisce un'elevata specificità di rilevazione dei dati. Grazie alla spettrometria di massa tandem (MS/MS) e alla presenza di standard interni di isotopi stabili, i risultati forniti sono sensibili ed accurati (James J. Pitt, 2009).

La cromatografia liquida utilizza una fase stazionaria idrofobica per separare le molecole lipidiche, la spettrometria di massa opera ionizzando l'analita e misurandone il rapporto massa/carica (m/z).

a. Cromatografia liquida

La cromatografia liquida è una tecnica che permette la separazione dei componenti di una miscela grazie alla loro diversa distribuzione tra due fasi: stazionaria e mobile. La fase stazionaria è impaccata nella colonna cromatografica, la fase mobile eluisce attraverso. La composizione delle fasi stazionarie dipende dalle caratteristiche chimico-fisiche del campione in esame. Per l'analisi dei lipidi si utilizzano quattro solventi: Acqua, Acetonitrile, Metanolo e Isopropanolo. Questi sono immessi nella miscela a composizione variabile durante una corsa cromatografica, in modo da creare un gradiente di polarità (da maggiore a minore). La fase stazionaria è apolare e permette ai lipidi di stabilire delle interazioni. Durante il processo cromatografico l'aumento della concentrazione dei solventi maggiormente apolari rispetto l'acqua, compete con la fase stazionaria e facilita la mobilità dei lipidi all'interno della colonna. Ad uscire per primi dalla colonna sono i lipidi che non hanno interagito con la fase stazionaria, successivamente i lipidi che si sono legati debolmente ed infine quelli che hanno stabilito le interazioni più forti. Dunque, i diversi tempi di eluizione dei lipidi dalla colonna cromatografica dipendono dalle loro caratteristiche biochimiche.

b. Spettrometria di massa

Lo spettrometro di massa è uno strumento che fornisce informazioni sia qualitative (struttura) che quantitative (concentrazione) sull'analita ionizzato. I componenti di uno spettrometro di massa sono: la sorgente di ioni, l'analizzatore, il rilevatore e il sistema di elaborazione dei dati. La sorgente ESI (*Electro Spray Ionization*) è la più usata in campo lipidomico. L'ESI si avvale del potenziale elettrico per trasferire o sottrarre gli ioni H⁺ agli analiti. All'uscita della colonna gli analiti vengono trasferiti nella sorgente dove il liquido viene trasformato in uno spray. Quest'ultimo è focalizzato tramite l'applicazione di un gas coassiale. Lo spray si genera a partire dal cono di Taylor, una struttura che si forma per la tensione superficiale dei liquidi. Con lo spray si creano delle goccioline cariche che vengono desolvatate dal gas prima di raggiungere l'analizzatore. Tramite l'alta temperatura ed un flusso di gas essiccante, le goccioline cariche evaporano. L'aumento della densità di carica superficiale e l'accorciamento del raggio causano l'esplosione Columbica: gli ioni sulla superficie delle goccioline sono espulsi nella fase gassosa (CS Ho et al., 2003). Gli ioni pseudomolecolari che si sono generati vengono inviati all'analizzatore. In questo studio si utilizza uno spettrometro di massa tandem Q-TOF (Quadrupolo-TOF). Il Q-TOF combina i vantaggi di due diversi analizzatori: l'elevata efficienza di frammentazione del quadrupolo con l'alta accuratezza e risoluzione del TOF (Darren R. Allen, 2019). Il quadrupolo è costituito da quattro barre parallele ed applica campi elettro-magnetici per separare gli ioni in base al loro rapporto massa/carica (m/z) e alla diversa traiettoria che percorrono. Il TOF (*Time of Flight*) accelera contemporaneamente tutti gli ioni e li separa in base alla loro massa. I primi ioni che interagiscono con il rilevatore sono i più leggeri. Il rilevatore è un elettro-moltiplicatore: quando lo ione cade sulla superficie, causa l'espulsione di numerosi elettroni e viene amplificato il segnale elettrico. L'output generato dallo spettrometro di massa è uno spettro che può essere di due tipi: di MS o di MS/MS. Il primo è lo spettro di massa (MS), caratterizzato dalla massa dello ione e il suo pattern isotopico. Questo tipo di spettro si ottiene con il quadrupolo spento. Lo spettro di massa/massa

(MS/MS) si costruisce grazie all'attivazione del quadrupolo e si basa sulla misura dei frammenti che derivano dalla rottura della particella.

L'accuratezza della misura è calcolata in ppm:

$$\text{ppm} = \frac{m(\text{misurata}) - m(\text{teorica})}{m(\text{teorica})} 10^6$$

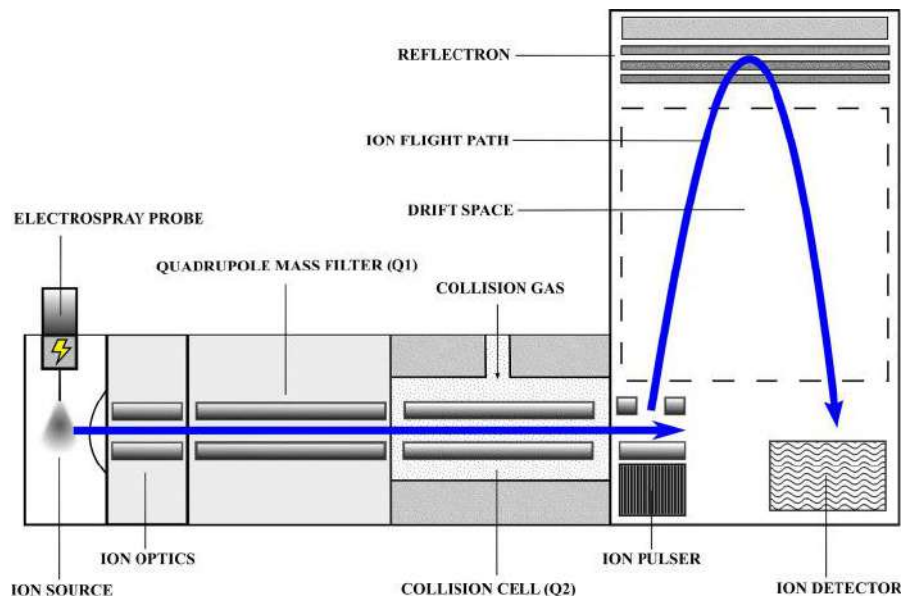


Fig. 6 - Rappresentazione schematica di uno spettrometro Q-TOF. Da sinistra a destra: la sorgente di ioni (ESI), l'analizzatore (Q-TOF) ed il rilevatore (Darren R. Allen, 2019).

1.3. *Tools* bioinformatici come approccio alla lipidomica

In un singolo esperimento di lipidomica svolto tramite LC/MS possono essere prodotti fino a diverse centinaia di spettri di massa. Ciò rende indispensabile un forte supporto computazionale per elaborare la mole di dati prodotti. Sorge l'esigenza di stabilire metodi che siano pratici e che garantiscano l'alta qualità delle analisi. La bioinformatica deve gestire i dati sperimentali su diversi livelli: classificazione, progettazione di database relazionali e ontologie, acquisizione automatizzata e gestione efficiente dei dati, sviluppo di strumenti di ricerca, visualizzazione dei risultati ed integrazione di questi in mappe interattive (Eoin Fahy et al., 2007).

Insieme alle proteine ed acidi nucleici, i lipidi sono integrati nei pathways biochimici che portano a fenotipi come l'omeostasi, differenziazione e morte cellulare. La caratterizzazione dei sistemi viventi deve necessariamente includere i lipidi insieme alle altre macromolecole. Ora la biologia dei sistemi estende il suo campo di applicazione all'identificazione di network biosintetici, metabolici, trascrizionali, epigenetici e di segnalazione cellulare che includono esplicitamente i lipidi (Shankar Subramaniam et al., 2012).

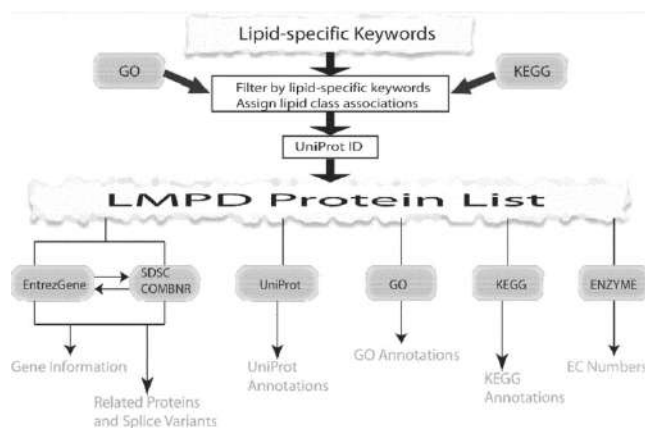


Fig. 7 – Risorse bioinformatiche. LIPID MAPS Proteome Database (LMPD) è un database relazionale di sequenze geniche ed annotazioni proteiche associate ai lipidi. LMPD contiene fino a 8.500 geni e 12.500 proteine da *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Rattus norvegicus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Caenorhabditis elegans*, *Escherichia coli*, *Macaca mulata*, *Drosophila melanogaster*, *Arabidopsis thaliana* e *Danio rerio* (Dawn Cotter et al., 2006).

2. Pathways biosintetici dei lipidi

Tutti gli organismi utilizzano lipidi. Questi possono essere ricavati dall'ambiente oppure biosintetizzati *de novo*. La struttura dei lipidi può essere considerata l'assemblamento di *building blocks* quali ad esempio acidi grassi, glicerolo, gruppi fosfato, colina, serina, etanolamina, ecc. I lipidi hanno un peso molecolare compreso tra circa 200-1800. La sintesi degli acidi grassi parte sempre da molecole a più basso peso molecolare. La biosintesi inizia con la carbossilazione dell'*Acetyl-CoA* che produce i blocchi costitutivi del *Malonyl-CoA*. Seguono delle reazioni iterative di condensazione, riduzione e disidratazione fino a quando la catena degli acidi grassi non matura alla lunghezza necessaria alla cellula. Nei batteri, piante ed alghe gli enzimi che catalizzano questo ciclo di reazioni sono proteine discrete: *Fatty Acids Synthase II*. Gli eucarioti non vegetali utilizzano l'enzima *Fatty Acids Synthase I*, la cui funzionalità è data dalla presenza di multidomini (Joris Beld et al., 2015).

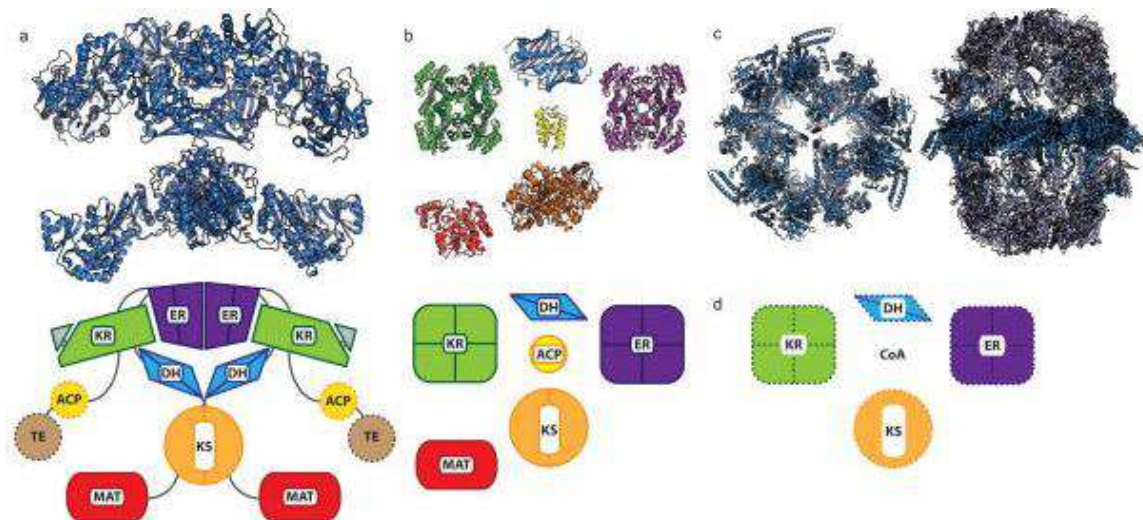


Fig. 8 - Confronto di *Fatty Acids Synthase* in: a) mammiferi (*type I*), b) batteri (*type II*), c) funghi (*type I*) e d) archea (*type II-like*). *Fatty Acids Synthase I* e *II* presentano: *Acyl Carrier protein*, *Ketoacyl Synthase*, *Ketoacyl ACP Reductase*, *Dehydratase*, *Enoyl ACP Reductase* (Joris Beld et al., 2015).

2.1. Lipidi con catene a numero dispari di atomi di carbonio

In natura esistono due tipologie di lipidi a catene dispari: quelli lineari (*Odd-Chain Fatty Acids*) e quelli ramificati (*branched*). Nei mammiferi l'enzima *Fatty Acids Synthase* genera prevalentemente acidi grassi a catena pari. Tuttavia nei mammiferi sono presenti anche acidi grassi a catene dispari, sia *Odd-Chain Fatty Acids* (OCFAs) che *monomethyl Branched-Chain Fatty Acids* (mmBCFAs). Si suppone che essi derivino in gran parte dalla dieta, in quanto prodotti dal microbioma del ruminante ed immagazzinati a livello adiposo (Benjamin J. Jenkins et al., 2017).

a. OCFAs

I lipidi OCFAs sono biosintetizzati principalmente dai microrganismi a partire dal *Propionyl-CoA*. La condensazione del *Propionyl-CoA* e *Malonyl-CoA* porta alla formazione del *3-Oxovaleryl-ACP*, punto di partenza per la sintesi di acidi grassi dispari (Young-kyoung Park, 2020).

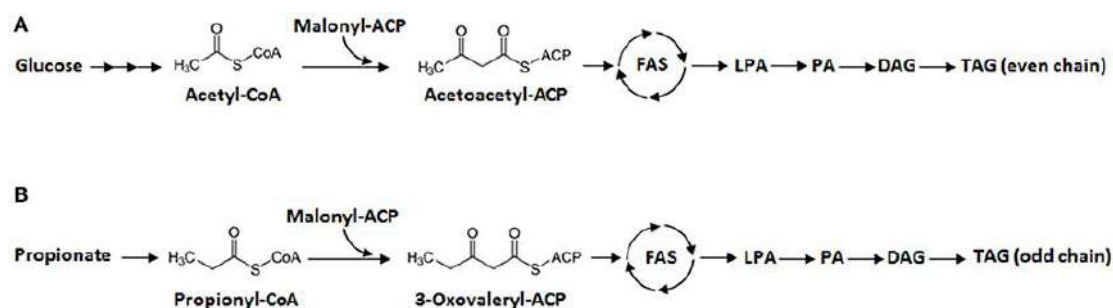


Fig. 9 - Sintesi di lipidi in *Y. Lipolytica*. La biosintesi di lipidi pari parte dal glucosio (A), quella dei dispari parte dal propionato (B) (Young-kyoung Park, 2020).

Nei mammiferi i lipidi OCFAs sono stati ritrovati nel plasma di individui vegani, comunque in quantità minori rispetto che nel plasma di individui onnivori e vegetariani (Allen NE et al., 2008). Nei mammiferi la biosintesi endogena di OCFAs può derivare non solo dal microbioma intestinale, ma anche dalla degradazione di amminoacidi quali: metionina, treonina, valina ed isoleucina. Inoltre possono derivare dall'ossidazione perossisomale della catena laterale del colesterolo durante

la formazione della bile (Pedersen JI, 1993). L'evidenza di una possibile sintesi endogena dei lipidi C15:0 e C17:0 è data dagli studi effettuati in individui affetti da acidemia propionica (PA) (Oizumi J. et al., 1981). Normalmente l'acido propionico è convertito in *Propionyl-CoA* ed entra nel ciclo dell'acido citrico a livello del *Succinyl-CoA*. Disfunzioni nell'enzima *Propionyl-CoA Carboxylase* bloccano questo pathway, permettendo di trovare concentrazioni elevate ed insolite di C15:0 e C17:0 (Sperl W. et al., 2000). Gli OCFAs 15:0 e 17:0 possono derivare anche dall'idrossilazione di lipidi a numero pari di atomi di carbonio, i *Very-Long-Chain FAs* (VLCFAs). Nel cervello dei topi è stato osservato che l'acido propionico e i lipidi OCFAs con catene di lunghezza intermedia sono usati per la sintesi di VLCFAs a numero dispari di atomi di carbonio (Maria Pfeuffer et al., 2016).

b. mmBCFAs

I lipidi dispari ramificati sono formati da uno scheletro a numero pari di atomi di carbonio, ma presentano delle ramificazioni spesso costituite da un solo metile. Tali lipidi sono definiti mmBCFAs. Nei batteri i mmBCFAs possono essere predominanti ed essenziali per la loro sopravvivenza. Nell'uomo gli acidi grassi ramificati sono stati ritrovati principalmente nel tessuto adiposo, ma anche nel sangue, pelle, cervello e cellule cancerose. In generale essi sono presenti a basse concentrazioni in tutte le forme di vita (Marina Kniazeva et al., 2004). Nei mammiferi la funzione dei mmBCFAs è prevalentemente sconosciuta. La loro abbondanza è limitata in quanto vengono degradati tramite alfa e beta ossidazione (rispettivamente di acidi grassi ramificati con 3 e 2 metili) (Paul P. Van Veldhoven, 2010). A prevenire la formazione degli acidi grassi ramificati è l'enzima *Ethylmalonyl-CoA Decarboxylase*, il quale opera delle decarbossilazioni (Carole L. Linster et al., 2011). Nei mammiferi la sintesi *de novo* dei mmBCFAs è osservata negli adipociti, a partire dal catabolismo dei *Branched-chain aa* (BCAAs). I BCAAs sono: valina, isoleucina e leucina. Questi sono deminati ad opera delle *Branched-Chain Aminoacid Transferases* (BCATs). Vengono prodotti dei chetoacidi a catena ramificata, che sono utilizzati dai complessi *Branched-Chain Ketoacid Dehydrogenase* (BCKDHs) per generare varie specie di

Acyl-CoA: *Isovaleryl-CoA*, *Isobutyryl-CoA* e *2-methylbutyryl-CoA*. Questi vengono trasportati dal mitocondrio al citosol da *Carnitine Acetyl Transferase*. La promiscuità di *Fatty Acids Synthase* citosolico permette la sintesi dei mmBCFAs a partire da corti *Acyl-CoA* per generare acidi grassi a lunga catena (Martina Wallace et al., 2019).

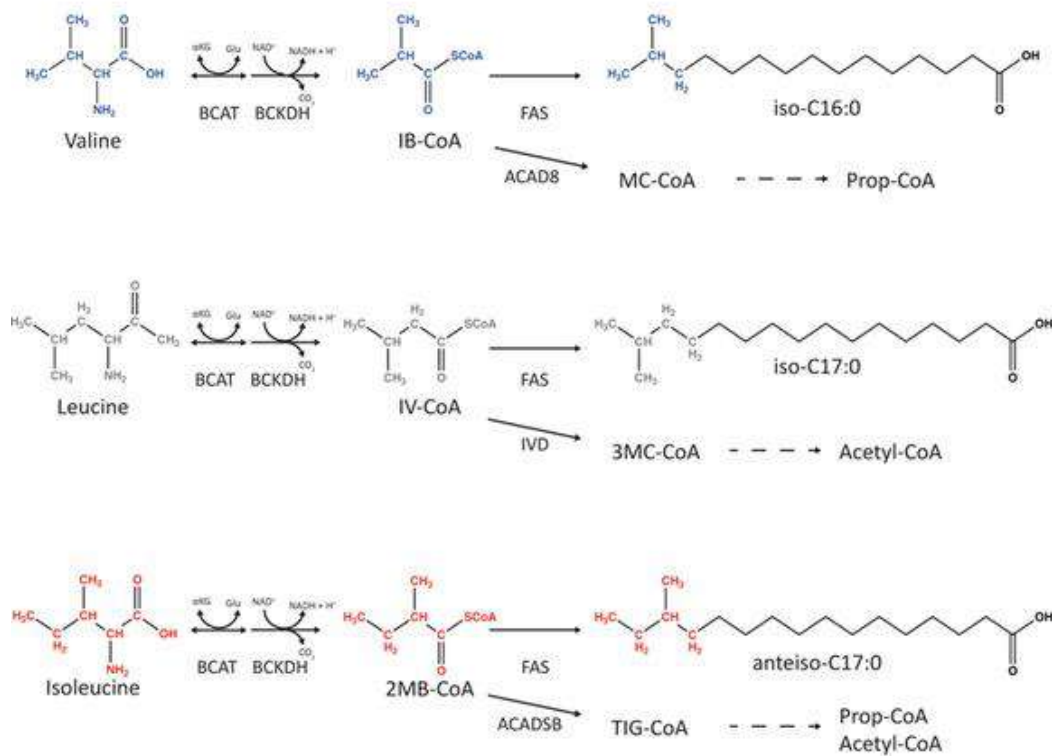


Fig. 10 - Pathway che collega il catabolismo dei BCAAs con la sintesi dei mmBCFAs. *Isobutyryl-CoA* è utilizzato per generare *iso-C16:0*, *isovaleryl-CoA* per *iso-C17:0* e *2-methylbutyryl-CoA* per *anteiso-C17:0* (Martina Wallace et al., 2019).

I metili dei mmBCFAs non si trovano solo all'ultimo/penultimo atomo di carbonio. La sintesi canonica degli acidi grassi prevede che l'enzima *Acetyl-CoA Carboxylase* utilizzi l'*Acetyl-CoA* come precursore per sintetizzare *Malonyl-CoA*, substrato dell'enzima *Fatty Acids Synthase* per l'allungamento delle catene. Tuttavia l'*Acetyl-CoA Carboxylase* può utilizzare anche altre specie di *Acyl-CoA* per la sintesi di acidi grassi. L'*Acetyl-CoA Carboxylase* sintetizza *Methylmalonyl-CoA* ed *Ethylmalonyl-CoA* come *side products*, a partire rispettivamente dal *Propionyl-CoA* e *Butyryl-CoA*. Ciò porta alla formazione di acidi grassi con metili che inserendosi creano ramificazioni, rendendo la catena dispari (Joseph P. Dewulf et al., 2019).

FATTY ACID SYNTHESIS (cytosolic)

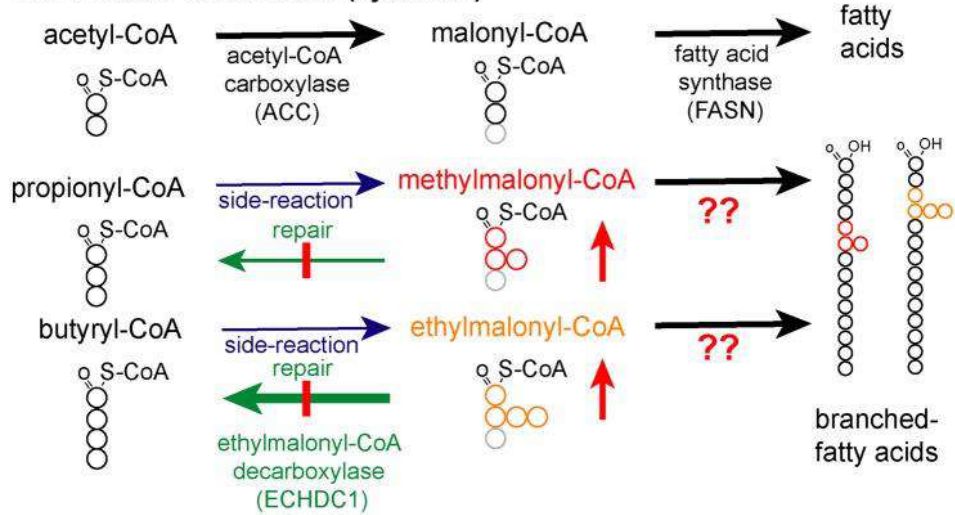


Fig. 11 – Schema della sintesi canonica e non di acidi grassi. *Methylmalonyl-CoA* ed *Ethylmalonyl-CoA* sono *side products* dell'*Acetyl-CoA Carboxylase*. L'enzima *Ethylmalonyl-CoA Decarboxylase* decarbossila *Ethylmalonyl-CoA* (Joseph P. Dewulf et al., 2019).

3. Metabolismo lipidico e cancro

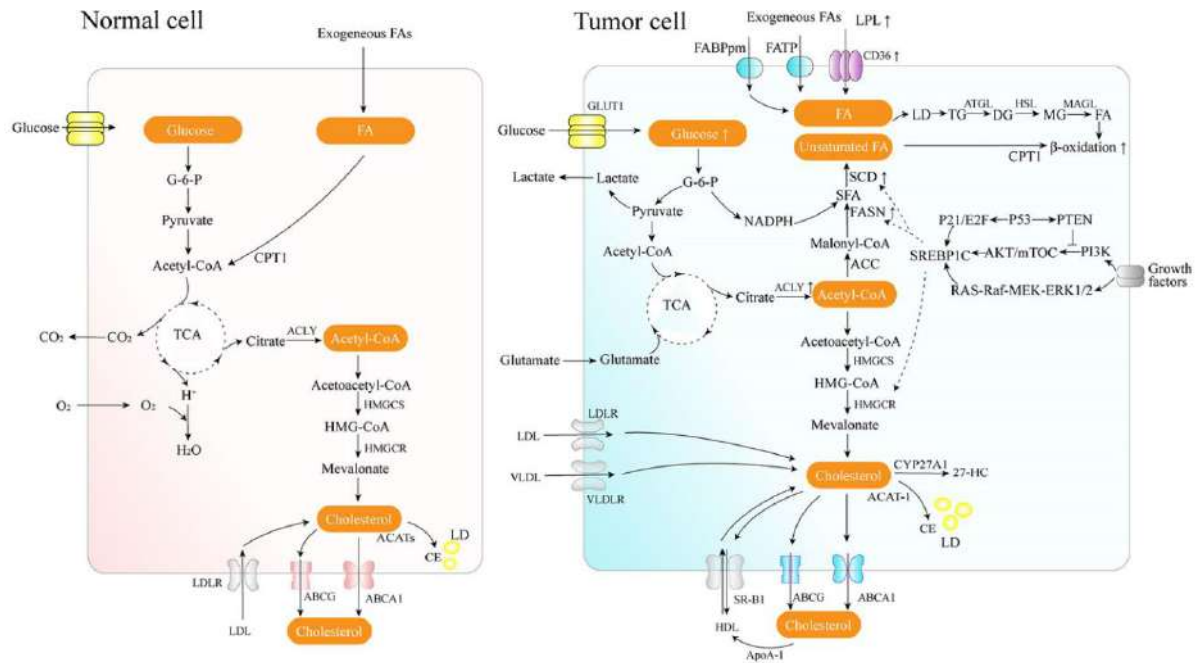


Fig. 12 – Confronto tra il metabolismo lipidico di una cellula normale (a sinistra) e tumorale (a destra). L'alterazione del metabolismo, in particolare quello lipidico, è un marker ormai certo delle cellule tumorali (Wenjun Wang et al., 2020).

Lo sviluppo del cancro è accompagnato da modifiche nel microambiente tumorale: scarso apporto di sangue, ipossia e carenza di nutrienti. Le cellule tumorali per sopravvivere in condizioni così ostili alterano il proprio metabolismo, aumentando la captazione di glucosio e la produzione di lattato (effetto Warburg). Per la sintesi di aminoacidi, acidi nucleici e lipidi le cellule tumorali dipendono fortemente dal catabolismo del glucosio e della glutammina. Ma sono strettamente legate anche alle vie lipidiche: attivano la lipogenesi endogena, la sintesi del colesterolo e aumentano l'assorbimento di lipoproteine esogene (LPL). I lipidi sono essenziali per la sopravvivenza delle cellule tumorali in quanto svolgono ruoli di segnalazione oncogenica intracellulare, stress del reticolo endoplasmatico e cross-talk bidirezionale tra le cellule del microambiente tumorale. Per soddisfare l'esigenza di lipidi, le cellule tumorali aumentano l'espressione degli enzimi lipogenici come *Acetyl-CoA Carboxylase*, *Fatty Acids Synthase* e *ATP Citrate Lyase*. Nel tumore al seno sono stati ritrovati aumentati livelli di segnalazione cellulare indotta da

L'aumento della lipogenesi è correlato ad una maggiore espressione degli enzimi appartenenti al pathway di biosintesi lipidica che sono regolati da *Sterol Regulatory Element-Binding Proteins* (SREBPs). SREBPs è una famiglia di fattori di trascrizione *Helix-loop-helix leucine zipper* (HLH-LZ) composta da 3 isoforme: SREBP1a e SREBP1c codificate dal gene SREBF1 e SREBP2 codificata da SREBF2 (Maria T Bengoechea-Alonso et al., 2007). SREBP1 regola i geni coinvolti nella sintesi degli acidi grassi, SREBP2 quelli della sintesi del colesterolo (Jay D. Horton et al., 2003). SREBPs sono attivati a valle della via di segnalazione oncogenica, dall'asse di segnalazione PI3K/Akt/mTORC1 (Thomas Porstmann et al., 2008).

b. Lipidi saturi ed insaturi

Durante la biosintesi degli acidi grassi, l'enzima *Stearoyl-CoA Desaturase-1* forma il doppio legame nell'acido stearico C18:0 e in misura minore nell'acido palmitico C16:0 per formare rispettivamente acido oleico e palmitoleico. L'inibizione di questa reazione porta all'apoptosi delle cellule tumorali cresciute in vitro con terreno sottratto di lipidi (Hiroyuki Ariyama et al., 2010). In vivo il blocco di *Stearoyl-CoA Desaturase-1* ha arrestato la crescita delle cellule tumorali polmonari (Natalia Scaglia et al., 2008). È interessante osservare che l'inibizione di *Stearoyl-CoA Desaturase-1* è efficace solo quando le cellule crescono in assenza di lipidi esogeni. Infatti l'espressione di *Stearoyl-CoA Desaturase-1* è indotta da ipossia e condizioni di scarsità nutrizionale. Se sono presenti lipidi nell'ambiente, le cellule tumorali li assorbono e soddisfano i loro bisogni di insaturazione (Barrie Peck et al., 2016). Nelle cellule tumorali si osserva una riduzione del contenuto di acidi grassi polinsaturi (PUFAs), ma un aumento degli acidi grassi saturi (SFAs) e monoinsaturi (MUFAs) a livello della membrana. Quest'ultimi proteggono la cellula tumorale dalla ferroptosi e dalla perossidazione dei PUFAs, che avviene in presenza di specie reattive dell'ossigeno (ROS) (Evelien Rysman et al., 2010). I PUFAs sono convertiti in eicosanoidi, molecole con funzione di segnalazione (Leslie Magtanong et al., 2019). Tuttavia l'accumulo di lipidi contenenti acidi grassi saturi porta alla lipotossicità e stress ER; i lipidi formati da acidi grassi insaturi possono invertire quest'effetto

(Daniel Ackerman et al., 2014). È stato osservato che un aumento della saturazione nella membrana e inibizione dell'insaturazione, compromette la respirazione mitocondriale. Le cardiolipine si legano al citocromo c e ne prevengono l'uscita dalla membrana interna mitocondriale, controllando l'apoptosi (Zachary T. Schug et al., 2012). Nel cancro alla prostata il blocco di *Stearoyl-CoA Desaturase-1* riduce l'incorporazione dei MUFAs nelle cardiolipine (Barrie Peck et al., 2016). Una simile riduzione nella sintesi delle cardiolipine è stata osservata in risposta all'acido betulinico, il quale inibisce *Stearoyl-CoA Desaturase-1* provocando l'arresto della crescita cellulare (L. Potze et al., 2016). In entrambi i casi, l'inibizione di *Stearoyl-CoA Desaturase-1* coincide con l'aumento del rilascio del citocromo c, con conseguente morte cellulare. L'approccio lipidomico ha rivelato che i lisofosfolipidi sono assorbiti in misura maggiore rispetto i fosfolipidi. Sono preferiti i lisofosfolipidi contenenti catene mono o polinsature aciliche rispetto i lisofosfolipidi saturi (Jurte J. Kamphorst et al., 2013). Il mantenimento del corretto livello di desaturazione degli acidi grassi è essenziale, in quanto correlato alla risposta allo stress cellulare e alla morte programmata (Marteinn Thor Snaebjornsson et al., 2020).

c. Stress metabolico

In ipossia, l'assorbimento di lipidi esogeni dipende da *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF1-alfa), che facilita l'inglobamento, tramite il trasportatore FABP4, di lisofosfolipidi insaturi a lunga catena, tra cui LPG, LPC e LPE. In condizioni di stress metabolico le cellule tumorali sovraesprimono *Acetyl-CoA Synthetase 2* per generare l'*Acetyl-CoA* a partire dall'acetato. Sebbene il metabolismo lipidico disregolato sia una caratteristica comune nel cancro, le varie tipologie di tumore mostrano adattamenti unici che rimodellano il loro contenuto lipidico. Nel tumore alla prostata è sovraespresso *Acyl-CoA Synthetase Long Chain Family Member 3* il quale ha la funzione di attivare la sintesi del colesterolo e la steroidogenesi. Anche gli enzimi della beta-ossidazione sono sovraespressi, come *Alpha-methyl acyl-CoA Racemase* e *Carnitine Palmitoyl Transerase 1 B*. Il tumore alla prostata non è di tipo glicolitico.

La firma metabolica per la diagnosi del cancro della prostata potrebbe essere una maggiore dipendenza dalla FAO (Nikos Koundouros et al., 2019).

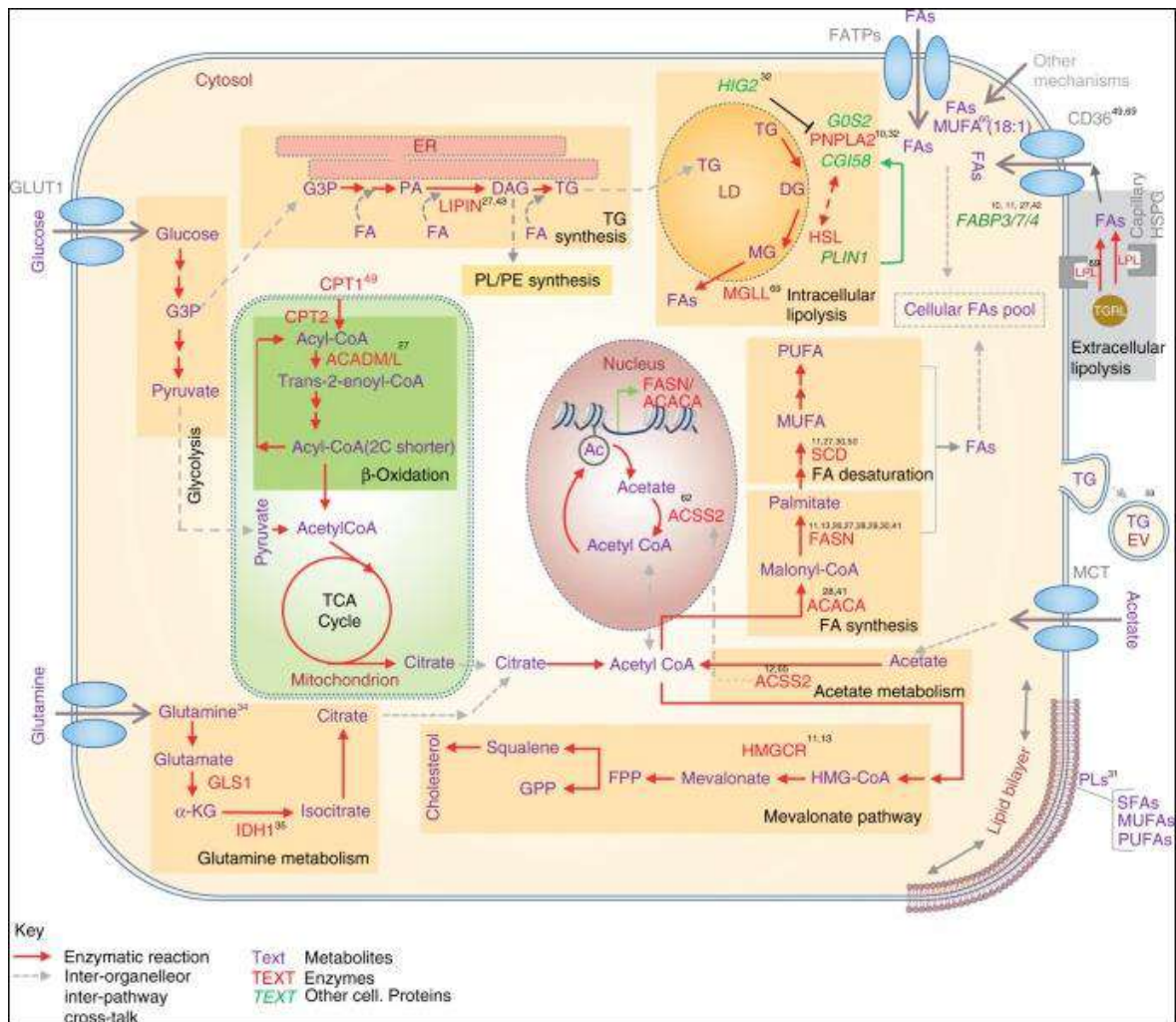


Fig. 14 - Gli effetti dello stress metabolico sull'attivazione di specifici pathway lipidici. Le frecce rosse indicano la reazione enzimatica, quelle tratteggiate l'*inter-organelleor inter-pathway cross-talk*. I metaboliti sono indicati in viola, gli enzimi in rosso e le altre molecole in verde (Rimsha Munir et al., 2019).

3.1. Cellule tumorali LNCaP

In questo studio sono utilizzate le cellule tumorali LNCaP, una linea cellulare che deriva da una lesione linfonodale metastatica del cancro alla prostata umano positivo al recettore degli androgeni (AR). Le cellule LNCaP mostrano una crescita sensibile agli androgeni (Mark A. Castanares et al., 2016). A differenza di altre cellule tumorali, le cellule tumorali della prostata hanno una maggiore dipendenza dal metabolismo degli acidi grassi rispetto quello del glucosio. L'attivazione della via PI3K/AKT porta ad una sovraespressione di *Fatty Acids Synthase* e aumenta lipogenesi dipendente da SREBPs. La lipidomica tramite spettrometria di massa ha dimostrato la presenza nelle cellule tumorali prostatiche di alterazioni in: fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositolo (PI), ceramidi (Cer) e sfingomieline (SM). L'abbondanza di fosfolipidi saturi come PE e PC altera le vie di trasduzione cellulare e protegge le cellule tumorali dallo stress ossidativo. Ceramidi e sfingosine sono gli effettori della comunicazione cellulare e regolano la risposta ai chemioterapici (Alexandra Sorvina et al., 2018). L'analisi globale dei lipidi ha mostrato che il metabolismo dei glicerofosfolipidi guida la progressione tumorale (Lishann M. Ingram et al., 2021).

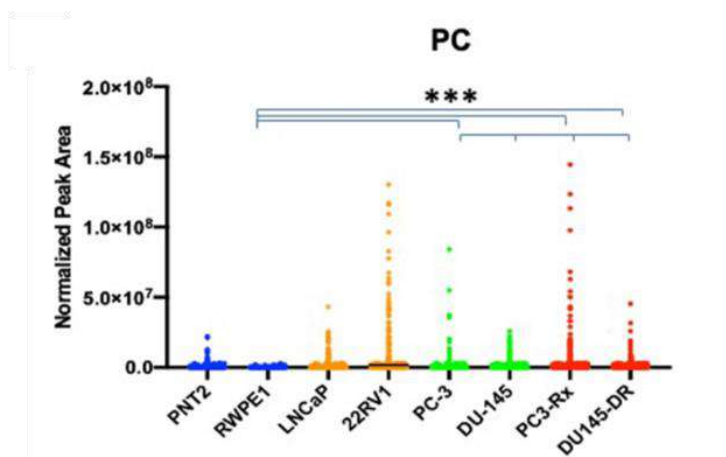


Fig. 15 – Livelli della classe PC. Confronto in cellule non cancerose (PNT2 e RWPE1), sensibili agli ormoni (LNCaP e 22RV1), resistenti alla castrazione (PC-3 e DU-145) e resistenti al Docetaxel (PC3-Rx e DU145-DR) di cellule tumorali prostatiche (Lishann M. Ingram et al., 2021).

3.2. Lipidi dispari in cellule tumorali

La sovrpressione delle deacetilasi istoniche (HDACs) è strettamente associata all'insorgenza del tumore ed emerge come un nuovo promettente bersaglio di farmaci antitumorali. Uno studio recente ha dimostrato che l'acido grasso C15 inibisce fortemente l'attività dell'isoforma HDAC6, bloccando la proliferazione delle cellule tumorali (Meran Keshawa Ediriweera et al., 2021).

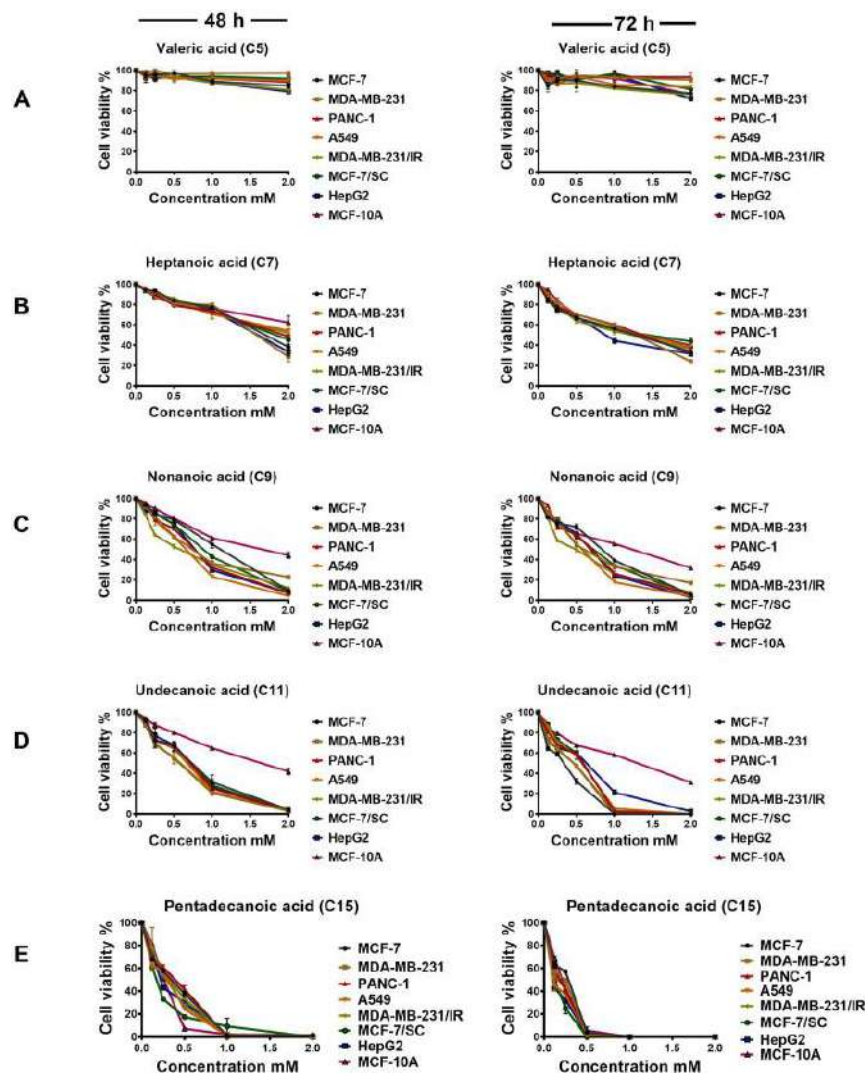


Fig. 16 – L'acido grasso C15 (E) blocca la proliferazione di sette linee cellulari tumorali: MCF-7, MDA-MB-231, PANC-1, A549, MDA-MB-231/IR, MCF-7/SC e HePG2. La percentuale d'inibizione con differenti dosi di acidi grassi (2, 1, 0.5, 0.25, 0.125 mM) è stata calcolata dopo esposizioni di 48h e 72h (Meran Keshawa Ediriweera et al., 2021).

Sono molti gli studi che confermano la nocività di alcuni acidi grassi dispari nelle cellule tumorali. L'acido grasso C17:0 inibisce la proliferazione e promuove l'apoptosi delle cellule tumorali polmonari PC-9 NSCLC (Changzhi Xu et al., 2019). Analogamente, l'acido grasso C15:0 esercita effetti citotossici verso le cellule tumorali del cancro al seno (MCF-7), riducendone la staminalità (Ngoc Bao To et al., 2020). Uno studio ha dimostrato che anche i lipidi del tipo mmBCFAs hanno un ruolo antitumorale. I mmBCFAs (in particolare 13 MTD e 14 MTD) combinati con composti fitochimici (acido idrossicitrico, acido clorogenico e piperina) sono citotossici per le cellule di cancro coloretale correlate all'obesità (Moath Alqaraleh et al., 2019).

L'assunzione di specifici lipidi dispari è dannosa per le cellule tumorali; nell'uomo sembra valere il contrario. È stata osservata un'associazione inversa tra la concentrazione dei lipidi C15:0 e C17:0 nel plasma e il rischio di malattie cardiovascolari e di diabete di tipo 2 (Santaren ID et al., 2013). Tuttavia nell'uomo gli effetti benefici derivanti dall'assunzione di lipidi dispari non corrispondono con gli effetti di quelli biosintetizzati *de novo*. Uno studio ha dimostrato che la biosintesi dell'acido grasso C17:0, ma non l'assunzione tramite l'alimentazione, è correlata con l'insorgenza dell'intolleranza al glucosio (Benjamin J. Jenkins et al., 2017).

4. Obiettivi

Si vuole valutare se c'è una correlazione tra i lipidi presenti nel terreno e la quantità/qualità di lipidi a catene dispari eventualmente presenti nelle cellule. Purtroppo, l'analisi LC/MS non permette di discriminare i lipidi OCFAs da mmBCFAs che, come si è visto precedentemente nei mammiferi, possono avere diverse provenienze. Quindi in questo studio si ricercano semplicemente lipidi con catene a numero dispari di atomi di carbonio.

Le cellule LNCaP normalmente crescono in un terreno sintetico addizionato di FBS. In questo esperimento è usato il terreno RPMI. Esso è totalmente privo di lipidi. L'apporto di FBS, oltre a introdurre nel terreno i fattori di crescita che facilitano la riproduzione delle cellule, aggiunge anche la quota dei lipidi che sono normalmente presenti nel siero.

L'obiettivo principale del lavoro di tesi è valutare se i lipidi a catene dispari sono presenti nel profilo lipidico delle cellule che si moltiplicano in un terreno totalmente privo di lipidi. In altre parole determinare, se possibile, se le cellule sono in grado di sintetizzare i lipidi a catena dispari *de novo*.

Secondariamente, aumentando la concentrazione di lipidi nel terreno attraverso l'aggiunta di quantità scalari di FBS, determinare se l'eventuale variazione della concentrazione dei lipidi a catena dispari è correlabile alla concentrazione degli stessi nel terreno. In questo caso saremo in grado di dire se i lipidi a catene dispari che eventualmente troviamo nelle cellule provengono dal terreno.

Per raggiungere questi obiettivi si predispongono i seguenti esperimenti.

A) Cellule in terreno RPMI totalmente sintetico e privo di fonti di lipidi.

B) Cellule in terreno RPMI addizionato di 1% FBS.

C) Cellule in terreno RPMI addizionato di 5% FBS.

D) Cellule in terreno RPMI addizionato di 10% FBS.

Ci si aspetta, analizzando il profilo lipidico intero sia del terreno che delle cellule, di evidenziare gli aspetti quantitativi che riguardano i lipidi a catena dispari.

I dati sono prodotti attraverso un normale *Workflow* analitico basato su LC/MS con un metodo adatto alla lipidomica. La matrice dati che ne deriva è processata sulla

piattaforma web Metaboanalyst per determinare tramite l'analisi PCA la presenza di eventuali *outlier*. La matrice ripulita da eventuali *outlier* è studiata tramite il software LipidOne. Quest'ultimo strumento è in grado di analizzare a fondo i *building blocks* lipidici ed evidenziare le eventuali differenze sui lipidi a catene dispari.

5. Materiali e metodi

5.1. Prodotti chimici e strumentazione

Standard interno *SPLASH LIPIDOMIX* (Sigma Aldrich): miscela standard di lipidi deuterati a concentrazione nota:

Lipidi	Concentrazione ($\mu\text{g/mL}$)
PC 15:0-18:1 (d7)	160
PE 15:0-18:1 (d7)	5
PS 15:0-18:1 (d7)	5
PG 15:0-18:1 (d7)	30
PI 15:0-18:1 (d7)	10
PA 15:0-18:1 (d7)	7
LPC 18:1 (d7)	25
LPE 18:1 (d7)	5
<i>Chol Ester</i> 18:1 (d7)	350
MG 18:1 (d7)	2
DG 15:0-18:1 (d7)	10
TG 15:0-18:1 (d7)-15:0	55
SM (18:1) (d9)	30
<i>Cholesterol</i> (d7)	100

Spettrometro di massa: *LC/MS Agilent* composto dal cromatografo liquido *Agilent 1260 Infinity II* e dall'analizzatore *Agilent 6530 Accurate-Mass Q-TOF* con sorgente *Agilent JetStream*. La colonna cromatografica utilizzata è *Agilent C8 Poroshell* di dimensioni 100 x 2,1 mm e diametro delle particelle 1,9 μm .

Solventi: Acqua (LiChrosolv), Isopropanolo, Metanolo, Acetonitrile (grado LC/MS, Carlo Erba). MTBE, Acido formico, soluzione 10 M di Formiato d'ammonio (Sigma Aldrich), Acetato d'ammonio e Toluene (Carlo Erba).

5.2. Colture cellulari

Per lo studio sono utilizzate le linee cellulari LNCaP del cancro alla prostata. Queste crescono in una piastra T-25 con il terreno di coltura RPMI a cui di addiziona 10% FBS (*Fetal Bovine Serum*) e 1% penicillina/streptomicina. In seguito le cellule sono piastrate a diverse concentrazioni di FBS: 0%, 1%, 5%, 10%. Sono effettuate tre repliche sperimentali (A, B, C) per ciascuna condizione di crescita, utilizzando le piastre *multiwell* da sei pozzetti. Per il mantenimento, la coltura cellulare viene posta in un incubatore con temperatura di 37°C e CO₂ al 5%. Si monitora la crescita cellulare giorno per giorno, tramite un'analisi visuale al microscopio invertito. Quando le cellule raggiungono lo stato di confluenza, si prosegue con lo *splitting*, una tecnica che permette di staccare, dividere tra loro le cellule e propagare la coltura.

1. Si rimuove il terreno.
2. Si lava con PBS (*Phosphate Buffered Saline*), il quale disattiva gli inibitori della Tripsina presenti nell'FBS.
3. Tramite una soluzione di Tripsina (0,5 mL, per 3-4 minuti) si staccano le cellule.
4. Si aggiunge terreno fresco per disattivare l'azione della Tripsina.
5. Infine, si diluisce un'aliquota di cellule in nuovo FBS (diluizione 1:20).
6. La sospensione ottenuta è nuovamente seminata.

Si procede con la conta cellulare tramite la Camera di Bürker. Le cellule sono colorate diluendo il campione 1:1 con *Trypan Blue*, quindi si aggiungono 10 µL di cellule e 10 µL di colorante in un eppendorf da 2 mL. Si agita bene la sospensione cellulare usando una pipetta, evitando la formazione di bolle. Si procede al riempimento della camera poggiando il puntale sul bordo del vetrino; il liquido defluisce per capillarità. Per la conta sono considerati i cinque quadrati che costituiscono le diagonali della cella. Dopo aver contato tutte le cellule presenti, si calcola la media. Per ricavare la concentrazione di cellule presenti nel campione espressa in n cellule/mL, si applica la seguente formula:

media numero cellule x fattore di diluizione x 10⁴

Poi si moltiplica il risultato per mL del campione e si ricava il numero di cellule.

LNCap	A	B	C
0%	4,15 x 10 ⁵	4,57 x 10 ⁵	3,3 x 10 ⁵
1%	6,3 x 10 ⁵	7,05 x 10 ⁵	5,25 x 10 ⁵
5%	7,8 x 10 ⁵	8,85 x 10 ⁵	1 x 10 ⁶
10%	8,77 x 10 ⁵	9,07 x 10 ⁵	9,75 x 10 ⁵

Per calcolare mL di cellule necessari per l'esperimento, si fa una proporzione:

$$x \text{ mL} : \text{mL noti} = 200.000 \text{ cellule} : \text{cellule note}$$

Dove 200.000 è il numero di cellule presenti inizialmente in ogni pozzetto delle *multiwell*.

Infine si hanno dei campioni di cellule e di terreno senza cellule, affinché sia possibile confrontare i lipidi presenti in entrambi i casi.

5.3. Estrazione lipidica

Per estrarre i lipidi dai campioni si utilizza un metodo monofase con una miscela di solventi detta MMC, una soluzione di MTBE (metil-t-butil etere), Metanolo e Cloroformio in proporzione 1:1:1 (Pellegrino R. M. et al., 2014). Alla soluzione d'estrazione è incorporato *SPLASH LIPIDOMIX* (diluizione 1:10 con il Metanolo) che consentirà di ottenere dati quantitativi. La soluzione di MMC aggiunta al pellet permette di formare una unica fase contenente sia le sostanze polari che apolari ed un precipitato di proteine.

1. Si aggiunge 1 mL di MMC a ciascun campione.
2. Vortex per 30 s ogni campione.

3. Si lasciano riposare i campioni nel ghiaccio per 20 minuti.
4. Si procede con l'incubazione dei campioni nel Thermomixer a 23,5°C per 20 min.
5. Al termine del ciclo, i campioni vengono centrifugati a velocità massima (16000 giri) a 4°C per 6 minuti.
6. Prestando attenzione a non risospendere il pellet, si trasferisce la fase liquida nelle vials.
7. L'MTBE, a differenza del metanolo, può creare problemi alla forma dei picchi, quindi si procede con l'evaporazione dei campioni tramite un leggero flusso di azoto.
8. Infine si risospendono i campioni con 100 µL di soluzione Metanolo/Toluene in proporzione 9:1, in quanto il toluene solubilizza le molecole molto apolari.
9. I campioni sono pronti per l'analisi strumentale.

5.4. Elaborazione della matrice dati

L'acquisizione computazionale dei lipidi è effettuata tramite il software *Agilent MassHunter*. Viene creata la *Worklist* che contiene l'elenco dei nomi dei campioni. Si imposta il metodo delle analisi, che può essere a polarità positiva o negativa (si effettuano entrambe le corse cromatografiche, in quanto specifici lipidi si vedono in negativo ed altri in positivo). L'output fornito da *MassHunter* è un cromatogramma che riporta indicate *m/z* e *Retention Time* (RT), caratteristiche che sono il *fingerprint* di ciascun lipide. Sono esportati i file ABF e processati tramite il software MSDIAL, un *tool* che permette l'allineamento e l'identificazione dei lipidi. Per garantire la precisione dei dati, si settano parametri d'analisi stringenti: *Accurate mass tolerance*: 0.01, *Identification score cut off*: 85%, *Retention time tolerance*: 2 min., *N% detected in at least one group*: 100%. La normalizzazione degli standard d (7) e d (9) si effettua tramite la compilazione della tabella *SPLASH mixture setting window*. Si inseriscono il nome del metabolita, la sua concentrazione, l'ID dell'allineamento e il lipide *target class* con cui quantificare. Si esportano i risultati dell'allineamento come dati

normalizzati e si procede alla creazione della matrice dati su Excel. La matrice grezza viene ripulita tramite: eliminazione delle colonne superflue e dei picchi non identificati, riordinamento dei dati per *Metabolite name*, esplicazione delle catene che compongono i lipidi e applicazione della funzione tabella pivot per sommare i dati dei lipidi con nomi duplicati. L'ultimo step consiste nella creazione di un'unica matrice derivante dall'unione di quella positiva e negativa. È importante che la matrice presenti le prime due righe indicanti *Sample* e *Label* affinché possa essere letta dai sistemi di analisi statistica.

5.5. Analisi statistica

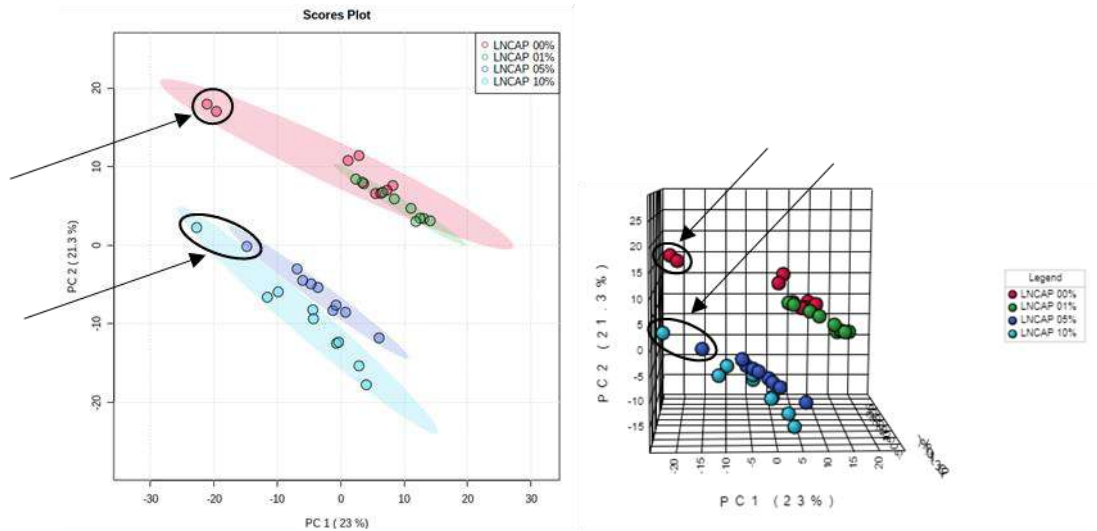
La matrice dati contiene tutti i dati ricavati sperimentalmente, i quali possono presentare delle variazioni significative o dovute al caso. Per restringere il margine d'errore (dovuto all'operatore, contaminazione dei materiali o dei solventi) sono create tre repliche sperimentali (A, B, C) e tre tecniche (r001, r002, r003) per ciascuna concentrazione di FBS (0%, 1%, 5%, 10%). I dati sono processati tramite il software bioinformatico LipidOne. Questo strumento di analisi permette di scomporre ciascun lipide nei suoi *building blocks* costitutivi: catene lipidiche e teste polari. Le catene lipidiche possono essere studiate nella loro lunghezza, grado di insaturazione, rapporto *odd/even* ecc. LipidOne fornisce un grafico a barre per indicare l'abbondanza di ciascun lipide. Se la variazione è significativa sono riportati degli asterischi sopra le barre del grafico, fino ad un massimo di tre (* per $p\text{-value} < 0,05$; ** per $p\text{-value} < 0,01$; *** per $p\text{-value} < 0,005$).

6. Risultati

6.1. Ricerca di eventuali *outlier*

La matrice viene processata sulla piattaforma web Metaboanalyst per cercare eventuali *outlier*. A tal fine si utilizza l'analisi dei componenti principali (PCA).

A)



B)

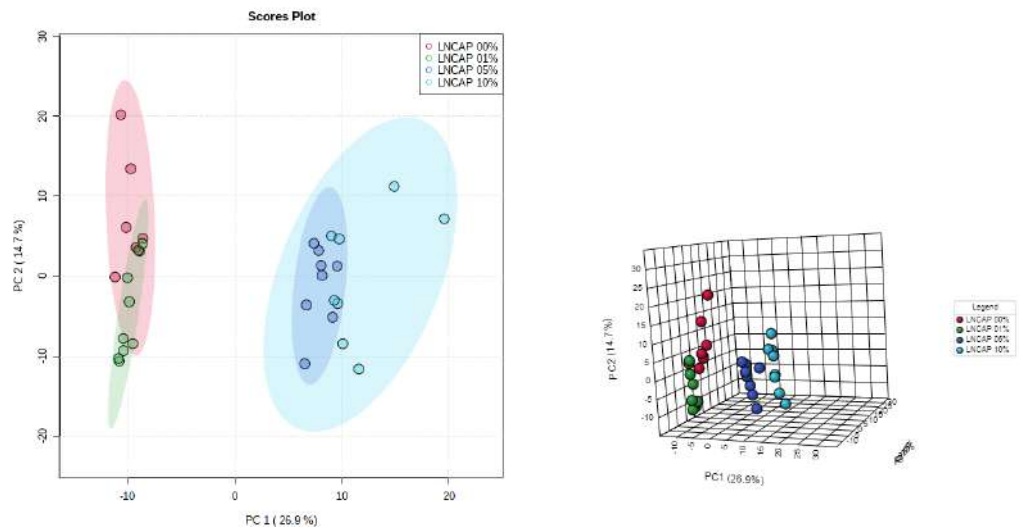


Fig. 17 – PCA delle cellule tumorali LNCaP. È illustrata la PCA prima di aver rimosso gli *outlier*, indicati dalle frecce (A) e dopo la loro rimozione dalla matrice dati (B).

La figura 17 (A) evidenzia che i campioni 0% A r001, 0% A r002, 5% B r001 e 10% C r002 sono *outlier* (indicati dalle frecce). La figura 17 (B) riporta la PCA della stessa matrice senza *outlier*.

C)

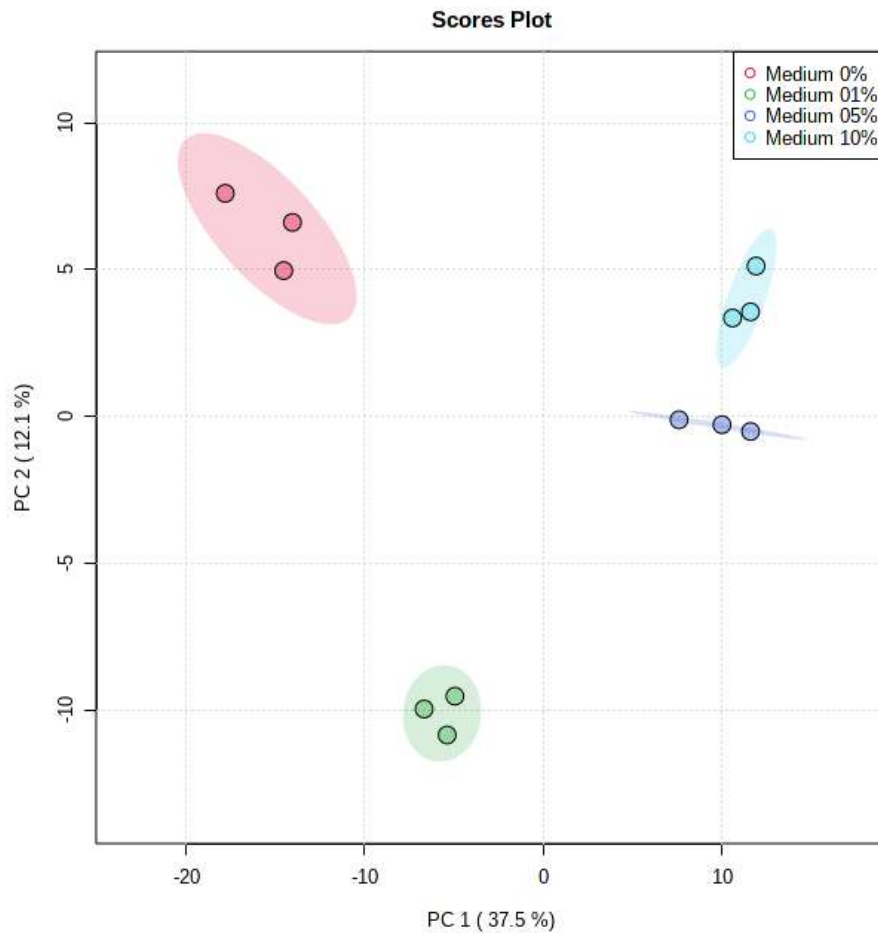


Fig. 18 – PCA del terreno. La PCA del terreno (C) non evidenzia la presenza di *outlier*.

Tutte le successive analisi sono effettuate con la matrice dati senza gli *outlier* trovati con la PCA.

6.2. Profilo lipidico del terreno RPMI addizionato di FBS

La seguente figura riporta il profilo lipidico del terreno. Le barre rappresentano la somma totale dei lipidi appartenenti a ciascuna classe lipidica. I colori delle barre si riferiscono al terreno addizionato di concentrazioni scalari di FBS. In particolare la barra viola indica il terreno RPMI con 0% FBS, la verde con 1% FBS, la celeste con 5% FBS e la gialla con 10% FBS.

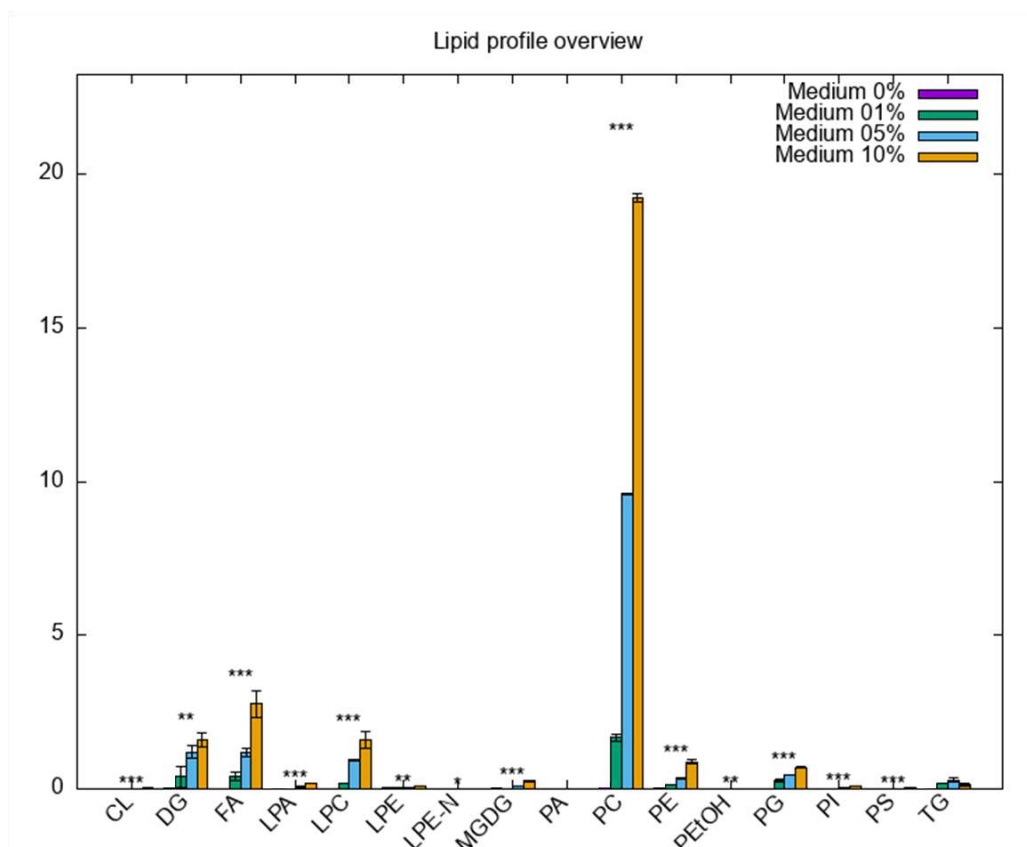


Fig. 19 - Profilo lipidico del terreno. In ascisse la sigla delle classi lipidiche, in ordinate la concentrazione dei lipidi espresse in ng/mL di terreno.

Il grafico mostra che sono state rilevate 16 classi, di cui DG, FA, LPC, PC, PE, PG sono le più consistenti. Alla concentrazione 0% di FBS corrisponde l'assenza pressoché totale di lipidi. Questo conferma che il terreno privo di FBS non contiene lipidi. L'andamento della concentrazione totale si correla con l'andamento del siero aggiunto per ciascuna classe.

6.3. Profilo lipidico delle cellule tumorali LNCaP

La seguente figura riporta il profilo lipidico delle cellule tumorali LNCaP. Le barre rappresentano la somma totale dei lipidi appartenenti a ciascuna classe lipidica. I colori delle barre si riferiscono alle cellule cresciute in diverse condizioni sperimentali. In particolare la barra viola indica le cellule cresciute in terreno RPMI con 0% FBS, la verde quelle cresciute con 1% FBS, la celeste quelle cresciute con 5% FBS e la gialla quelle cresciute con 10% FBS.

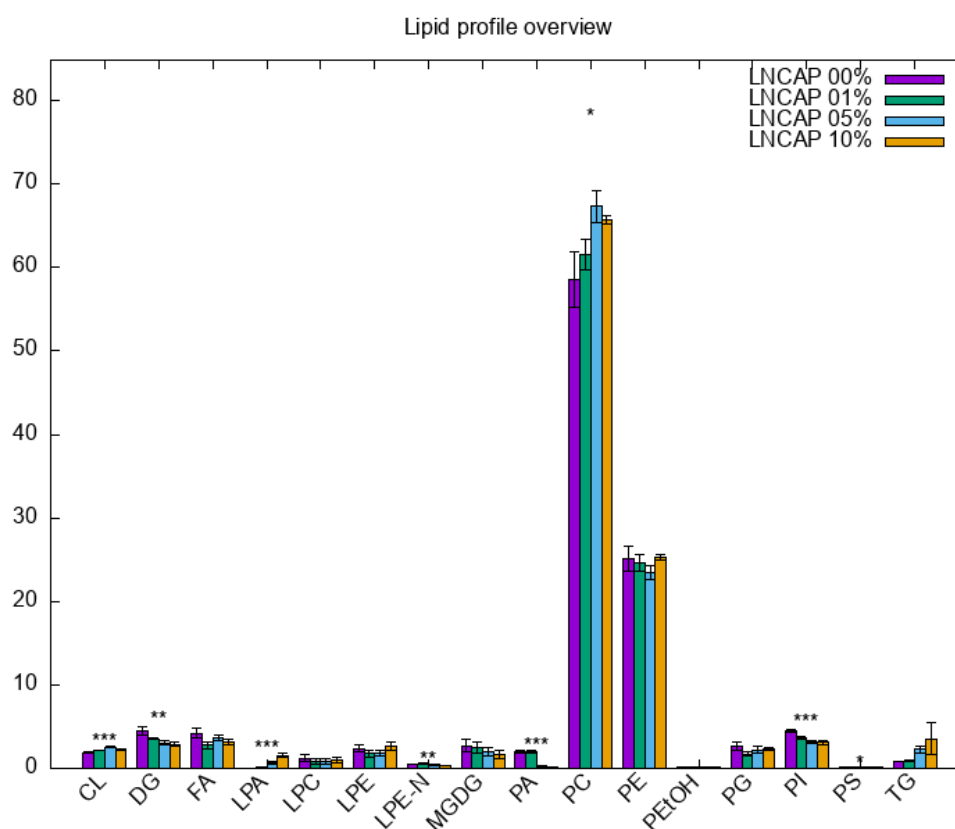


Fig. 20 - Profilo lipidico delle cellule tumorali LNCaP. In ascisse la sigla delle classi lipidiche, in ordinate la concentrazione dei lipidi espresse in $\text{ng}/10^6$ cellule.

Il grafico mostra che sono state rilevate 16 classi lipidiche, di cui PC e PE sono le più consistenti.

La concentrazione dei lipidi presenti nelle cellule non varia significativamente per le classi più abbondanti. Variazioni significative sono rilevabili per le classi meno abbondanti. Le variazioni che si notano non sembrano essere influenzate dalla concentrazione di FBS del terreno e di conseguenza dei lipidi presenti in esso. Infatti

in alcuni casi essi aumentano (CL, LPA, PC, TG) in altri casi diminuiscono (DG, FA, LPE-N, MGDG, PA, PG, PI) ed in altri sembrano rimanere pressoché costanti (LPC, LPE, PC, PEtOH, PS).

6.4. Lunghezza delle catene lipidiche nel terreno RPMI addizionato di FBS

Lo strumento LipidOne permette di studiare la lunghezza delle catene in termini di numero di atomi di carbonio o per tutte le classi lipidiche contemporaneamente o per ciascuna classe separatamente.

Il seguente grafico riporta la lunghezza delle catene lipidiche interne in termini di numero di atomi di carbonio nel terreno RPMI addizionato di concentrazioni scalari di FBS .

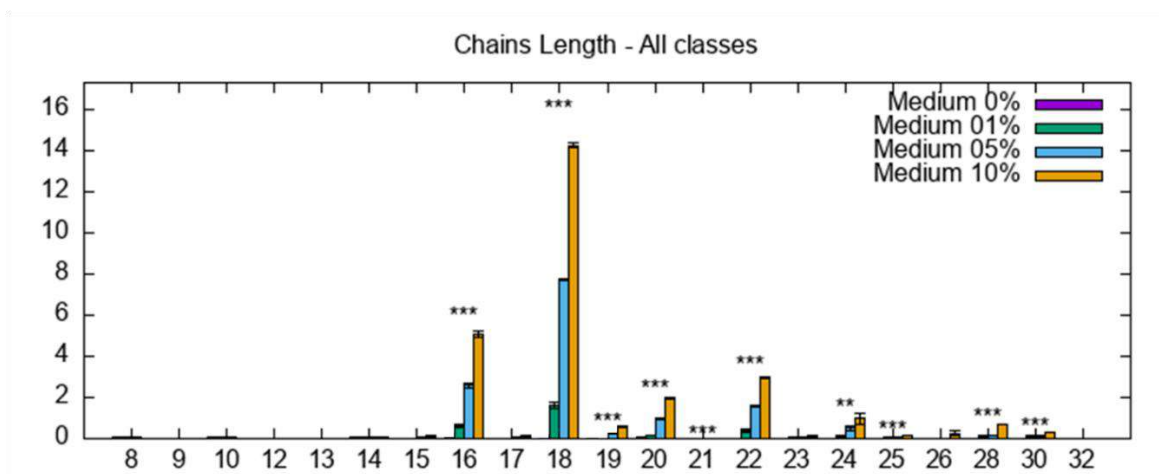


Fig. 21 - Lunghezza delle catene lipidiche presenti nel terreno RPMI addizionato di FBS.

La prima cosa che si nota è che il terreno che contiene lo 0% di FBS è pressoché privo di lipidi (barre viola). I lipidi sono rilevabili in concentrazioni proporzionali alla quantità di FBS immesso (barre verdi, celesti e gialle). Studiando le catene lipidiche di tutte le classi rilevate nel terreno si nota che le lunghezze più rappresentate sono quelle a 18, 16, 22, 20, 24 e 28 atomi di carbonio (elencate in ordine decrescente di abbondanza). Sono presenti anche le catene a numero dispari di atomi di carbonio, in particolare quelle a 19, 21, 23 e 25. Il rapporto *odd/even* in questo caso è compreso tra 3,72% e 3,90%.

6.5. Lunghezza delle catene lipidiche nelle cellule tumorali LNCaP

Il seguente grafico riporta la lunghezza delle catene lipidiche per tutte le classi lipidiche rilevate nelle cellule tumorali LNCaP.

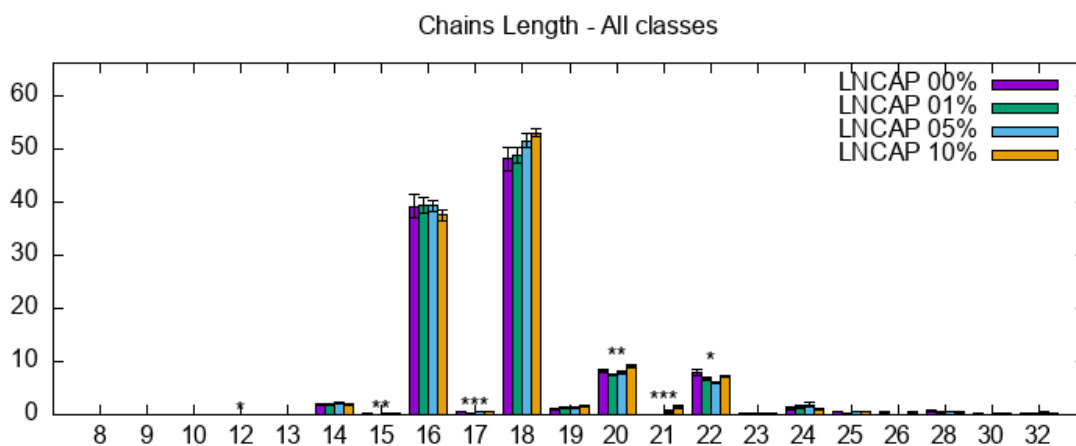


Fig. 22 - Lunghezza delle catene lipidiche presenti nelle cellule tumorali LNCaP. In ascisse è riportato il numero di atomi di carbonio e in ordinate la concentrazione delle catene lipidiche in $\text{ng}/10^6$ cellule.

Si nota che le lunghezze delle catene più rappresentate sono quelle a 14, 16, 18, 20, 22 e 24 atomi di carbonio. Sono presenti anche le catene dispari, in particolare quelle a 15, 17, 19 e 21 atomi di carbonio.

Si nota inoltre che le catene dispari sono presenti anche nel profilo lipidico delle cellule cresciute in un terreno completamente privo di lipidi.

Il rapporto *odd/even* calcolato per tutte le lunghezze delle classi lipidiche è compreso tra 2,4% e 4,3%.

6.6. Lunghezza delle catene lipidiche PC nelle cellule LNCaP e nel terreno

Il seguente grafico riporta la lunghezza delle catene lipidiche della classe PC sia nelle cellule (A) che nel terreno (B). Si è scelto di rappresentare la classe delle PC in quanto essa è quella quantitativamente più abbondante.

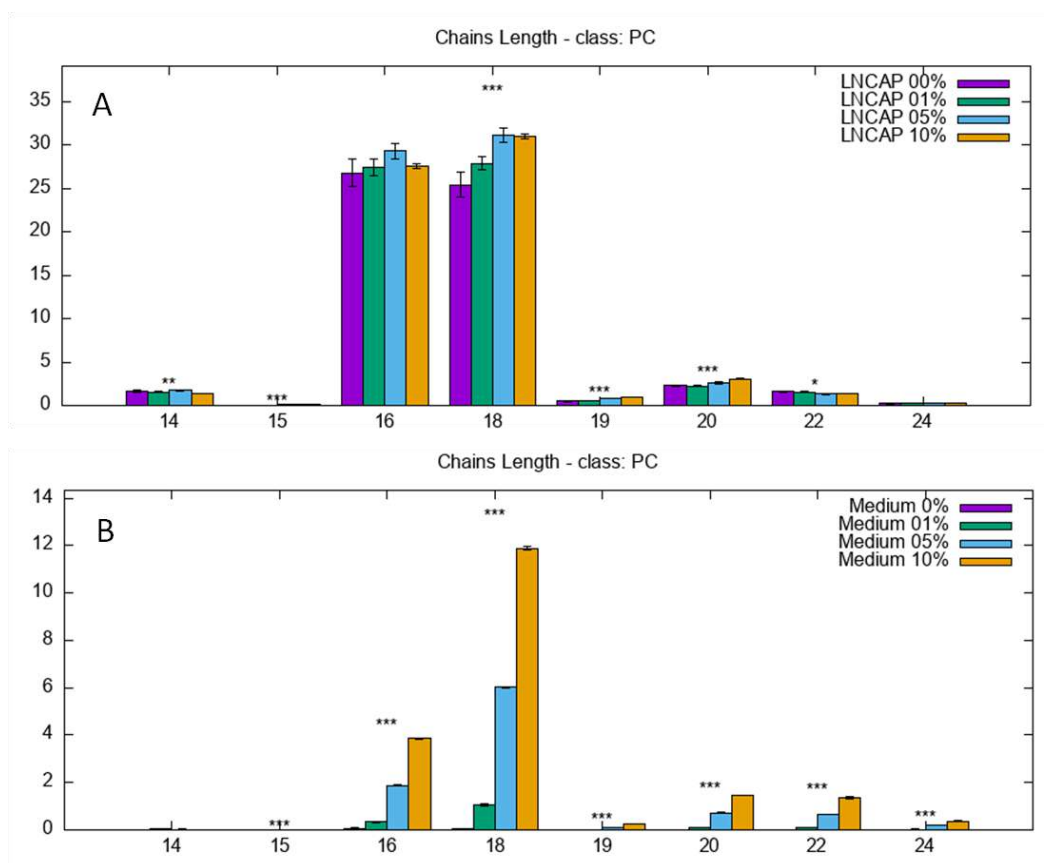


Fig. 23 - Lunghezza delle catene lipidiche in PC sia nelle cellule LNCaP (A) che nel terreno (B).

Nelle PC delle cellule le catene più abbondanti sono quelle a 14, 16, 18, 20 e 22 atomi di carbonio. Sono presenti anche catene dispari. Le più rappresentate sono quelle a 15 e 19 atomi di carbonio.

Osservando le lunghezze delle catene a 16 o 18 atomi di carbonio si nota che nelle cellule esse sono indipendenti dalla concentrazione di FBS nel terreno. Infatti nel terreno esse aumentano in proporzione alla concentrazione di FBS mentre nelle cellule esse rimangono pressoché costanti. La stessa osservazione si può fare con i lipidi dispari.

Tuttavia, poiché nel grafico esse sono meno evidenti, si indagano singolarmente le catene a 15 (A) e 19 (B) atomi di carbonio.

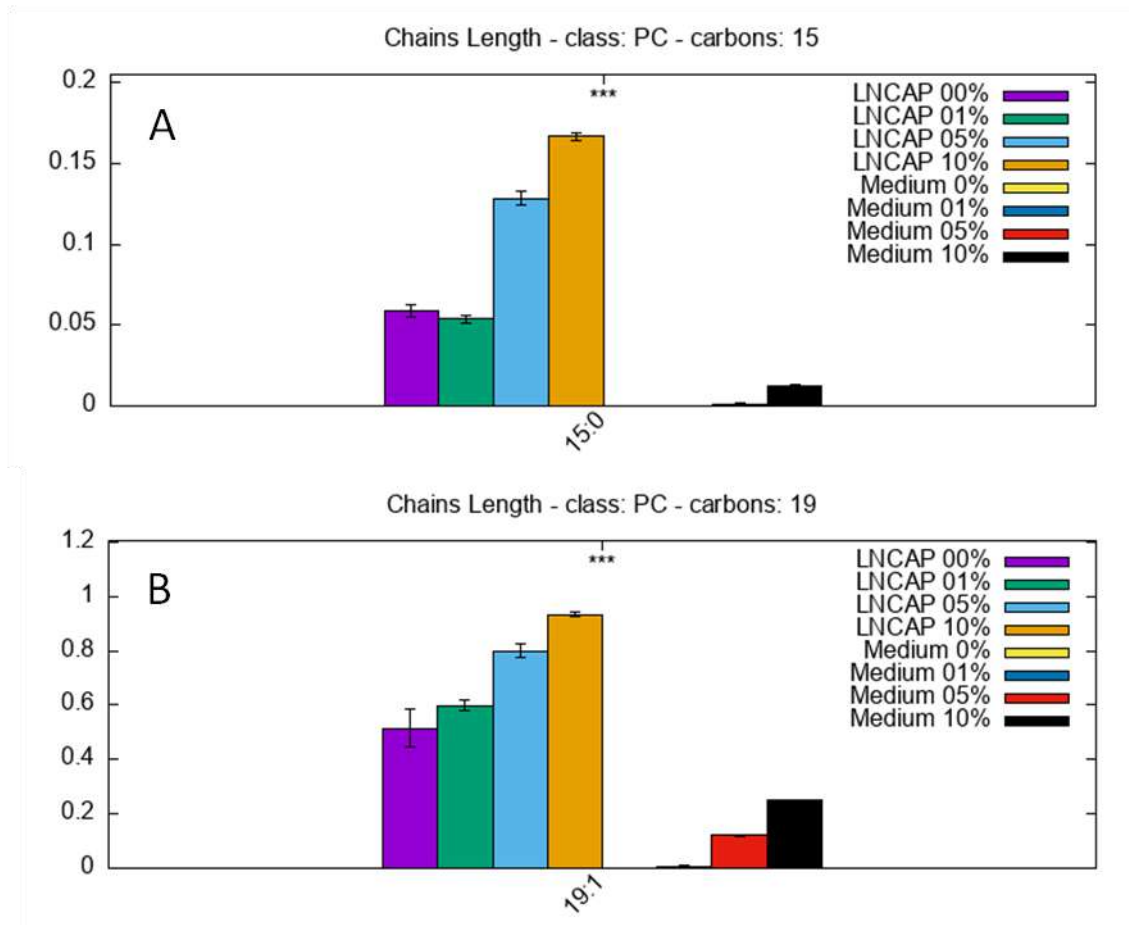


Fig. 24 - Lunghezza delle catene lipidiche a 15 (A) e 19 (B) atomi di carbonio in PC sia nelle cellule che nel terreno contemporaneamente.

Si osserva che nelle cellule cresciute in assenza di FBS sono già presenti le catene a 15 e 19 atomi di carbonio. Esse aumentano con l'aumentare del terreno. Più avanti si indagherà se c'è correlazione tra i lipidi cellulari e del terreno.

6.7. Lunghezza delle catene lipidiche PE nelle cellule LNCaP e nel terreno

Il seguente grafico riporta la lunghezza delle catene lipidiche nella classe PE in quanto è la seconda classe più abbondante.

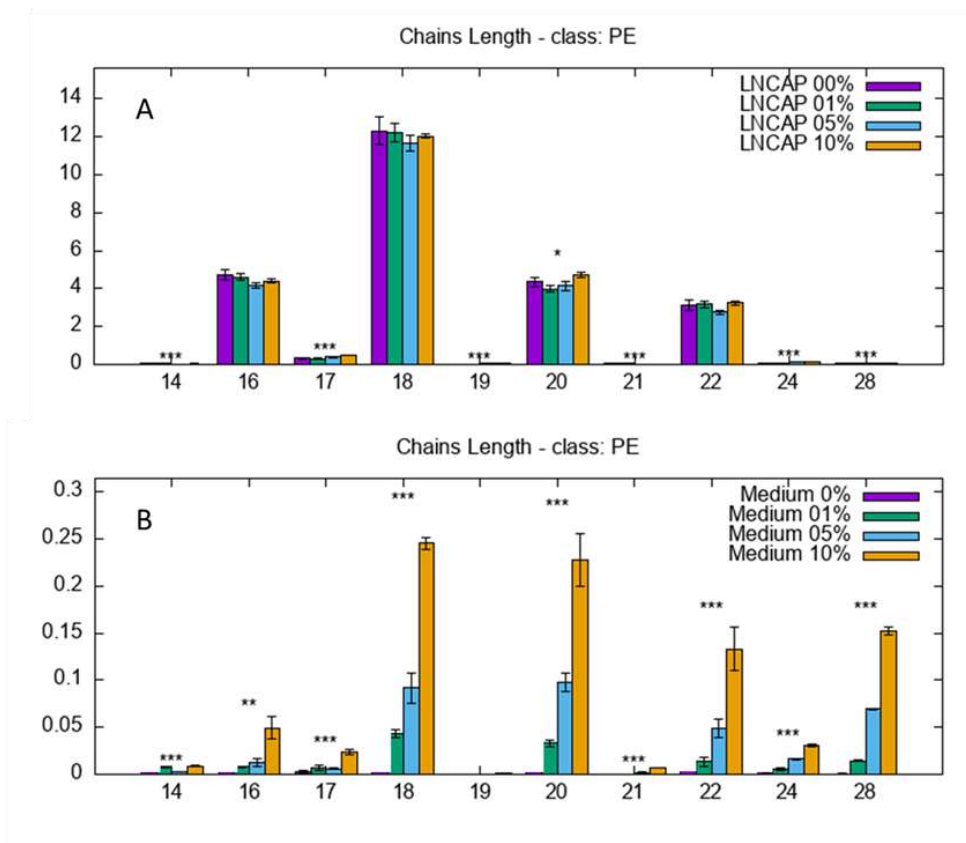


Fig. 25 - Lunghezza delle catene lipidiche in PE sia nelle cellule LNCaP (A) che nel terreno (B).

Nelle cellule le lunghezze delle catene più rappresentate in PE sono a 16, 18, 20 e 22 atomi di carbonio. Le catene dispari più rappresentate sono a 17, 19 e 21 atomi di carbonio.

Poiché nel grafico quest'ultime sono meno evidenti, si indagano singolarmente le catene a 17, 19 e 21 atomi di carbonio.

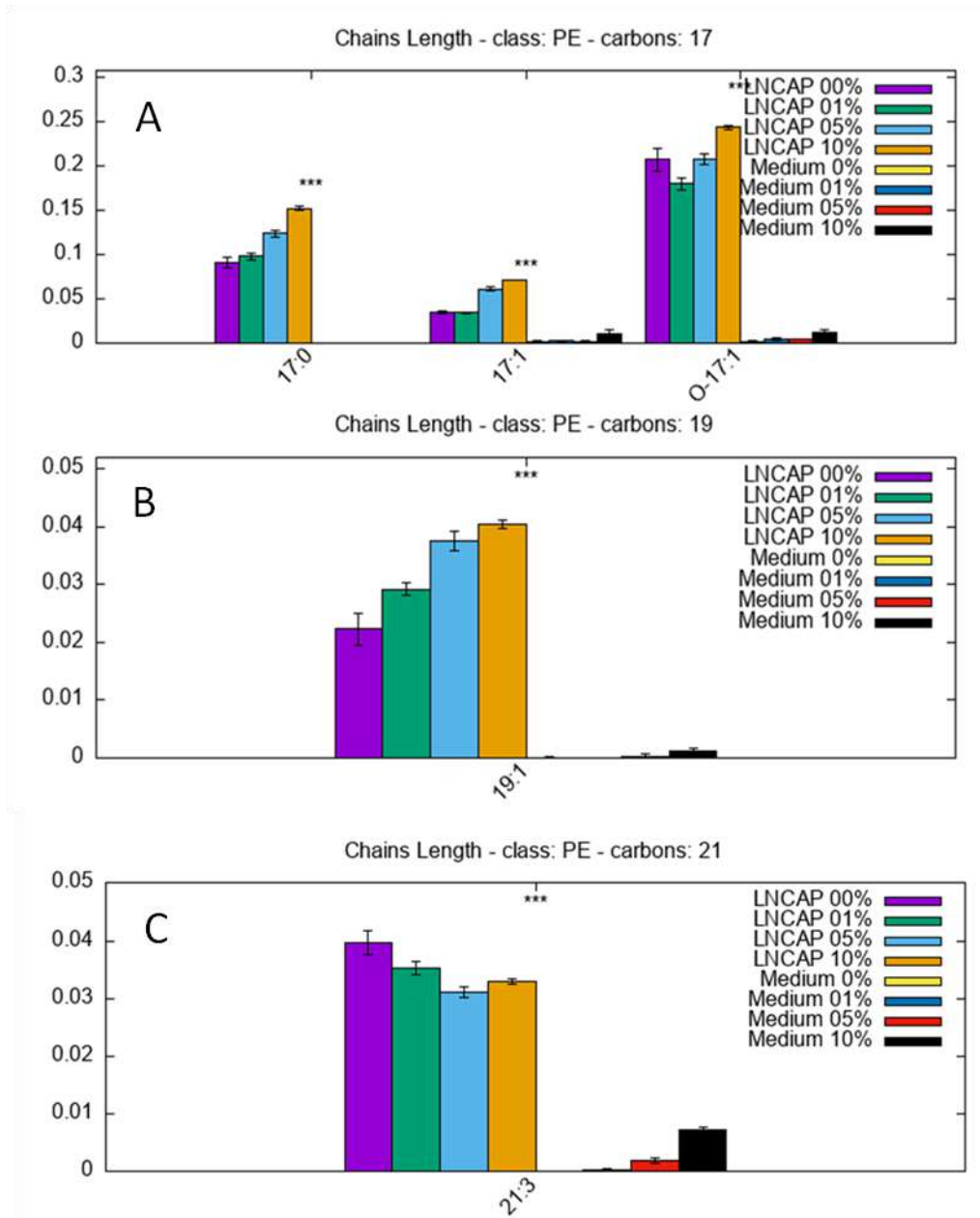


Fig. 26 - Lunghezza delle catene lipidiche a 17 (A), 19 (B) e 21 (C) atomi di carbonio in PE sia nelle cellule che nel terreno.

Si osserva che nelle cellule cresciute in assenza di FBS sono già presenti le catene a 17, 19 e 21 atomi di carbonio a diversi gradi di insaturazione. Le prime due aumentano con l'aumentare di FBS nel terreno, l'ultima, la catena a 21 atomi di carbonio, sembra invece diminuire all'aumentare di FBS nel terreno. Più avanti si indagherà se c'è correlazione tra i lipidi cellulari e del terreno.

6.8. Studio della correlazione tra lipidi cellulari e del terreno

Vengono costruiti dei grafici che riportano nelle ascisse la concentrazione delle catene lipidiche nel terreno e nelle ordinate quella nelle cellule, ciascuno per una specifica lunghezza e separatamente per le classi più abbondanti PC e PE.

La figura 27 riporta alcuni esempi delle catene a numero pari di atomi di carbonio tra le più abbondanti.

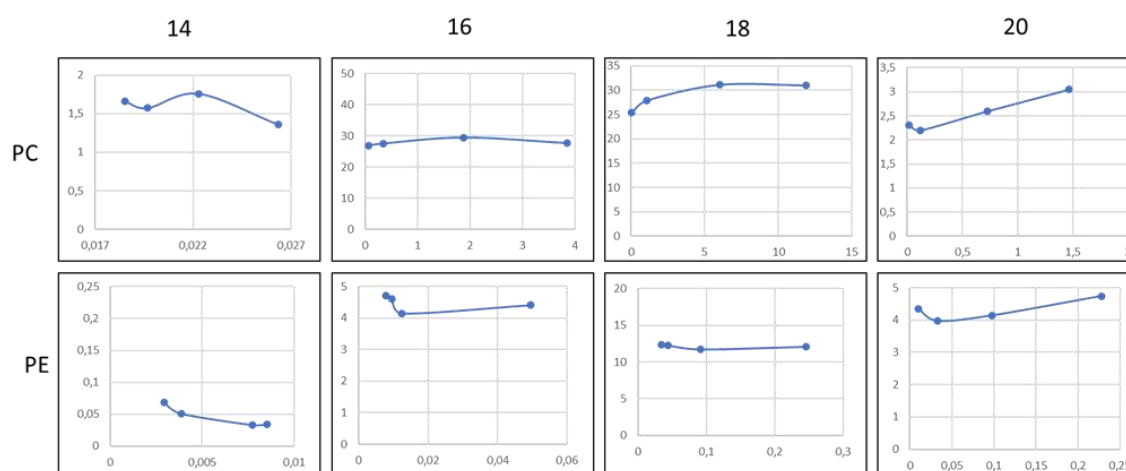


Fig. 27 – Grafici della correlazione della concentrazione delle catene lipidiche pari tra terreno e cellule LNCaP. I grafici riportano le concentrazioni delle catene a 14, 16, 18 e 20 atomi di carbonio nelle cellule (ordinate) e nel terreno (ascisse) delle classi lipidiche PC e PE.

Il grafico 27 permette di affermare che non c'è correlazione tra la concentrazione delle catene nelle cellule e le corrispondenti nel terreno. Infatti le linee che uniscono i punti alle diverse concentrazioni sono pressochè rettilinee. Se ci fosse correlazione, esse partirebbero dall'origine e avrebbero un'inclinazione di 45°. Ciò significa che la concentrazione delle catene pari nelle cellule non è dipendente da quella del terreno.

La figura 28 riporta alcuni esempi delle catene a numero dispari di atomi di carbonio tra le più abbondanti.

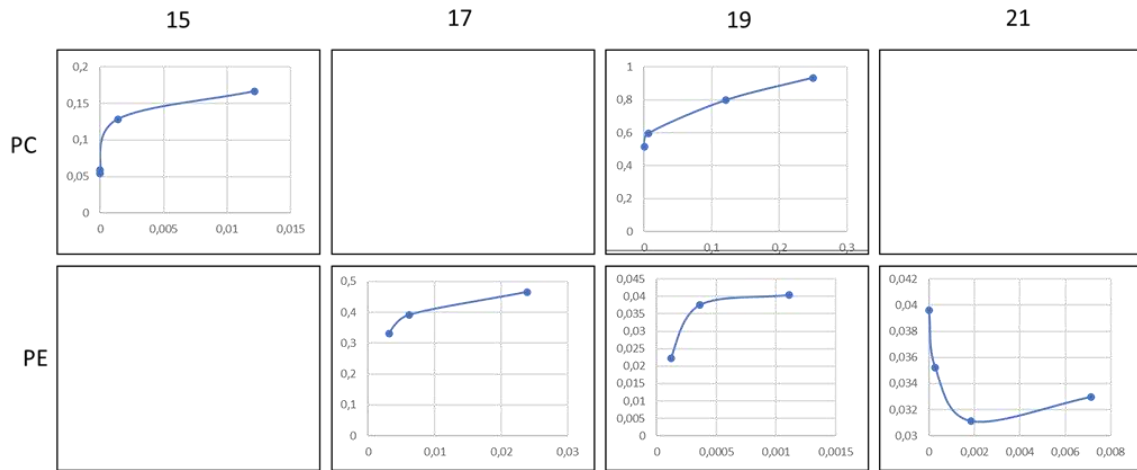


Fig. 28 - Grafici della correlazione della concentrazione delle catene lipidiche dispari tra terreno e cellule LNCaP. I grafici riportano le concentrazioni delle catene a 15, 17, 19 e 21 atomi di carbonio nelle cellule (ordinate) e nel terreno (ascisse) delle classi lipidiche PC e PE.

Il grafico 28 permette di affermare che non c'è correlazione tra la concentrazione delle catene dispari nelle cellule e le corrispondenti nel terreno. Infatti le linee che uniscono i punti alle diverse concentrazioni hanno andamenti crescenti o decrescenti, non lineari.

Un'ulteriore importante osservazione è che la concentrazione delle catene dispari non è mai nulla in assenza di FBS nel terreno, come evidenziato nei paragrafi precedenti.

7. Conclusioni

I risultati raccolti nel corso della sperimentazione permettono le seguenti conclusioni:

Rispetto l'obiettivo principale, che era determinare se le cellule sono in grado di sintetizzare i lipidi a catena dispari *de novo*, si può affermare che questi sono già presenti nelle cellule che si sono moltiplicate in un terreno totalmente privo di lipidi. Questo dato, se da un lato lascia supporre che le cellule sintetizzano lipidi a catene dispari *de novo*, dall'altro non costituisce una prova certa. Infatti, non è possibile escludere che essi siano un residuo delle riserve lipidiche cellulari. Difatti, le cellule si sono solo raddoppiate nel terreno privo di FBS anziché essere cresciute in modo esponenziale. La concentrazione dei lipidi a catene dispari potrebbe essersi semplicemente dimezzata. Per confermare questo dato bisognerebbe verificare se sono state attivate le vie lipogenetiche attraverso uno studio trascrittomico. Questo consentirebbe di evidenziare l'attivazione di geni preposti alla sintesi *de novo* dei lipidi (ACAC, FASN e ACLY). Oppure studiare linee cellulari in grado di moltiplicarsi in modo esponenziale anche in terreni privi di FBS. La prova certa dell'eventuale sintesi *de novo* di lipidi dispari la fornirebbe un esperimento di *Isotope tracer* effettuato utilizzando glucosio etichettato con ^{13}C . Gli eventuali lipidi a catene dispari (lineari o ramificati) contenenti ^{13}C certificherebbero l'origine *de novo*.

Secondariamente ci si è chiesti se ci fosse correlazione tra la concentrazione dei lipidi dispari nelle cellule e la concentrazione dei lipidi dispari nel terreno.

I dati raccolti e discussi nei paragrafi precedenti dimostrano che non c'è correlazione. Possiamo quindi concludere che per le cellule studiate la composizione dei singoli *building blocks* lipidici è totalmente indipendente dall'ambiente in cui esse crescono. In altre parole, le cellule si fabbricano i lipidi a seconda delle proprie necessità indipendentemente dalla disponibilità di lipidi esogeni.

I risultati ottenuti hanno permesso di giungere a delle importanti conclusioni, che andranno comunque confermate con ulteriori esperimenti sulla stessa linea cellulare

e anche su linee cellulari differenti. Inoltre, i dati lipidomici dovrebbero essere confermati anche con dati trascrittomici in una prospettiva di biologia dei sistemi.

Bibliografia

Alexandra Sorvina, Christie A. Bader, Chiara Caporale, Elizabeth A. Carter, Ian R. D. Johnson, Emma J. Parkinson-Lawrence, Peter V. Simpson, Phillip J. Wright, Stefano Stagni, Peter A. Lay, Massimiliano Massi, Douglas A. Brooks, Sally E. Plush, (2018). Lipid profiles of prostate cancer cells. *Oncotarget*. 9: 35541-35552.

Allen NE, Grace PB, Ginn A., Travis RC, Roddam A.W., Appleby PN, Key T., (2008). Phytanic acid: measurement of plasma concentrations by gas-liquid chromatography-mass spectrometry analysis and associations with diet and other plasma fatty acids. *Br J Nutr*. 99: 653–9.

Barrie Peck, Almut Schulze, (2016). Lipid desaturation - the next step in targeting lipogenesis in cancer? *FEBS J*. 283(15):2767-78.

Barrie Peck, Zachary T. Schug, Qifeng Zhang, Beatrice Dankworth, Dylan T. Jones, Elizabeth Smethurst, Rachana Patel, Susan Mason, Ming Jiang, Rebecca Saunders, Michael Howell, Richard Mitter, Bradley Spencer-Dene, Gordon Stamp, Lynn McGarry, Daniel James, Emma Shanks, Eric O Aboagye, Susan E Critchlow, Hing Y. Leung, Adrian L. Harris, Michael J. O. Wakelam, Eyal Gottlieb, Almut Schulze, (2016). Inhibition of fatty acid desaturation is detrimental to cancer cell survival in metabolically compromised environments. *Cancer Metab*. 4: 6.

Benjamin J. Jenkins, Kevin Seyssel, Sally Chiu, Pin-Ho Pan, Shih-Yi Lin, Elizabeth Stanley, Zsuzsanna Ament, James A. West, Keith Summerhill, Julian L. Griffin, Walter Vetter, Kaija J. Autio, Kalervo Hiltunen, Stéphane Hazebrouck, Renata Stepankova, Chun-Jung Chen, Maud Alligier, Martine Laville, Mary Moore, Guillaume Kraft, Alan Cherrington, Sarah King, Ronald M. Krauss, Evelyn de Schryver, Paul P. Van Veldhoven, Martin Ronis, Albert Koulman, (2017). Odd Chain Fatty Acids; New Insights of the Relationship Between the Gut Microbiota, Dietary Intake, Biosynthesis and Glucose Intolerance. *Scientific Reports* volume 7, Article number: 44845.

Carole L. Linster, Gaëtane Noël, Vincent Stroobant, Didier Vertommen, Marie-Françoise Vincent, Guido T. Bommer, Maria Veiga-da-Cunha, Emile Van Schaftingen, (2011). Ethylmalonyl-CoA Decarboxylase, a New Enzyme Involved in Metabolite Proofreading. *J Biol Chem*. 286(50): 42992–43003.

Changzhi Xu, Pengfei Wu, Jiajia Gao, Lanlan Zhang, Tengfei Ma, Bingbing Ma, Shuai Yang, Guojian Shao, Yang Yu, Xunduan Huang, Xingyuan Yang, Buchang Zhang, (2019). Heptadecanoic acid inhibits cell proliferation in PC-9 non-small-cell lung cancer cells with acquired gefitinib resistance. *Oncology Reports*. 41 (6): 3499-3507.

CS Ho, CWK Lam, MHM Chan, RCK Cheung, LK Law, LCW Lit, KF Ng, MWM Suen, HL Tai, (2003). Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *ClinBiochem Rev*. 24(1): 3–12.

Daniel Ackerman, M. Celeste Simon, (2014). Hypoxia, lipids, and cancer: surviving the harsh tumor microenvironment. *Trends Cell Biol.* 24 (8): 472-8.

Darren R. Allen, Brett C McWhinney, (2019). Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry: A Paradigm Shift in Toxicology Screening Applications. *ClinBiochem Rev.* 40(3): 135–146.

Dawn Cotter, Andreia Maer, Chittibabu Guda, Brian Saunders, Shankar Subramaniam. (2006). LMPD: LIPID MAPS proteome database. *Nucleic Acids Res.* 34(Database issue): D507-10.

Eoin Fahy, Shankar Subramaniam, Robert C. Murphy, Masahiro Nishijima, Christian R. H. Raetz, Takao Shimizu, Friedrich Spener, Gerrit van Meer, Michael J. O. Wakelam, Edward A. Dennis, (2009). Update of the LipidMaps comprehensive classification system for lipids. *JLR.* 50: S9-14.

Eoin Fahy, Dawn Cotter, Manish Sud e Shankar Subramaniam, (2011). Lipid classification, structures and tools. *Biochim Biophys Acta.* 1811(11): 637-647.

Eoin Fahy, Dawn Cotter, Robert Byrnes, Manish Sud, Andrea Maer, Joshua Li, David Nadeau, Yihua Zhau, Shankar Subramaniam (2007). Bioinformatics for lipidomics. *Methods Enzymol.* 432:247-73.

Eoin Fahy, Shankar Subramaniam, H. Alex Brown, Christopher K. Glass, Alfred H. Merrill Jr, Robert C. Murphy, Christian R. H. Raetz, David W. Russell, Yousuke Seyama, Walter Shaw, Takao Shimizu, Friedrich Spener, Gerrit van Meer, Michael S. VanNieuwenhze, Stephen H. White, Joseph L. Witztum, Edward A. Dennis, (2005). A comprehensive classification system for lipids. *JLR.* Volume 46 (5): 839-861.

Evelien Rysman, Koen Brusselmans, Katrijn Scheys, Leen Timmermans, Rita Derua, Sebastian Munck, Paul P. Van Veldhoven, David Waltregny, Veerle W. Daniëls, Jelle Machiels, Frank Vanderhoydonc, Karine Smans, Etienne Waelkens, Guido Verhoeven, Johannes V. Swinnen, (2010). De novo lipogenesis protects cancer cells from free radicals and chemotherapeutics by promoting membrane lipid saturation. *Cancer Res.* 70(20):8117-26.

H. Alex Brown, Robert C. Murphy, (2009). Working towards an exegesis for lipids in biology. *Nat Chem Biol.* 5 (9): 602–606.

Hiroyuki Ariyama, Nozomu Kono, Shinji Matsuda, Takao Inoue, Hiroyuki Arai, (2010). Decrease in membrane phospholipid unsaturation induces unfolded protein response. *J Biol Chem.* 285 (29): 22027-35.

James J. Pitt, (2009). Principles and Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry in Clinical Biochemistry. *Clin Biochem Rev.* 30(1): 19–34.

Jay D. Horton, Nila A. Shah, Janet A. Warrington, Norma N. Anderson, Sahng Wook Park, Michael S. Brown, Joseph L. Goldstein., (2003). Combined analysis of

oligonucleotide microarray data from transgenic and knockout mice identifies direct SREBP target genes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (21):12027-32.

Joris Beld, D. John Lee, Michael D. Burkart, (2015). Fatty Acid Biosynthesis Revisited: Structure Elucidation and Metabolic Engineering. *Mol Biosyst.* 11(1): 38–59.

Joseph P. Dewulf, Isabelle Gerin, Mark H. Rider, Maria Veiga-da-Cunha, Emile Van Schaftingen, Guido T. Bommer, (2019). The synthesis of branched-chain fatty acids is limited by enzymatic decarboxylation of ethyl- and methylmalonyl-CoA. *Biochem J.* 476(16): 2427–2447.

Jurre J. Kamphorst, Justin R. Cross, Jing Fan, Elisa de Stanchina, Robin Mathew, Eileen P. White, Craig B. Thompson, Joshua D. Rabinowitz, (2013). Hypoxic and Ras-transformed cells support growth by scavenging unsaturated fatty acids from lysophospholipids. *PNAS.* 110 (22).

L. Potze, S. Di Franco, C. Grandela, M. L. Pras-Raves, D. I. Picavet, H. A. van Veen, H. van Lenthe, F. B. Mullauer, N. N. van der Wel, A. Luyf, A. H. C. van Kampen, S. Kemp, V. Everts, J. H. Kessler, F. M. Vaz, J. P. Medema, (2016). Betulinic acid induces a novel cell death pathway that depends on cardiolipin modification. *Oncogene.* 35(4):427-37.

Leslie Magtanong, Pin-Joe Ko, Milton To, Jennifer Yinuo Cao, Giovanni C Forcina, Amy Tarangelo, Carl C Ward, Kevin Cho, Gary J Patti, Daniel K Nomura, James A Olzmann, Scott J Dixon, (2019). Exogenous Monounsaturated Fatty Acids Promote a Ferroptosis-Resistant Cell State. *Cell Chem Biol.* 26(3):420-432.

Lishann M. Ingram, Morgan C. Finnerty, Maryam Mansoura, Chau-Wen Chou, Brian S, (2021). Identification of lipidomic profiles associated with drug-resistant prostate cancer cells. *Lipids Health Dis.* 20: 15.

Maria Pfeuffer, Anke Jaudszus, (2016). Pentadecanoic and Heptadecanoic Acids: Multifaceted Odd-Chain Fatty Acids. *Adv Nutr.* 7(4): 730–734.

Maria T Bengoechea-Alonso, Johan Ericsson, (2007). SREBP in signal transduction: cholesterol metabolism and beyond. *Review Curr Opin Cell Biol.* 19 (2): 215-22.

Marina Kniazeva, Quinn T Crawford, Matt Seiber, Cun-Yu Wang, Min Han, (2004). Monomethyl Branched-Chain Fatty Acids Play an Essential Role in *Caenorhabditis elegans* Development. *PLoS Biol.* 2(9): e257.

Mark A. Castanares, Ben T. Copeland, Wasim H. Chowdhury, Minzhi M. Liu, Ronald Rodriguez, Martin G. Pomper, Shawn E. Lupold, Catherine A. Foss, (2016). Characterization of a Novel Metastatic Prostate Cancer Cell Line of LNCaP Origin. *Prostate.* 76(2): 215–225.

Markus R. Wenk, (2005). The emerging field of lipidomics. *Nature Reviews Drug Discovery*. Volume 4: 594–610.

Markus R. Wenk, (2010). Lipidomics: New Tools and Applications. *PRIMER*.143 (6): 888-895.

Marteinn Thor Snaebjornsson, Sudha Janaki-Raman, Almut Schulze, (2020). Greasing the Wheels of the Cancer Machine: The Role of Lipid Metabolism in Cancer. *Cell Metabolism Review*. 31.

Martina Wallace, Courtney R. Green,¹ Lindsay S. Roberts, Yujung Michelle Lee, Justin L. McCarville, Joan Sanchez-Gurmaches, Noah Meurs,¹ Jivani M. Gengatharan, Justin D. Hover, Susan A. Phillips, Theodore P. Ciaraldi, David A. Guertin, Pedro Cabrales,¹ Janelle S. Ayres, Daniel K. Nomura, Rohit Loomba, Christian M. Metallo, (2019). Enzyme promiscuity drives branched-chain fatty acid synthesis in adipose tissues. *Nat Chem Biol*. 14(11): 1021–1031.

Matthew J. Watt, Ashlee K. Clark, Luke A. Selth, Vanessa R. Haynes, Natalie Lister, Richard Rebello, Laura H. Porter, Birunthi Niranjana, Sarah T. Whitby, Jennifer Lo, Cheng Huang, Ralf B. Schittenhelm, Kimberley E. Anderson, Luc Furic, Poornima R. Wijayarathne, Maria Matzaris, Magdalene K. Montgomery, Melissa Papargiris, Sam Norden, Maria Febbraio, Gail P. Risbridger, Mark Frydenberg, Daniel K. Nomura, Renea A. Taylor, (2019). Suppressing fatty acid uptake has therapeutic effects in preclinical models of prostate cancer. *Sci Transl Med*. 11(478): 5758.

Meran Keshawa Ediriweera, Ngoc Bao To, MS, Yoongho Lim, Somi Kim Cho, (2021). Odd-chain fatty acids as novel histone deacetylase 6 (HDAC6) inhibitors. *Biochimie*. 186: 147-156.

Moath Alqaraleh e Violet Kasabri, (2019). The antiglycation effect of monomethyl branched chained fatty acid and phytochemical compounds and their synergistic effect on obesity related colorectal cancer cell panel. *Rom J Diabetes Nutr Metab Dis*. 26 (4): 361-369.

Natalia Scaglia, R. Ariel Igal, (2008). Inhibition of Stearoyl-CoA Desaturase 1 expression in human lung adenocarcinoma cells impairs tumorigenesis. *Int J Oncol*. 33 (4): 839-50.

Ngoc Bao To, Yen Thi-Kim Nguyen, Jeong Yong Moon, Meran Keshawa Ediriweera, Somi Kim Cho, (2020). Pentadecanoic Acid, an Odd-Chain Fatty Acid, Suppresses the Stemness of MCF-7/SC Human Breast Cancer Stem-Like Cells through JAK2/STAT3 Signaling. *Nutrients*.12(6):1663.

Nikos Koundouros, George Pouligiannis, (2019). Reprogramming of fatty acid metabolism in cancer. *British Journal of Cancer*.122: 4–22.

Oizumi J., Giudici TA, Ng WG, Shaw KN, Donnell GN, (1981). Propionate metabolism by cultured skin fibroblasts from normal individuals and patients with methylmalonicaciduria and propionicacidemia. *Biochem Med.* 26: 28–40.

Paul P. Van Veldhoven, (2010). Biochemistry and genetics of inherited disorders of peroxisomal fatty acid metabolism. *JLR.* Volume 51, Issue 10, Pages 2863-2895.

Pellegrino R. M., Alessandra Di Veroli, Aurora Valeri, Laura Goracci, Gabriele Cruciani, (2014). LC/MS lipid profiling from human serum: a new method for global lipid extraction. *Anal Bioanal Chem.* 406 (30): 7937-48.

Peter J. Mullen, Rosemary Yu, Joseph Longo, Michael C. Archer, Linda Z. Penn (2016). The interplay between cell signalling and the mevalonate pathway in cancer. *Nature Reviews Cancer* .16(11): 718.

Rimsha Munir, Jan Lisec, Johannes V. Swinnen, Nousheen Zaidi, (2019). Lipid metabolism in cancer cells under metabolic stress. *British Journal of Cancer.*120: 1090–1098.

S. Beloribi-Djefaffia, S. Vasseur, F. Guillaumond, (2016). Lipid metabolic reprogramming in cancer cells. *Oncogenesis* 5:189.

Santaren ID, Watkins SM, Liese AD, Wagenknecht LE, Rewers MJ, Haffner SM, Lorenzo C, Hanley AJ, (2014). Serum pentadecanoic acid (15:0), a short-term marker of dairy food intake, is inversely associated with incident type 2 diabetes and its underlying disorders. *Am J Clin Nutr.*100:1532–40.

Shankar Subramaniam, Eoin Fahy, Shakti Gupta, Manish Sud, Robert W. Byrnes, Dawn Cotter, Ashok Reddy Dinasarapu, Mano Ram Maurya (2012). Bioinformatics and Systems Biology of the Lipidome *Chem Rev.*111(10): 6452–6490.

Sperl W., Murr C, Skladal D, Sass JO, Suormala T, Baumgartner R, Wendel U, (2000). Odd-numbered long-chain fatty acids in propionic acidaemia. *Eur J Pediatr.* 159: 54–8

The LIPID MAPS Lipidomics Gateway, <https://www.lipidmaps.org/>.

Thomas Porstmann, Claudio R Santos, Beatrice Griffiths, Megan Cully, Mary Wu, Sally Leever, John R Griffiths, Yuen-Li Chung, Almut Schulze, (2008). SREBP activity is regulated by mTORC1 and contributes to Akt-dependent cell growth. *Cell Metab.* 8 (3): 224-36.

Wenjun Wang, Ling Bai, Wei Li, Jiuwei Cui, (2020). The Lipid Metabolic Landscape of Cancers and New Therapeutic Perspectives. *Front. Oncol.* <https://doi.org/10.3389/fonc.2020.605154>.

Young-kyoung Park, Rodrigo Ledesma-Amaro, Jean-Marc Nicaud, (2020). De novo Biosynthesis of Odd-Chain Fatty Acids in *Yarrowia lipolytica* Enabled by

Modular Pathway Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.*
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2019.00484>

Zachary T. Schug, Christian Frezza, Laura C. A. Galbraith e Eyal Gottlieb, (2012).
The music of lipids: How lipid composition orchestrates cellular behaviour. *Acta
Oncologica*. 51 (3): 301-310.