



UNIVERSITAT DE
BARCELONA

Metabolisme dels esfingolípid. Noves metodologies i efecte sobre l'autofàgia

Mireia Casasampere Ferrer

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



METABOLISME DELS ESFINGOLÍPIDS

Noves metodologies i
efecte sobre l'autofàgia

MIREIA CASASAMPERE FERRER

2017



UNIVERSITAT DE
BARCELONA



CSIC
CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UNIVERSITAT DE BARCELONA
FACULTAT DE BIOLOGIA
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

**METABOLISME DELS ESFINGOLÍPIDS:
NOVES METODOLOGIES I EFECTE SOBRE L'AUTOFÀGIA**

Memòria presentada per Mireia Casasampere Ferrer per optar al grau de
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada en el Departament de Química Biomèdica,
Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)

Mireia Casasampere Ferrer
Doctoranda

Josefina Casas Brugulat
Directora

Josep Centelles Serra
Tutor

Il·lustració de la coberta: David S. Goodsell, RCSB PDB.
La seva reproducció és permesa en base a la llicència CC-BY-4.0.

Per als qui estimo

“No vull fer allò que fa tothom,
m'estimo més gaudir del que no interessa a ningú”

Yoshinori Ohsumi

Aquest treball ha estat recolzat per les beques del Ministeri Espanyol de Ciència i Tecnologia (SAF2011-22444), d'Economia i Competitivitat (CTQ2014-54743-R) i per la "Fundació La Marató de TV3" (20112130 i 20112132).

Seguidament es mostra una relació dels articles publicats durant la realització d'aquesta tesi doctoral:

- 1** M. Casasampere, E. Gorrochategui, R. Tauler, G. Fabrias, J. Casas. Chemometric evaluation of glioma cell lipidoma in response to proautophagic compounds (manuscrit en preparació)
- 2** P. Sanllehí, M. Casasampere, O. López, J.L. Abad, G. Fabrias, J. Bujons, J. Casas, A. Delgado. Improved fluorogenic sensors for the *in vivo* quantification of sphingosine-1-phosphate lyase activity (enviat a *Chemistry-A European Journal*)
- 3** M. Casasampere, Y.F. Ordóñez, J. Casas, G. Fabrias. Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*. **2017**; 1861: 264-75
- 4** M. Casasampere, Y.F. Ordóñez, A. Pou, J. Casas. Inhibitors of dihydro-ceramide desaturase 1: therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology. *Chemistry and Physics of Lipids*. **2016**; 197: 33-44
- 5** M. Casasampere, L. Camacho, F. Cingolani, J. Casas, M. Egido-Gabás, J.L. Abad, C. Bedia, R. Xu, K. Wang, D. Canals, Y.A. Hannun, C. Mao, G. Fabrias. Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic *N*-acylated coumarin-containing aminodiols. *Journal of Lipid Research*. **2015**; 56: 2019-28
- 6** F. Cingolani, M. Casasampere, P. Sanllehí, J. Casas, J. Bujons, G. Fabrias. Inhibition of dihydroceramide desaturase activity by the sphingosine kinase inhibitor SKI II. *Journal of Lipid Research*. **2014**; 55: 1711-20

ABREVIATURES

La següent llista no inclou les abreviatures emprades en els articles d'aquesta tesi, els quals compten amb la seva pròpia llista d'abreviatures.

·OH	Radical hidroxil
·O ₂ ⁻	Radical superòxid
3MA	3-Metiladenina
4-HPR	4-hidroxifenilretinamida o fenretinida
AC	Ceramidasa àcida
ACER/s	Ceramidasa/es alcalina/es
ACER1	Ceramidasa alcalina 1
ACER2	Ceramidasa alcalina 1
ACER3	Ceramidasa alcalina 3
Akt	Proteïna cinasa B
AINE/s	Antiinflamatori/s no esteroïdal/s
AMPK	Proteïna cinasa activada per AMP
aPHC	Fitoceramidasa alcalina o ACER3
aSMasa	Esfingomielinasa àcida
ATF6	Activador del factor de transcripció 6
BITC	Benzil isotiocianat
C1P	Ceramida-1-fosfat
CaMKK	“Ca ²⁺ calmodulin dependent kinase kinase”
CCX	Celecoxib
CDasa /es	Ceramidasa/es
Cer	Ceramida/es
CerK	Ceramida cinasa
CerS	Ceramida sintasa/es
CERT	Proteïna de transferència de ceramida
CMA	Autofàgia per xaperones
COX	Ciclooxigenasa
COX-1	Ciclooxigenasa 1
COX-2	Ciclooxigenasa 2
COX-3	Ciclooxigenasa 3
CPTP	Proteïna de transferència de ceramida-1-fosfat
d2dhCer	Dihidroceramides deuterades
DCF	2,7-Diclorofluoresceïna
Des1	Dihidroceramida dessaturasa 1
Des2	Dihidroceramida dessaturasa 2
dhCer	Dihidroceramida/es
dhS1P	Esfinganina-1-fosfat
dhSM	Dihidroesfingomielina/es
DIPACS	Inhibidors de Des1 pro-autofàgics
DLS	Dispersió dinàmica de la llum
DMEM	“Dulbecco's modified Eagle's medium”
DOGS	Diocadecil-amido-glicil-espermina

DOTAP	1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetilamoni)propà
DOTMA	<i>N</i> -[1-(2,3-dioleiloxi)propil]- <i>N,N,N</i> -trimetilamoni
EE	Eficiència d'encapsulació
EGFR	Receptor del factor de creixement epidèrmic
ER	Reticle endoplasmàtic
FAPP2	Proteïna adaptadora quatre fosfat 2
FDA	Administració d'aliments i fàrmacs dels Estats Units
FRET	Transmissió d'energia de ressonància
GABARAP	"Gamma-aminobutyric acid type A receptor-associated protein"
GBA	Glucocerebrosidasa
GC/MS	Cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses
GlcCer	Glucosilceramida/es
GlcCerS	Glucosilceramida sintasa
GlcDhCer	Glucosildihidroceramida/es
GSL	Glucoesfingolípid complexos
GT11	C8-ciclopropenilceramida
GUV	Vesícules unilaminars gegants
H ₂ DCFDA	Diacetat de 2,7-diclorodihidrofluoresceïna
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
hS1PL	S1PL recombinant humana
HTS	Cribratge d'alt rendiment
IC ₂₅	Concentració inhibidora 25%
IC ₅₀	Concentració inhibidora 50%
IRE1	"Inositol requiring enzyme 1"
JNK1	Proteïna cinasa c-Jun N-terminal 1
K _i	Constant d'inhibició enzimàtica
K _M	Constant cinètica de Michaelis
KSa	3-cetoesfinganina
KDSR	3-cetoesfinganina reductasa
LacdhCer	Lactosildihidroceramida/es
Lamp-2A	Proteïna associada a la membrana del lisosoma 2A
LC/MS	Cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses
LC3	Proteïna associada a microtúbuls de cadena lleugera 1A/1B 3
LacCer	Lactosilceramida/es
LUV	Vesícules unilaminars grans
mTOR	Diana de rapamicina en mamífers
MAM	Membranes associades al mitocondri
MAPK	Proteïna cinasa activada per mitogens
MCR-ALS	Resolució de corbes per mínims quadrats alternats
MLV	Vesícules multilaminars
MVV	Vesícules multivesiculars
NC	Ceramidasa neutra
NDA	Naftalè-2,3-dialdehid
nSMasa	Esfingomielinasa neutra
OLV	Vesícules oligolaminars

PC	Fosfatidilcolina
PE	Fosfatidiletanolamina
PEA	Fosforiletanolamina
PERK	“PKR-like eIF2 α quinase”
PFBHA	Penta-fluorobencil-hidroxilamina
PHS	Fitoesfingosina
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinasa
PI3KC1	Fosfatidilinositol-3-cinasa classe I
PI3KC3	Fosfatidilinositol-3-cinasa classe 3
PI(3)P	Fosfatidilinositol-3-fosfat
PLS-DA	Anàlisi discriminant amb mínims parcials quadrats
PROC	Càncer d'ovari resistent al platí
PS	Fosfatidilserina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat 3-fosfatasa
PXD	Fenoxodiol
ROS	Espècies reactives d'oxigen
Rb	Proteïna del retinoblastoma
RV	Resveratrol
S1P	Esfingosina-1-fosfat
S1PL	Esfingosina-1-fosfat liasa
S1PP	Esfingosina-1-fosfat fosfatasa
S1PR/s	Receptor/s d'esfingosina-1-fosfat
Sa	Esfinganina o dihidroesfingosina
SK	Esfingosina cinasa/es
SM	Esfingomielina/es
SMasa	Esfingomielinasa
SMS	Esfingomielina sintasa/es
So	Esfingosina
SOD	Superòxid dismutasa
SPT	Serina palmitoiltransferasa
SKI-II	Inhibidor de l'esfingosina cinasa 2
SQSTM1	Proteïna sequestosoma 1 o p62
SRB	Sulforodamina B
SUV	Vesícules unilaminars petites
TAG	Triacilglicerols
THC	Δ^9 -tetra-hidrocannabinol
ULK	“Unc51-like kinase”
ULV	Vesícules unilaminars
UPLC-TOF	Cromatografia líquida d'ultra alta resolució acoblada a un espectròmetre de masses tipus temps de vol
UPR	Resposta a proteïnes mal plegades
V _{max}	Constant de velocitat màxima
WIP1s	“WD repeat domain phosphoinositide interacting”
γ -T	γ -tocoferol
γ -TE	γ -tocotrienol

ÍNDEX

INTRODUCCIÓ

1 Esfingolípid	3
1.1 Estructura dels esfingolípid	3
1.2 Biosíntesi dels esfingolípid	4
1.3 Compartimentalització	7
2 Els esfingolípid en senyalització cel·lular	9
2.1 Esfingolípid bioactius	9
2.1.1 Ceramida	9
2.1.2 Dihidroceramida	10
2.1.3 Esfingosina-1-fosfat	11
2.2 Enzims del metabolisme dels esfingolípid	13
2.2.1 Dihidroceramida dessaturasa 1	13
2.2.1.1 Inhibidors de Des1	15
2.2.2 Ceramidases	17
2.2.2.1 Ceramidasa àcida	18
2.2.2.2 Ceramidasa neutra	19
2.2.2.3 Ceramidases alcalines	20
2.2.2.3.1 Ceramidasa alcalina 1	20
2.2.2.3.2 Ceramidasa alcalina 2	20
2.2.2.3.3 Ceramidasa alcalina 3	21
2.2.2.4 Mètodes per determinar l'activitat CDasa	22
2.2.3 Esfingosina-1-fosfat liasa	23
2.2.3.1 Mètodes per determinar l'activitat S1PL	26
3 Autofàgia	28
3.1 Tipus d'autofàgia	28
3.2 Vies de regulació de l'autofàgia	30
3.3 Autofàgia i esfingolípid	33
3.4 Relació entre autofàgia i apoptosi	35
3.5 Autofàgia i càncer	36

4 Inhibidors de Des1 que indueixen l'autofàgia (DIPACS)	38
4.1 Celecoxib	38
4.2 Resveratrol	39
4.3 Fenoxodiol	41
5 Liposomes	42
5.1 Liposomes catiònics	44
5.2 Liposomes com a transportadors de fàrmacs	45
OBJECTIUS	49
RESULTATS	
Capítol 1	
Determinació de l'activitat ceramidasa alcalina utilitzant aminodiols fluorogènics cumarínics	
ARTICLE 1	
“Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic <i>N</i> -acylated coumarin-containing aminodiols”	55
RESULTATS ADDICIONALS	
Estudi de la hidròlisi del substrat RBM14 per l'ACER3	69
Capítol 2	
Determinació de l'activitat esfingosina-1-fosfat liasa en cèl·lules intactes utilitzant sensors fluorogènics encapsulats en liposomes catiònics	
ARTICLE 2	
“Improved fluorogenic sensors for the <i>in vivo</i> quantification of sphingosine-1-phosphate lyase activity”	75
RESULTATS ADDICIONALS	
Elecció del model cel·lular per l'estudi	113
Validació dels liposomes RBM148 en la recerca d'inhibidors de la S1PL	116

Capítol 3

Validació del paper de les dihidroceramides en la inducció d'autofàgia i la seva repercussió en el destí cel·lular

ARTICLE 3

“Inhibitors of dihydroceramide desaturase 1: therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology” 121

ARTICLE 4

“Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms” 135

ARTICLE 5

“Chemometric evaluation of glioma cell lipidoma in response to proautophagic compounds” 157

RESULTATS ADDICIONALS

Elecció del model cel·lular per l'estudi 185

Anàlisi de l'efecte de ROS en T98G i U87MG 193

RESUM DELS RESULTATS 199

DISCUSSIÓ 205

CONCLUSIONS 223

BIBLIOGRAFIA 227

INTRODUCCIÓ

1 Esfingolípidis

Les membranes lipídiques de les cèl·lules de mamífer estan constituïdes majoritàriament per tres classes de lípids diferents: glicerols, esterols i esfingolípidis. Aquests es classifiquen segons l'estructura del seu esquelet hidrofòbic. Els esfingolípidis són una classe de lípids de membrana derivats de l'amino-alcohol esfingosina i són presents en totes les membranes eucariotes.

En 1884 J.L.W Thudichum¹ va ser el primer en identificar i aïllar aquesta nova molècula que posteriorment seria caracteritzada com esfingosina. Inspirant-se en la figura mitològica de l'esfinx i a la seva naturalesa enigmàtica va anomenar a aquests tipus de compostos esfingolípidis². Els esfingolípidis constitueixen una família extensa de lípids amb una gran varietat de funcions. A més del seu paper estructural en les membranes, els esfingolípidis són molècules implicades en diferents processos cel·lulars com creixement, mort, senescència, adhesió, migració, inflamació, diferenciació i transport intracel·lular³.

1.1 Estructura dels esfingolípidis

Com tots els lípids de membrana, els esfingolípidis són molècules amfipàtiques amb propietats hidrofòbiques i hidrofíliques. Generalment estan compostats per un cap polar i dos cues apolars. Una d'elles és un amino-alcohol que en mamífers és corrent que estigui formada per divuit carbonis, també anomenada base esfingoide, i un àcid gras de longitud variable unit mitjançant un enllaç *N*-acil (figura 1).



Figura 1: Estructura representativa dels esfingolípidis on l'esquelet hidrofòbic de cadena llarga (base esfingoide) s'uneix a l'àcid gras. R representa els diferents grups polars

En mamífers les bases esfingoides més abundants són l'esfingosina (So), l'esfinganina (Sa), també anomenada dihidroesfingosina, o la fitoesfingosina (PHS). Aquestes estructures poden existir en la seva forma lliure o bé formant part d'esfingolípidis més complexos que contenen un acil gras mitjançant un enllaç amida. Els esfingolípidis es poden classificar segons la base esfingoide, els àcids grassos units al grup amino i pels diferents grups polars.

Així doncs la So, la Sa i la PHS *N*-acilades esdevenen la ceramida (Cer), la dihidroceramida (dhCer) i la fitoceramida respectivament (figura 2). La Cer és l'esfingolípid amb la regió polar més simple, formada per dos grups hidroxil. La

substitució d'aquest grup en posició 1 dona lloc als derivats de la Cer. Els glicoesfingolípids el presenten glicosilat amb una gran varietat de carbohidrats, essent la glucosilceramida (GlcCer) el representant més senzill, mentre que l'esfingomielina (SM) hi té una fosforilcolina. L'addició d'un fosfat genera la ceramida-1-fosfat (C1P) o l'esfingosina-1-fosfat (S1P). La llargada de la cadena de l'àcid gras, així com els graus de insaturació dona lloc a una gran diversitat d'espècies d'esfingolípids que varien en la solubilitat i també en les propietats biològiques. Des del seu descobriment, s'han identificat milers d'espècies diferents⁴.

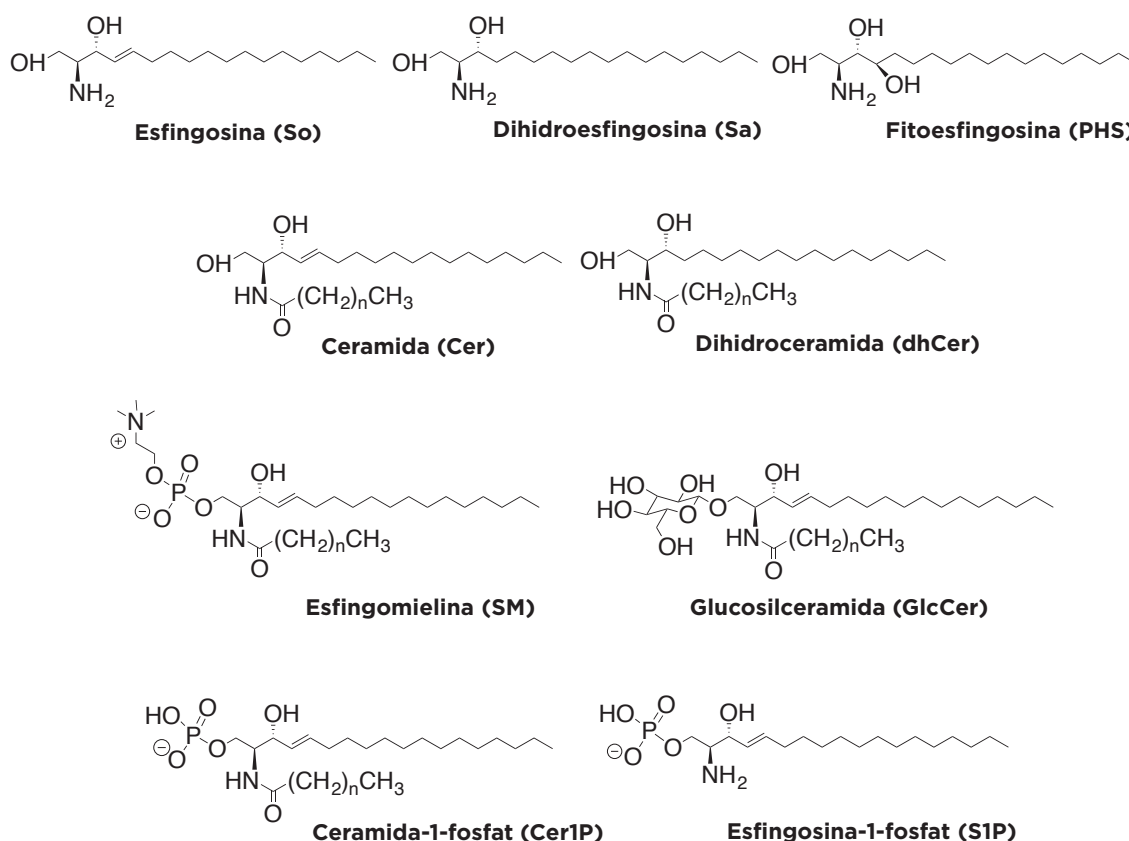


Figura 2: Estructura dels esfingolípids més representatius en mamífers

1.2 Biosíntesi dels esfingolípids

L'àrea d'estudi dels esfingolípids més coneguda és el seu metabolisme on s'han descrit les vies bioquímiques de síntesi i degradació, així com tots els enzims involucrats. La Cer, la principal molècula del metabolisme dels esfingolípids, és generalment sintetitzada per la via anabòlica *de novo* a partir de precursors que no són esfingolípids (figura 3). Tot i així també existeixen dos vies alternatives que generen Cer; la via catabòlica amb la hidròlisi de lípids complexos, especialment la SM i la via de reciclatge de les bases esfingoides (figura 4).

La biosíntesi *de novo* implica diverses etapes enzimàtiques. S'inicia amb la condensació de la *L*-serina amb el palmitoil-CoA, per generar 3-cetoesfinganina (KSa). Aquesta reacció està catalitzada per l'enzim heterodimèric serina palmitoiltransferasa (SPT)⁵, dependent de piridoxal fosfat. La base esfingoide de 18 carbonis, generada quan la SPT utilitza palmitoil-CoA com a substrat, és la base esfingoide més abundant i per això els esfingolípids en eucariotes generalment contenen un esquelet de 18 carbonis. No obstant, en alguns casos, la SPT pot utilitzar com a substrat l'estearoil-CoA per generar esfingolípids de 20 carbonis, o el miristoil-CoA que comporta la formació d'una base esfingoide de 16 carbonis⁶. Seguidament la KSa és reduïda a Sa per la 3-cetoesfinganina reductasa (KDSR).

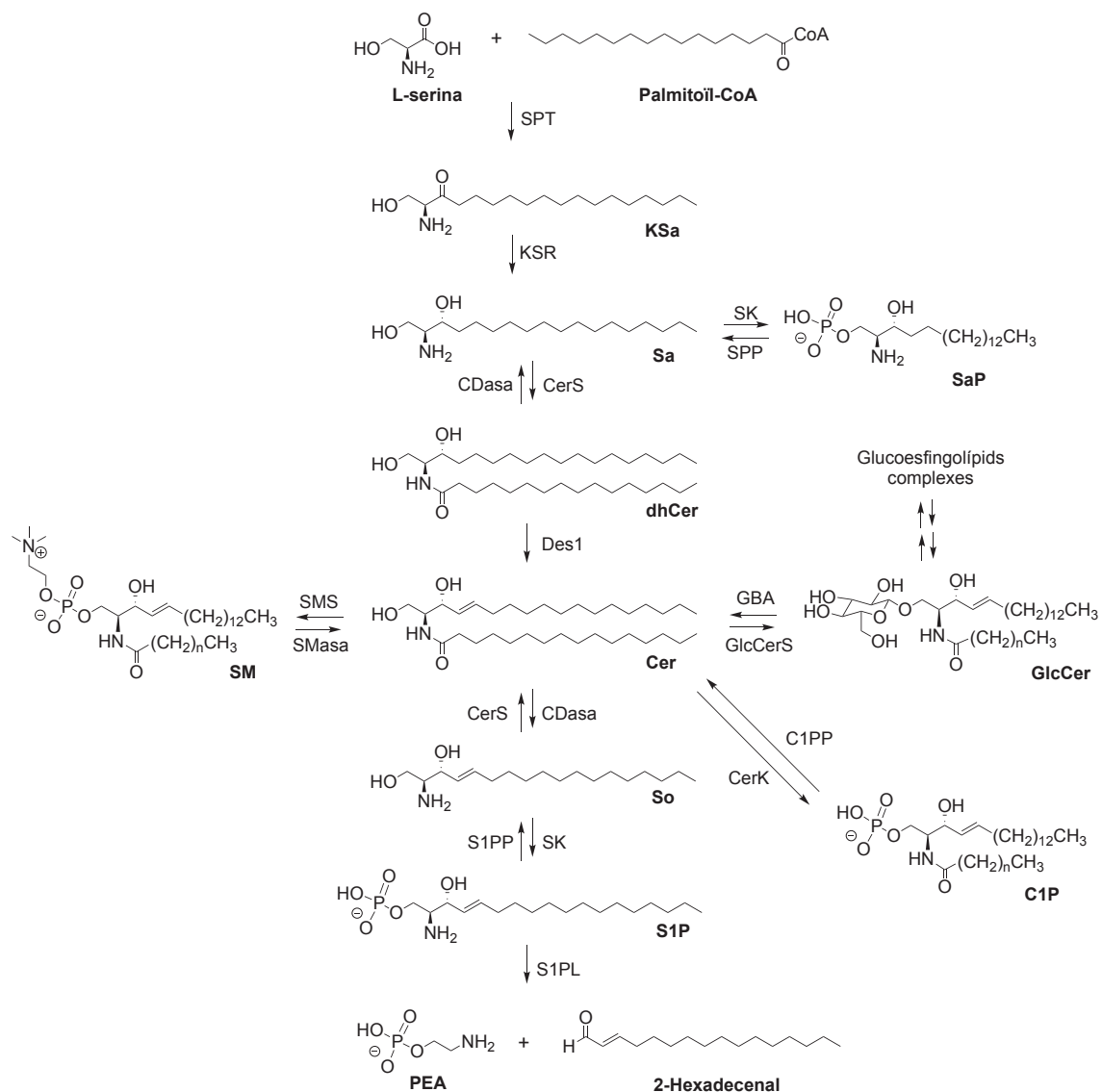


Figura 3: Vies del metabolisme dels esfingolípids. Abreviatures: KSa, 3-cetoesfinganina; Sa, esfinganina; SaP, esfinganina-1-fosfat; dhCer, dihidroceramida; Cer, ceramida; So, esfingosina; S1P, esfingosina-1-fosfat; PEA, fosforiletanolamina; SM, esfingomielina; GlcCer, glucosilceramida; C1P, ceramida-1-fosfat; SPT, serina palmitoiltransferasa; KSR, 3-cetoesfinganina reductasa; CDasa, ceramidasa; CerS, ceramida sintasa; Des1, dihidroceramida dessaturasa; S1PP, esfingosina-1-fosfat fosfatasa; SK, esfingosina cinasa; S1PL, esfingosina-1-fosfat liasa; SMS, esfingomielina sintasa; SMasa, esfingomielinasa; GlcCerS, glucosilceramida sintasa; GBA, glucocerebrosidasa; CerK, ceramida cinasa; C1PP, ceramida-1-fosfat fosfatasa

Una acilació de l'estructura esfingoide uneix l'àcid gras corresponent per produir dhCer. Aquesta reacció la realitzen diferents ceramides sintases (CerS) amb diferent especificitat per la llargada de la cadena de l'àcid gras⁷. La inserció del doble enllaç *cis* (dessaturació) en la posició 4-5 de la dhCer per generar Cer és donat per l'enzim dihidroceramida dessaturasa 1 (Des1)⁴. La Cer, i en menor mesura la dhCer, són metabolitzades més tard a esfingolípids complexos com la (dihidro)esfingomielina (dhSM/SM) o la glucosil(dihidro)ceramida (GlcCer /GlcCer). Mitjançant vies dependents o independents de vesícules⁸, la Cer és transportada des del reticle endoplasmàtic (ER) a l'aparell de Golgi per convertir-se en la precursora dels esfingolípids complexos afegint substituents específics en la posició C₁-OH de la Cer. Així la Cer es metabolitza a SM per acció de les esfingomielines sintases (SMS1 i SMS2) que afegix un grup fosforilcolina⁹, a glucoesfingolípids (per acció de la glucosilceramida sintasa (GlcCerS)¹⁰, o a C1P per acció de la ceramida cinasa (CerK)¹¹. La Cer també pot ser hidrolitzada per diferents ceramidases (CDasa) per regenerar So que és substrat de les esfingosina cinases (SK1 i SK2) per formar S1P¹². L'acció irreversible de la esfingosina-1-fosfat liasa (S1PL) permet obtenir els productes finals de la via; la fosforetanolamina (PEA) i l'hexadecenal¹³. D'altra banda la S1P també es pot metabolitzar a So per l'esfingosina-1-fosfat fosfatasa (S1PP).

La degradació d'esfingolípids complexos és a la vegada una font de Cer. En la via catabòlica, la hidròlisi de SM per part de les diferents esfingomielinases àcida (aSMasa) o neutra (nSMasa) genera Cer i fosforilcolina¹⁴. Aquesta font de Cer, generalment anomenada via de l'esfingomielinasa (SMasa) té lloc en el lisosoma, membrana plasmàtica i mitocondri. La degradació de glucoesfingolípids complexos (GSL) per hidrolases lisosomals específiques també genera Cer. També forma part de la via catabòlica la hidròlisi del esfingolípido fosforilat C1P per obtenir Cer. Finalment en la via de reciclatge¹⁵ iniciada en el lisosoma, la hidròlisi de S1P per la S1PP i l'acció de la CerS permet produir Cer a partir de So.

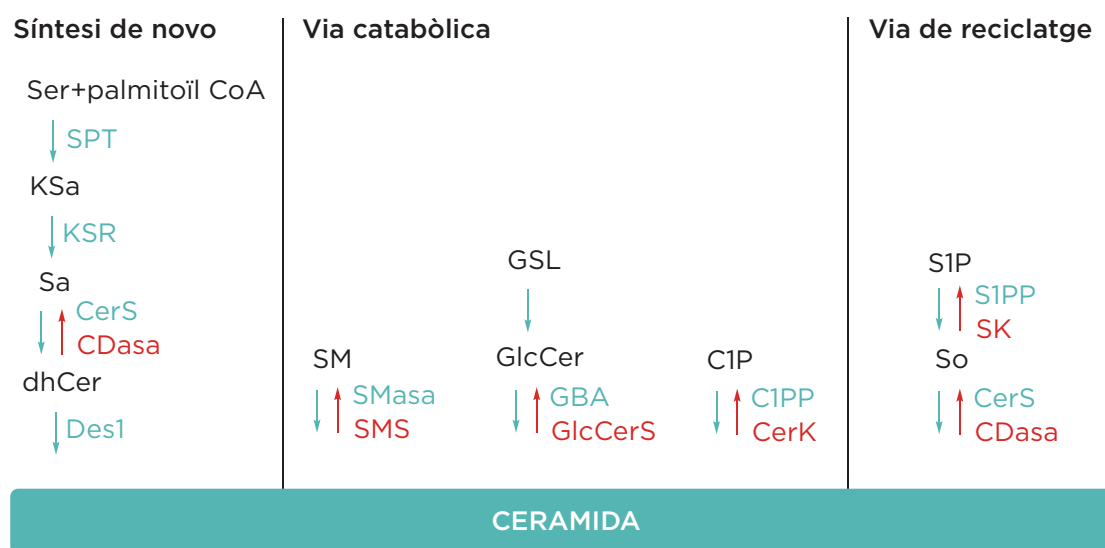


Figura 4: Resum de les vies metabòliques involucrades en la síntesi de Cer. Modificat a partir de Mencarelli i col., 2013¹⁶

L'homeòstasi metabòlica cel·lular de l'esfingolipidoma sovint s'aconsegueix gràcies a la coordinació entre la biosíntesi i la degradació de les diferents espècies d'esfingolípids. És per això que és imprescindible assolir un equilibri entre la biosíntesi *de novo*, la via catabòlica i la via de reciclatge⁴.

1.3 Compartimentalització

La biosíntesi dels esfingolípids consisteix en una seqüència de reaccions enzimàtiques altament conservades que tenen lloc en diferents compartiments cel·lulars¹⁷ (figura 5). Les primeres etapes de la via de síntesi *de novo* de la Cer es produeixen en la cara citosòlica del ER i en altres membranes com la membrana perinuclear i les membranes associades al mitocondri (MAM), una estructura membranosa implicada en la senyalització cel·lular i que es troba associada tant al mitocondri com al ER¹⁸. L'addició posterior d'un cap polar a la Cer per formar SM i GlcCer es dona en l'aparell de Golgi. Degut a la seves propietats hidrofòbiques la translocació de la Cer des del ER a l'aparell de Golgi per generar els esfingolípids complexos, es fa mitjançant mecanismes actius i no per transferència espontània pel citosol.

Aquest transport, amb la presència o no de vesícules, va ser demostrat per Fukasawa i col·laboradors¹⁹. Una de les proteïnes que s'han caracteritzat com a responsables d'aquest transport no-vesicular és la proteïna de transferència de ceramida (CERT)²⁰. En primer lloc, les SM es sintetitzen en la cara luminal del Golgi. La síntesi de SM és dependent de CERT. En canvi les GlcCer es sintetitzen en la cara citosòlica de Golgi. El transport de Cer a Golgi, en aquest cas, és independent de CERT, és a dir, a través de transport vesicular. Les GlcCer sintetitzades en la regió *cis*-Golgi, es transporten fins als compartiments *trans*-Golgi mitjançant la proteïna FAPP2 (proteïna adaptadora quatre fosfat 2)²¹. És en aquesta regió on es troben els enzims encarregats de sintetitzar la lactosilceramida (LacCer) i GSL. Per la formació d'aquestes molècules complexos la GlcCer necessita passar de la superfície citosòlica al lumen del Golgi mitjançant la glicoproteïna-P o MDR1²².

Una vegada sintetitzades, tant les SM com les GlcCer produïdes en el Golgi són generalment conduïdes a la membrana plasmàtica per transport vesicular. En la membrana plasmàtica actuen la SMasa, CDasa i SK per generar Cer, So i S1P respectivament. La Cer es pot fosforilar per donar C1P mitjançant la CerK en la cara citosòlica del Golgi. A diferència de les SM i les GlcCer, la C1P no es transporta a través de vesícules, sinó que necessita la proteïna específica CPTP (proteïna de transferència ceramida-1-fosfat) per arribar a la membrana plasmàtica o altres compartiments cel·lulars²³. Paral·lelament en els lisosomes es troben les formes àcides de la SMasa, glucocerebrosidasa (GBA) i CDasa que hidrolitzen a So els esfingolípids complexos provinents de la membrana plasmàtica i que mitjançant l'endocitosi arriben al lisosoma. Aquesta via s'anomena via de reciclatge. La base

lliure és capaç de sortir del lisosoma i gràcies a la seva solubilitat es pot transportar a través de membranes fins arribar al ER on es recicla per a la síntesi de Cer.

El metabolisme dels esfingolípids també està present en el nucli ja que la SM és un component de la matriu nuclear²⁴. Aquesta és hidrolitzada gràcies a la SMasa i CDasa neutra per generar So. La isoforma nuclear de la SK, la SK2 és la responsable de formar S1P que podria intervenir en la transcripció de determinats gens²⁵. En el mitocondri es troben diversos esfingolípids i Cer. Tot i que les Cer poden arribar al mitocondri des del ER a través del contacte entre les membranes dels dos orgànuls, en el mitocondri també és genera Cer, a través de la CerS o una isoforma reversa de la CDasa neutra²⁶.

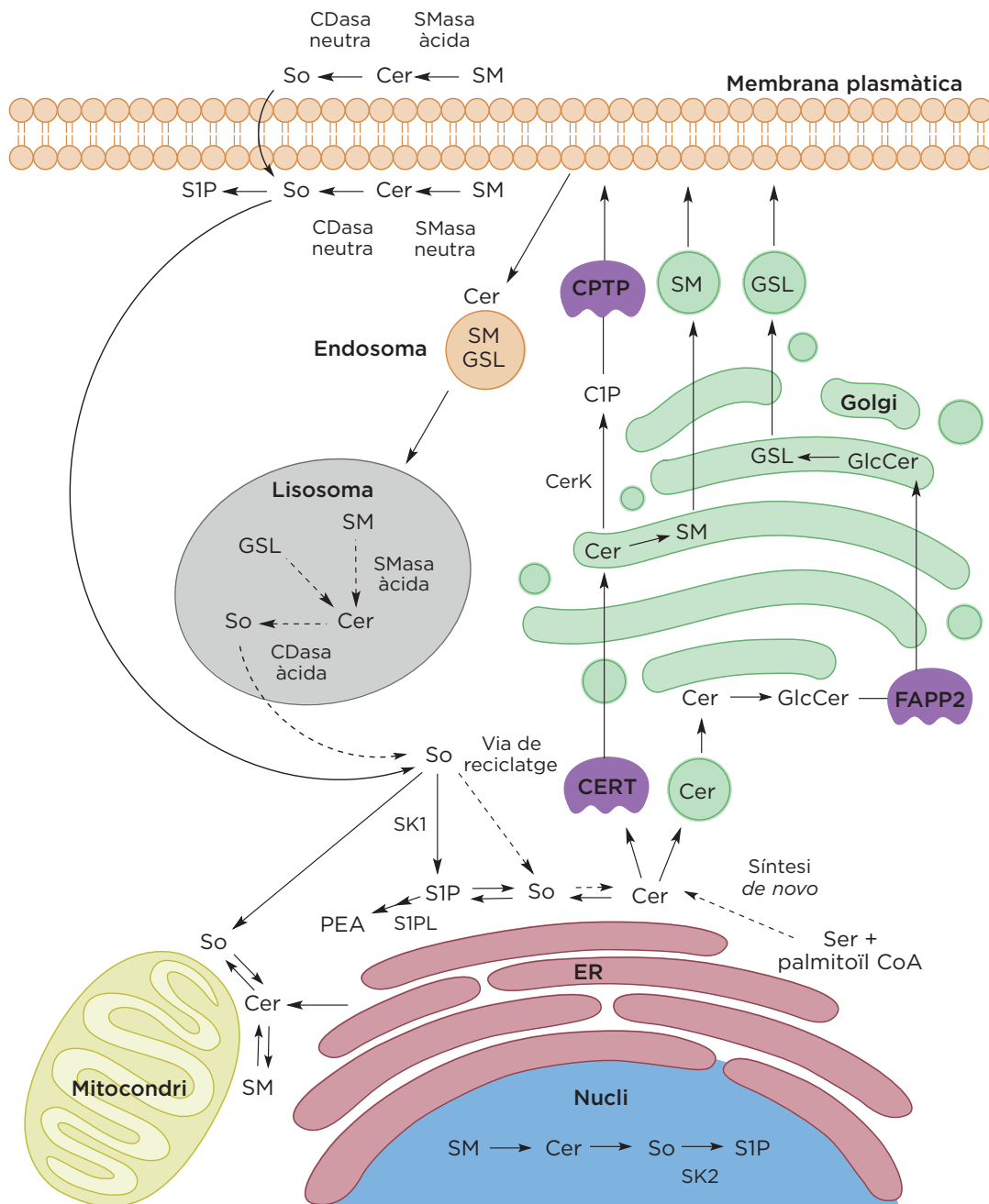


Figura 5: Compartimentalització del metabolisme dels esfingolípids.

2 Els esfingolípidis en senyalització cel·lular

El metabolisme dels esfingolípidis pot ser regulat en múltiples nivells, des del control de l'expressió dels enzims que formen la via, fins a mecanismes al·lostèrics. Les funcions de senyalització i regulació de cada un dels diversos esfingolípidis de manera individual explica la gran diversitat estructural d'aquestes molècules i la complexitat de les vies del seu metabolisme.

2.1 Esfingolípidis bioactius

A més de servir com a base estructural de les membranes cel·lulars, la Cer i els seus productes metabòlics són molècules que regulen vies de senyalització implicades en diversos processos fisiològics i fisiopatològics com proliferació, apoptosi, autofàgia, angiogènesi, diferenciació, migració, senescència i resposta inflamatòria. Tot i que els esfingolípidis són moduladors essencials en la dinàmica cel·lular, la seva desregulació i/o canvis en la localització espai-temporal pot comportar l'aparició i progressió de malalties²⁷.

2.1.1 Ceramida

Segurament, l'esfingolípid que s'ha estudiat amb més profunditat és la Cer, molècula clau en el metabolisme dels esfingolípidis. S'ha descrit la implicació de les Cer en diversos processos cel·lulars, que inclouen l'apoptosi, aturada del cicle cel·lular, senescència i diferenciació cel·lular²⁸. L'anàlisi de l'esfingolipidoma per espectrometria de masses ha permès aprofundir en l'estudi del paper de les diferents espècies de Cer²⁹. La diversitat d'espècies de Cer predominantment és deguda a la heterogeneïtat de la cadena de l'àcid gras, determinat per l'activitat de sis CerS diferents. Aquestes CerS presenten preferències específiques per l'àcid gras i d'aquesta manera cada CerS és la responsable de la formació de determinades espècies de Cer³⁰. La longitud i les insaturacions de la cadena de l'àcid gras unit a la base esfingoide, determinarà les propietats fisicoquímiques de la Cer i per tant també les seves propietats fisiològiques³¹.

Les funcions biològiques de la Cer també estant controlades per la seva localització subcel·lular²⁸. Així s'ha descrit que la Cer generada en la membrana plasmàtica a partir de la SM, activa vies de senyalització associades amb la inhibició del creixement i mort cel·lular per estrès oxidatiu. En el mitocondri la funció més important de la Cer és la de missatger cel·lular en l'apoptosi³². Principalment els efectes originats per la Cer convergeixen a nivell del mitocondri, on s'inhibeixen les proteïnes anti-apoptòtiques Bcl-2 i Bcl-XL i es produeix una disminució del potencial de membrana mitocondrial, facilitant la creació de porus i l'alliberació del citocrom C. La sortida del citocrom C al citosol desencadena la formació de l'apoptosoma i la conseqüent activació de les caspases, iniciant així el procés de mort apoptòtica

intrínseca. Les Cer també poden ser generades en el lisosoma per acció de la SMasa àcida i interaccionar amb la catepsina D que regula l'activació de la proteïna BID que comporta la inducció de l'apoptosi³³. Les Cer generades en el ER poden actuar en el nucli, ja que les estructures membranoses dels orgànuls estant connectades. Entre altres funcions, les Cer en el nucli inhibeixen l'activitat telomerasa, regulant així la senescència i l'envelliment³⁴ o mitjançant l'activació de la fosfatasa-1 indueixen el *splicing* alternatiu de la pro-apoptòtica caspasa-9³⁵.

A part de l'apoptosi, un dels efectes més caracteritzats de la Cer és la seva capacitat d'induir aturada del cicle cel·lular en la fase G₀/G₁ a través de l'activació de la proteïna del retinoblastoma (Rb)³⁶. A més també s'ha descrit la seva implicació en l'aturada del cicle cel·lular mitjançant la modulació de cinases dependents de ciclins com la cdk2³⁷ i en la regulació de la diferenciació cel·lular²⁸. Finalment la Cer també ha estat relacionada amb l'autofàgia¹⁷, participant en la regulació de la proteïna autofàgica Beclin 1.

2.1.2 Dihidroceramida

Les dhCer inicialment es van considerar lípids innocus intermediaris de les Cer, però actualment són moltes les evidències que demostren que són elements clau per diverses vies de senyalització cel·lular. En segons quins processos cel·lulars, les dhCer, en contrapartida amb les Cer són mediadors molt poc efectius; i és per això que es va arribar a creure que les dhCer eren biològicament inactives. No va ser fins al 2006 quan Stiban i col·laboradors van canviar aquest pensament. Van descriure la capacitat de les dhCer d'inhibir la formació de canals mitocondrials induïts per Cer, i la conseqüent inhibició de l'alliberació de molècules apoptòtiques que resultava en mort per apoptosi³⁸. El mateix any també es va publicar un estudi pioner en el grup del professor Merrill³⁹ en que es feia responsable a les dhCer de la formació de l'autofagosoma en el procés de l'autofàgia. En aquests treballs s'assignava per primera vegada una resposta biològica a les dhCer i va inspirar a molts altres grups, entre d'altres el nostre, a investigar el paper de les dhCer en respostes cel·lulars. Paral·lelament, gràcies a les innovacions en el camp de l'espectrometria de masses i el desenvolupament de noves tècniques de cromatografia líquida, es va poder diferenciar entre Cer i dhCer, obrint un nou camp d'investigació sobre el paper de les dhCer en la senyalització cel·lular.

El paper de les dhCer en l'apoptosi és contradictori. Alguns grups han implicat les dhCer en la inducció de l'apoptosi⁴⁰. Tot i així, estudis en altres models cel·lulars suggereixen que l'augment de dhCer és insuficient per induir apoptosi o mort cel·lular⁴¹. Al contrari del que passa amb les dhCer, el paper de la Cer, generades tant per la biosíntesi de novo com per l'acció de les SMases, en l'alliberació del citocrom C o la inducció de l'apoptosi està demostrat de manera contundent. Malgrat això, les evidències extretes dels múltiples treballs sobre el tema, suggereixen que les dhCer contraresten l'acció de les Cer en la mort cel·lular. Per exemple, en el mitocondri, les

dhCer eviten la formació dels porus de Cer. Aquesta inhibició ocorre tot i que hi hagi poca concentració de dhCer, suggerint que la relació entre els dos esfingolípidis és determinant en la inducció de l'apoptosi i no tant la concentració absoluta de cada un d'ells⁴².

L'autofàgia va ser una de les primeres respostes biològiques assignades a les dhCer, però la seva implicació en la mort cel·lular o en la supervivència continua sent controvertida. En alguns treballs es descriu que nivells elevats de dhCer provoquen l'activació de l'autofàgia amb un paper protector contra agents citotòxics^{43,44}. En aquests estudis, ni l'acumulació de dhCer, ni l'autofàgia contribueixen a la mort cel·lular. D'altra banda, també s'ha descrit que els augments de dhCer i la posterior activació de l'autofàgia implica mort cel·lular^{45,46}. La disparitat dels resultats sobre el paper de les dhCer en l'autofàgia i el destí cel·lular pot ser degut al context cel·lular, localització subcel·lular i propietats de les diferents espècies de dhCer estudiades. És per aquest motiu, que és necessari aprofundir més en la investigació per tal d'explicar aquests resultats contradictoris²⁷. També cal destacar que els mecanismes que relacionen les dhCer i l'autofàgia segueixen sense ser resolts. A part de la seva implicació en l'apoptosi i l'autofàgia, també s'ha descrit entre els efectes de la dhCer l'aturada del cicle cel·lular en G₀/G₁. La inhibició de Des1, per silenciament genètic o inhibició farmacològica, amb la conseqüent acumulació de dhCer provoca aturada del cicle cel·lular degut a la disminució de la fosforilació de Rb⁴⁷ o per canvis en l'expressió de la ciclina D1⁴³. Com també ocorre amb les Cer, les dhCer amb diferent longitud de cadena sembla ser que tenen efectes específics. Per exemple dhCer de cadena molt llarga són responsables de la citotoxicitat en línies cel·lulars de leucèmia⁴⁸. Altrament, en un estudi diferent es va descriure que nivells elevats de dhCer C16, C24 i C24:1 estan implicades en els efectes antiproliferatius provocats pel celecoxib⁴⁹.

Les dhCer, com les Cer, es localitzen no només en la membrana plasmàtica i el ER, sinó també en altres orgànuls com el nucli o el mitocondri⁵⁰. Increments en la relació dhCer/Cer en aquestes membranes, fa que augmenti la rigidesa i quedi alterada la dinàmica de les membranes cel·lulars. Això pot repercutir en alteracions de varis processos biològics com el transport, formació de vesícules, difusió i senyalització²⁷.

2.1.3 Esfingosina-1-fosfat

La S1P és una molècula mediatra de diversos processos cel·lulars crítics, entre els que es troben la proliferació, creixement cel·lular, supervivència, migració, inflamació, angiogènesi i resistència a la mort apoptòtica, mostrant així efectes antagònics a la Cer^{51,52}. S'ha demostrat també que la S1P indueix autofàgia, protegint la cèl·lula de l'apoptosi i afavorint la seva supervivència⁵³.

Tot i que s'han descrit funcions intracel·lulars, generalment la S1P és transportada fora de la cèl·lula on pot actuar de manera autocrina o paracrina en receptors

altament específics per la S1P. Aquests receptors s'anomenen receptors S1P (S1PRs) i estan acoblats a proteïna G, regulant així diverses vies de senyalització intracel·lular⁵⁴. S'han descrit cinc S1PR (S1P₁₋₅), l'expressió dels quals varia en funció del teixit i el tipus cel·lular. Si bé els receptors S1P₁₋₃ s'expressen de manera ubíqua, l'expressió de S1P₄ es limita als teixits limfàtics i al pulmó, i el S1P₅ únicament es troba en cervell i pell⁵⁵. L'activació d'aquests receptors estimula diferents vies de senyalització on participen MAPK (proteïna cinasa activada per mitogens), la fosfatidilinositol-3-cinasa (PI3K), AMPK (proteïna cinasa activada per AMP) i altres mediadors intracel·lulars⁵⁶. Els efectes de la S1P a través d'aquests receptors inclouen reestructuració del citoesquelet, proliferació cel·lular, migració, invasió, angiogènesi i transport de limfòcits⁵⁷. Mentre que els efectes de la S1P mitjançant els S1PRs estant molt ben caracteritzats, les accions de la S1P intracel·lular no es coneixen amb exactitud. Sembla ser que la S1P que no interacciona amb els receptors extracel·lulars, participa en la regulació del creixement cel·lular i la supressió de l'apoptosi⁵⁸.

Degut a la varietat d'accions de la S1P, la regulació dels seus nivells és de gran interès. La S1P és generada a partir de la fosforilació de la So per l'enzim SK, i la seva degradació té lloc per l'enzim S1PL i també per fosfatases. Encara que està demostrat que principalment la generació de S1P depèn de l'activitat de la SK1 i SK2, aquesta també està limitada per la disponibilitat de So. És en aquest punt on es parla del "reòstat dels esfingolípids" (figura 6).

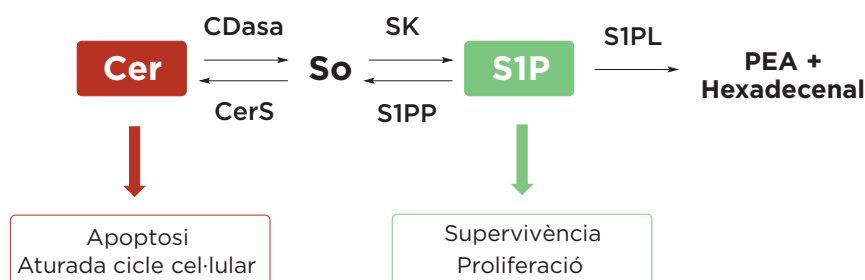


Figura 6: Esquema de la relació entre Cer i S1P. El destí cel·lular depèn de l'equilibri entre esfingolípids bioactius amb funcions oposades en senyalització cel·lular

Aquest mecanisme té com objectiu l'homeòstasi cel·lular i consisteix en l'equilibri entre la Cer i la S1P, entesos com a metabòlits amb funcions oposades. Per una banda es troba la Cer relacionada amb apoptosi, aturada del cicle cel·lular i senescència. La So també ha estat relacionada amb processos anti-proliferatius com l'aturada del cicle cel·lular i l'apoptosi⁵⁹. Per altra banda la S1P està involucrada entre altres processos com la proliferació, creixement cel·lular i supervivència, convertint-se així en un lípid antagònic a la Cer. Com aquests metabòlits es poden convertir entre ells, la qüestió no és les quantitats absolutes, sinó els nivells relatius el que determinarà el destí cel·lular. En aquest context, sabent que la formació de So depèn de l'activitat de les CDases, es podria dir que l'equilibri de l'activitat CDasa i S1PL són claus pel manteniment de l'homeòstasi cel·lular.

2.2 Enzims del metabolisme dels esfingolípid

Existeixen desordres metabòlics associats al metabolisme dels esfingolípid anomenats esfingolipidosis. Aquestes patologies estan causades per mutacions en gens d'enzims del metabolisme dels esfingolípid que provoquen una activitat deficient i causen acumulació de lípid específics en els orgànuls cel·lulars. Per exemple mutacions en el gen *ASAH1* que codifica per la CDasa àcida lisosomal, provoca la malaltia de Farber o lipogranulomatosis⁶⁰. La malaltia recessiva Niemann-Pick tipus A i B és deguda a mutacions en el gen *SMPD1* que codifica la α SMasa i causa greus desordres lisosomals provocant generalment la mort abans dels tres anys d'edat⁶¹. La malaltia de Gaucher és una altra esfingolipidosi caracteritzada per l'acumulació de glucoesfingolípid en els lisosomes de cèl·lules del sistema immunitari monòcits/macròfags a causa d'una mutació puntual en el gen *GBA1*⁶².

Malgrat que els esfingolípid consisteixen únicament en una petita fracció dels lípid totals de la cèl·lula, canvis en els nivells d'esfingolípid o alteracions en els enzims del seu metabolisme han estat relacionats de manera convincent amb la iniciació i progressió de diverses malalties. A part d'aquests síndromes particulars esmentats, les alteracions del metabolisme dels esfingolípid s'han observat també en malalties neurodegeneratives com l'Alzheimer, malalties cardiovasculars, inflamació crònica, diabetis tipus 2 o càncer⁶³. És per això que els diferents enzims del metabolisme dels esfingolípid s'han convertit en prometedores dianes terapèutiques.

2.2.1 Dihidroceramida dessaturasa 1

Aquesta secció ha estat recentment tractada en un revisió del nostre grup. Parts d'aquesta revisió s'han reproduït en aquest apartat⁶⁴.

La Des1 catalitza la inserció d'un doble enllaç en la dhCer per convertir-la a Cer en l'últim pas de la via de biosíntesi *de novo* dels esfingolípid. El gen que codifica per Des1 va ser clonat en *Drosophila melanogaster* per primera vegada en 1996, i es va anomenar "drosophila degenerative spermatocyte 1" o *DEGS1*⁶⁵. Actualment el gen de la Des1 s'anomena *DEGS1* o també *DES1*. En el 2002 es va identificar l'enzim homòleg dihidroceramida dessaturasa 2 (Des2) que codifica pel gen *DEGS2* o *DES2* (figura 7).

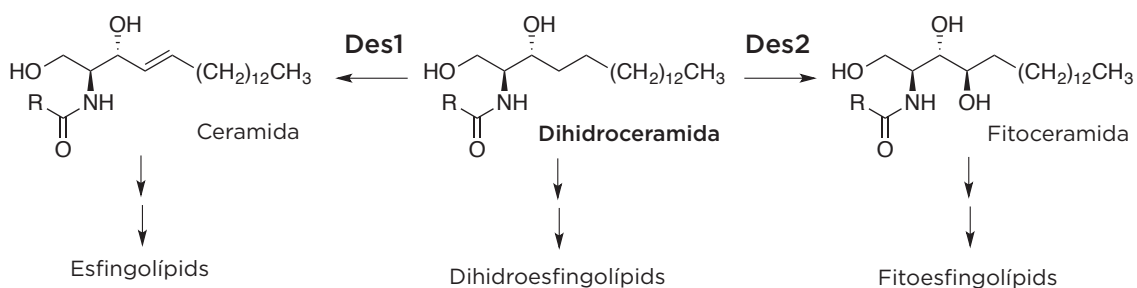


Figura 7: Activitat Des1 i Des2. Modificada a partir de Casasampere i col., 2016⁶⁴

A diferència de Des1 que mostra una gran activitat dessaturasa i baixa activitat hidroxilasa, l'enzim Des2 presenta ambdues activitats⁶⁶. Així Des2 tenint les dhCer com a substrat, genera Cer però també fitoceramides. És per això que Des2 es troba preferentment expressada en l'intestí prim, pell i ronyó⁶⁷, on la producció de fitoceramides és essencial. En canvi Des1 està present en tots els teixits.

La Des1 és un enzim transmembrana localitzat en el ER. La seva estructura terciària està formada per quatre dominis transmembrana, la presència de dominis d'unió a la histidina i una regió sensible a la miristoilació⁶⁷ (figura 8). Tot i ser una proteïna del ER, s'ha demostrat que la miristoilació (acilació de l'enzim amb un àcid mirístic) fa que l'enzim es traslladi de manera excepcional a la membrana externa del mitocondri, on provoca un augment de Cer que indueix apoptosi⁶⁸.

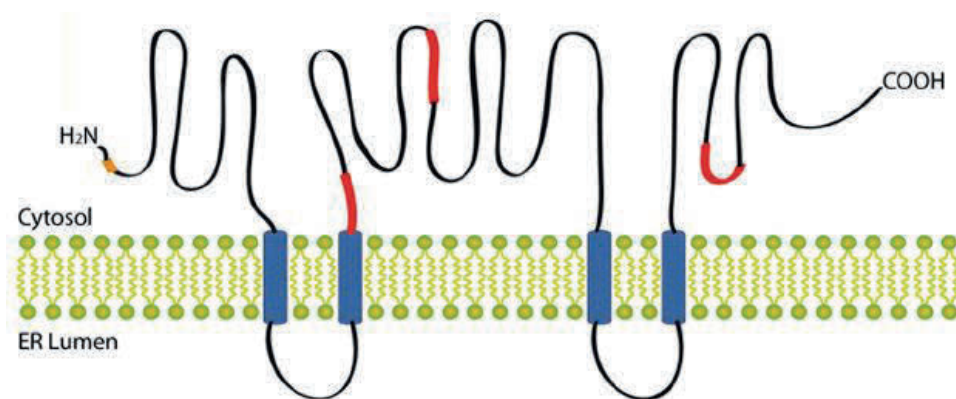


Figura 8: Representació esquemàtica de l'estructura terciària de la Des1. S'il·lustren els quatre dominis transmembrana (blau), els dominis d'unió a histidina (vermell) i el lloc de miristoilació de la glicina (taronja)⁶⁷

Per la seva activitat catalítica requereix poder reductor NAD(P)H^{18,69} i una cadena de transport d'electrons amb l'oxigen com a acceptor final (figura 9). L'electró del NAD(P)H passa per la reductasa NADH-citocrom b5, pel citocrom b5, per l'enzim Des1 que finalment redueix l'oxigen a aigua i oxida la dhCer a Cer. És per aquesta dependència d'oxigen que tant Des1 com Des2 són sobreexpressades en condicions d'hipòxia per compensar la poca activitat enzimàtica, que resulta amb un augment de producció de dhCer⁷⁰. També s'ha descrit la inhibició de Des1 per espècies reactives d'oxigen (ROS), el que suggereix que el desequilibri redox influeix en l'activitat de l'enzim⁷¹. Més recentment, s'ha proposat un mecanisme d'acció similar amb la presència de la reductasa NADH-citocrom b5 per l'homologa Des2⁷².

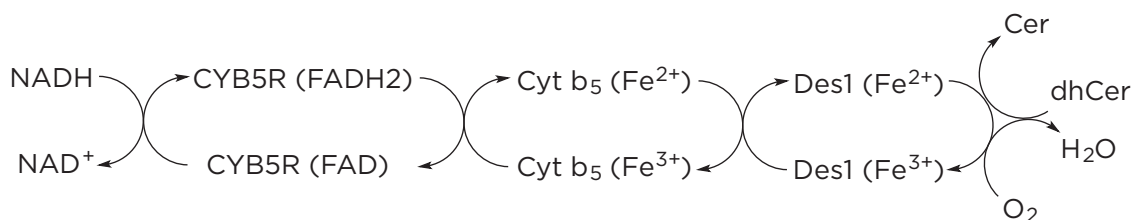


Figura 9: Complex enzimàtic de Des1⁶⁴

En comparació amb les Cer, l'absència de doble enllaç en les dhCer altera en gran mesura les propietats biofísiques de la molècula⁷³. És per això que la falta d'activitat dessaturasa i l'absència del doble enllaç en la cadena esfingoide té conseqüències greus en la funció cel·lular. Estudis en ratolins *DES1 knockout* il·lustren de manera molt clara la importància d'aquest enzim en la fisiologia cel·lular. Tot i que els ratolins homozigots *DES1 knockout* són viables, presenten greus anormalitats i acaben morint en les primeres vuit setmanes de vida⁷⁴. L'estudi cel·lular d'aquests ratolins mostra la seva resistència a l'apoptosi i alts nivells d'autofàgia. Els ratolins heterozigots, en canvi, són viables, però presenten un desequilibri de la relació dhCer/Cer en múltiples òrgans. Aquest fet sembla que protegeix els ratolins de la resistència a la insulina, de la disfunció vascular i de la hipertensió provocada per l'obesitat. Aquests descobriments obren un nou camp d'investigació, partint de la Des1 com a diana terapèutica, per revertir disfuncions vasculares relacionades amb l'obesitat⁷⁵.

Tenint en compte els estudis citats anteriorment i el creixent nombre d'articles publicats sobre dhCer i Des1, queda demostrada la importància dels dihidroesfingolípids en la biologia cel·lular. La investigació en la funció biològica d'aquestes molècules poden revelar teràpies innovadores basades en la modulació de l'enzim Des1. La regulació de Des1 per àcids grassos s'ha demostrat en diferents estudis. A part de l'activació i translocació al mitocondri per l'àcid mirístic⁷⁶, l'àcid palmític augmenta l'expressió i per tant l'activitat de Des1. No és així en el cas del tractament conjunt de palmític amb àcid oleic, que per contra atenua l'augment de mRNA de Des1 i disminueix els nivells de Cer⁷⁷. La disminució d'activitat de l'enzim es pot aconseguir amb inhibidors específicament dirigits o certs fàrmacs i compostos naturals amb capacitat d'inhibir Des1.

2.2.1.1 Inhibidors de Des1

La disponibilitat d'inhibidors de Des1 i el seu ús com a eines farmacològiques ha ajudat a refutar la idea d'entendre les dhCer com a lípids innocus. Aquestes evidències han sorgit d'assajos on la inhibició de Des1 provocava una acumulació de dhCer. Diversos fàrmacs i productes naturals mostren efecte inhibidor sobre Des1; però paral·lelament s'han dissenyat de manera racional inhibidors que actuen específicament en el centre actiu de l'enzim com els compostos XM462 i C8-ciclopropenilceramida (GT11) (figura 10). Les conseqüències de l'acció d'aquestes molècules varia en funció de la línia cel·lular, el grau d'inhibició i el context experimental.

El primer fàrmac que es va descriure com a inhibidor de la Des1 va ser la fenretinida o 4-HPR (4-hidroxifenilretinamida). És un derivat sintètic de l'àcid retinoic, un anàleg de la vitamina A, que ha estat estudiat amb profunditat per la prevenció i tractament del càncer⁷⁸. El grup fenol, que no està present en l'àcid retinoic, està probablement involucrat en la inhibició de Des1. Des de la seva síntesi en la dècada de 1960, diversos articles s'han publicat intentant esbrinar els mecanismes moleculars

associats als seus efectes. En primer moment es pensava que augmentava les Cer per activació de la SPT i la CerS^{79,80}. No obstant, posteriorment es va descobrir que eren les dhCer i no les Cer els esfingolípid que s'acumulaven, i que l'augment era causat per la inhibició de Des1 per part de 4-HPR⁸¹. Degut a que la 4-HPR afecta l'estat redox generant ROS i que es coneix que l'activitat Des1 disminueix per estrès oxidatiu, sembla ser que es tractaria d'una inhibició indirecta. No obstant, s'ha descrit la inhibició irreversible de Des1 per 4-HPR *in vitro* i per tant demostraria que és un inhibidor directe⁸².

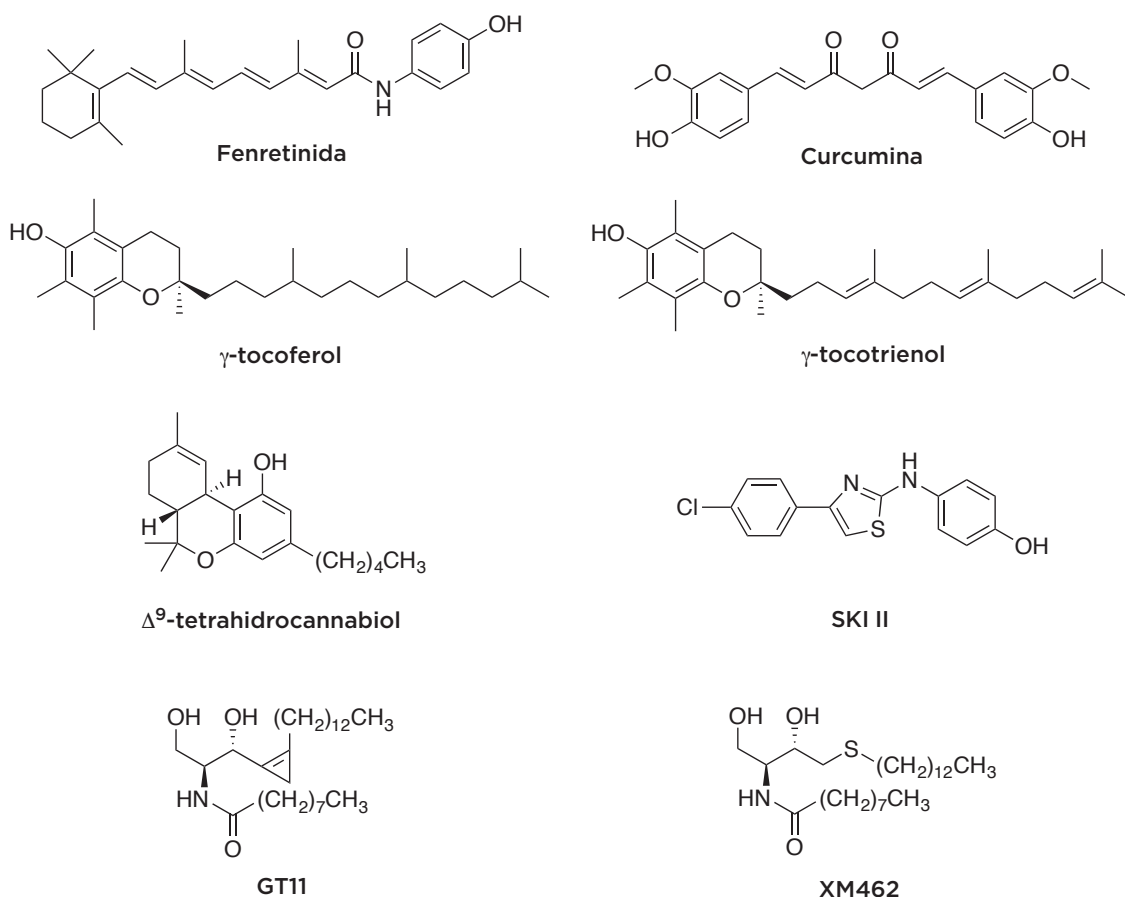


Figura 10: Estructures químiques dels compostos descrits com inhibidors de Des1

Altres compostos aromàtics descrits com inhibidors de Des1 són la curcumina, component bioactiu aïllat de la cúrcuma⁶⁷ o el Δ⁹-tetrahidro-cannabinol (THC), principal component actiu de la marihuana o *Cannabis sativa*⁸³. Aquestes molècules, al no estar estructuralment relacionades amb les (dh)Cer, sembla que podrien actuar de manera indirecta sobre Des1 alterant l'estat redox i pertorbant la cadena de transport d'electrons imprescindible per l'activitat de Des1.

Diversos investigadors suggereixen que les formes naturals de la vitamina E, el γ-tocoferol (γ-T)⁸⁴ i el γ-tocotrienol (γ-TE)⁸⁵ inhibeixen Des1 i per tant augmenten els nivells de dhCer. Tot i que no es coneix el mecanisme molecular per el qual actuen, és possible que estigui relacionat amb alteracions de l'estat redox.

Recentment s'ha descrit que el inhibidor de la esfingosina cinasa II (SKI-II) o (4-[[4-(4-clorofenil)-2-tiazolil]amino]fenol, a part de ser inhibidor de les SK1 i SK2, és també un inhibidor no competitiu de l'enzim Des1 ($K_i=0.3 \mu\text{M}$)⁸⁶. Estudis de modelatge molecular recolzen la idea que l'acció del SKI-II en l'activitat Des1 pot resultar de la inhibició de la reductasa NADH-citocrom b5 de la cadena de transport d'electrons. En la línia cel·lular HGC27, el tractament amb SKI-II provoca tant la disminució dels nivells de S1P, com l'acumulació de dhCer. En comparació amb el tractament amb PF-543 (inhibidor específic de la SK1), només amb SKI-II es veu disminució de la proliferació cel·lular, aturada del cicle en G_0/G_1 i inducció d'autofàgia. Per tant aquests efectes del SKI-II són probablement com a conseqüència de la inhibició de Des1 i no per la seva acció sobre SK.

El primer inhibidor sintètic de Des1 que es va publicar va ser el compost GT11⁸⁷. És un anàleg d'esfingolípids amb un ciclopropà que és actiu tant *in vitro* com en cèl·lules intactes^{47,88}. En un cultiu primari de neurones, el GT11 inhibeix de manera molt eficaç amb una IC_{50} de 23 nM. Per altra banda, a concentracions majors ($\geq 5 \mu\text{M}$), el GT11 provoca una acumulació de bases lliures fosforilades, fet que porta a pensar que l'activitat S1PL està disminuïda. A més aquesta acumulació, inhibeix l'activitat SPT disminuint tota la biosíntesi *de novo*⁸⁸. El XM462 és una 5-tiadihidrocera mida dissenyada per inhibir de manera directa l'enzim Des1⁸⁹, en base al mecanisme de l'enzim en la dessaturació. Aquesta molècula es distingeix del substrat natural per la presència d'un àtom de sofre enlloc del grup metil en el C5. El XM462 inhibeix l'enzim tant *in vitro* ($IC_{50}= 8.2 \mu\text{M}$) en microsomes de fetge de rata com en cèl·lules intactes ($IC_{50}= 0.43 \mu\text{M}$), en cèl·lules humanes de leucèmia Jurkat A3⁸⁹. S'ha utilitzat aquest inhibidor com a eina farmacològica per esbrinar el paper de les dhCer com inductores d'autofàgia en cèl·lules de càncer gàstric HGC27. S'ha demostrat que el XM462, a concentracions que no alteren la viabilitat cel·lular, produeix una acumulació de dhCer, i que aquesta acumulació està associada en alteracions de l'expressió de la ciclina D1, endarreriment de la transició G_1/S en el cicle cel·lular per activació de l'estrès del ER i en la inducció d'autofàgia^{43,44}.

2.2.2 Ceramidases

Les CDases catalitzen la hidròlisi de les Cer per generar So i un àcid gras. Més tard la So es fosforila per formar la S1P per acció de les SK. Degut a que la fosforilació de la So és l'única via per formar S1P, els nivells de S1P depenen de la disponibilitat de la So generada per les CDases. Això suggereix que les CDases tenen un paper clau no tant sols en la regulació de la hidròlisi de Cer sinó també en la generació de S1P, i per tant les CDases són enzims que exerceixen un paper molt important en el control del destí cel·lular.

Segons els seu pH òptim d'activitat es poden classificar en CDasa àcida (AC), neutra (NC) i alcalina (ACER). Existeixen cinc CDases humanes codificades per cinc gens diferents: l'AC codificada pel gen *ASAH1*, la NC codificada pel gen *ASAH2* i tres

CDases alcalines ACER1, ACER2 i ACER3 codificades pels gens *ASAH3*, *ASAH3L* i *PHCA* respectivament (taula 1). Cada CDasa té una distribució en teixits, localització subcel·lular i especificitat de substrat diferent. Mentre que l'AC s'expressa de manera ubiqua i es troba en els lisosomes, la NC es localitza en la membrana plasmàtica, mitocondri o secretada en l'espai extracel·lular⁹⁰. En el cas de les alcalines, l'ACER1 s'expressa exclusivament en el ER de les cèl·lules de pell, l'ACER2 es localitza en el Golgi i l'ACER3 es troba tant en el ER com en el Golgi. Tant ACER2 com ACER3 s'expressen en tots els teixits, però són particularment abundants en la placenta⁹¹. A part de l'hidròlisi de la Cer, per algunes CDases s'ha descrit una activitat reversa donada pel mateix enzim. D'aquesta manera a partir d'una base esfingoide i per acció de la CDasa (en aquest cas reversa) es genera Cer. Aquesta activitat difereix de la CerS pel substrat. La CerS utilitza acil-CoA, mentre que l'activitat reversa de la CDasa s'inicia amb àcids grassos lliures⁹².

Enzím	Gen	pH òptim	Localització subcel·lular
Ceramidasa àcida (AC)	<i>ASAH1</i>	4.5	Lisosoma
Ceramidasa neutra (NC)	<i>ASAH2</i>	7.6	Membrana plasmàtica, mitocondri i secretada
Ceramidasa alcalina 1 (ACER1)	<i>ASAH3</i>	8.5	Reticle endoplasmàtic
Ceramidasa alcalina 2 (ACER2)	<i>ASAH3L</i>	7-9	Aparell de Golgi
Ceramidasa alcalina 3 (ACER3)	<i>PHCA</i>	9.5	Reticle endoplasmàtic i aparell de Golgi

Taula 1: Tipus de CDases classificades en funció del pH òptim per la seva activitat enzimàtica i la seva localització cel·lular

2.2.2.1 Ceramidasa àcida

L'AC, també coneguda com *N*-acilesfingosina amidohidrolasa 1, està codificada pel gen *ASAH1* en humans. És una glicoproteïna heterodimèrica formada per 2 subunitats, la α (no glicosilada, 13 kDa) i la β (glicosilada, 40 kDa). Es sintetitza en el ER com a precursor inactiu i es processa de manera post-transcripcional en els lisosomes on les dues subunitats queden unides per ponts disulfur⁹³. Aquesta modificació post-transcripcional s'activa en pH àcid i és un mecanisme per evitar l'activació prematura de l'enzim abans que arribi al lisosoma. El centre actiu d'aquest enzim conté un tiol nucleofílic en el residu cisteïna (Cys 143) que queda exposat en el NH₂-terminal de la subunitat β després del trencament de la proteïna precursora. Les Cer amb un àcid gras amb una cadena de carbonis de C12-C14 són els millors substrats per l'AC en comparació amb cadenes curtes (\leq C6) o amb cadenes llargues (\geq C16). A més sembla ser que prefereix Cer insaturades (com C18:1 o C18:2) a

saturades (C18) com a substrats⁹⁴ i que és incapaç d'hidrolitzar dhCer⁹⁵. El pH òptim de la seva acció hidrolítica es troba en 4.5 i no necessita cations per a la seva activitat enzimàtica⁹⁶.

L'AC és un element clau en el catabolisme de la Cer en cèl·lules humanes i la seva deficiència congènita és la causa de la malaltia de Farber o lipo-granulomatosi⁶⁰. És una malaltia autosòmica recessiva que presenta un desordre en l'emmagatzematge de lípids caracteritzat per una acumulació de Cer en diversos teixits, entre els quals es troben el fetge, la melsa i els pulmons. L'AC també està implicada en altres desordres metabòlics com la diabetis tipus 2, prevenint la malaltia a través de la modulació de les vies de senyalització de la insulina⁹⁷. La malaltia d'Alzheimer també es caracteritza per nivells significativament elevats d'AC, tenint un paper en el control de l'apoptosi neuronal⁹⁸. També s'han detectat alteracions en l'expressió d'AC en diverses línies tumorals com en el càncer de pròstata⁹⁹, càncer de cap i coll¹⁰⁰, o melanoma¹⁰¹. En termes generals, la sobreexpressió de l'AC té un efecte protector en les cèl·lules tumorals, promovent la conversió de la pro-apoptòtica Cer a l'anti-apoptòtica S1P. Corroborant la idea que l'AC té un paper en la supervivència cel·lular, es va comprovar que el *knockout* de l'AC en ratolins provocava la mort en les primeres etapes dels embrions. Per contra, el tractament amb S1P exògena retardava la mort dels embrions, suggerint que l'efecte letal del *knockout* de l'AC és degut en part a la incapacitat de generar S1P¹⁰².

2.2.2.2 Ceramidasa neutra

La NC o *N*-acilesfingosina amidohidrolasa 2, és una proteïna que es troba en la membrana plasmàtica com a una proteïna integral de membrana amb el domini catalític orientat cap a l'espai extracel·lular¹⁰³. L'especificitat del substrat de la NC no ha estat establert, però sembla ser que prefereix Cer de cadena llarga (C16-C22) abans que les de cadena molt llarga (\geq C24)¹⁰⁴ i que és incapaç d'hidrolitzar dhCer⁹⁵. El seu pH òptim d'activitat es troba entre 6.5 i 8.5, i no necessita cations per la seva activitat¹⁰⁵. L'enzim també es pot excretar quan una proteòlisi de la regió terminal fa que perdi el seu ancoratge en la membrana¹⁰⁶. També s'ha descrit la seva presència en els mitocondris en les línies cel·lular MCF-7 i HEK293¹⁰⁵. Per la seva localització en la membrana plasmàtica i la seva forma secretada, la NC participa en la hidròlisi de la Cer tant de la membrana com de la que es troba lliure en el medi extracel·lular. És per això que la seva funció principal és actuar com un enzim digestiu i participar en el catabolisme dels esfingolípid de la dieta; i es troba altament expressada en les vellositats al llarg de tot l'intestí prim¹⁰⁷. De la mateixa manera que ocorre amb l'AC, la NC promou la proliferació i la supervivència cel·lular atenuant la senyal de la Cer i augmentant l'efecte de la S1P. Per això la inhibició de la NC provoca aturada del cicle cel·lular i/o apoptosi¹⁰⁸.

2.2.2.3 Ceramidases alcalines

S'ha descrit l'existència de tres CDases alcalines humanes: ACER1, ACER2 i ACER3, totes elles amb múltiples dominis transmembrana i un pes molecular similar al voltant de 31 kDa. Tot i que les tres ACERs comparteixen una gran semblança en la seqüència proteica, cada una presenta unes propietats específiques. Degut a les diferències en l'especificitat de substrat, localització cel·lular, distribució en els teixits i nivell d'expressió, és d'esperar que les ACERs presentin diferents papers en les respostes cel·lulars.

2.2.2.3.1 Ceramidasa alcalina 1

L'ACER1 és una proteïna amb diversos dominis transmembrana localitzada en el ER¹⁰⁹. S'ha descrit que el pH òptim per l'ACER1 és 8.5 i que l'activitat és molt baixa en absència de cations¹⁰⁹. En el mateix estudi s'indica que l'ACER1 prefereix Cer de cadena molt llarga i insaturada com a substrat (com les Cer C24:1), enlloc d'hidrolitzar dhCer o fitoceramides. Més tard s'ha demostrat que l'ACER1 també pot hidrolitzar dhCer insaturades però no dhCer saturades per donar les conseqüents espècies de dhSo⁹⁵. Tot i així aquesta capacitat es troba limitada a certs tipus cel·lulars com els queratinòcits de l'epidermis. L'activitat *in vitro* augmenta amb Ca²⁺ i no amb altres cations, indicant per tant que el Ca²⁺ és un activador iònic específic per ACER1. A més el tractament amb thapsigargin, un inhibidor de la Ca²⁺ ATPasa que esgota els nivells de Ca²⁺ del ER, bloqueja la generació de So en resposta a la sobreexpressió d'ACER1⁹¹. Això suggereix que l'activitat cel·lular d'ACER1 és regulada pels nivells de Ca²⁺ en el ER.

L'ACER1 es troba principalment expressada en pell¹¹⁰, concretament en les capes superiors de l'epidermis. És en aquest teixit on l'ACER1 realitza el seu paper més important regulant la diferenciació dels queratinòcits, el principal tipus cel·lular de l'epidermis. La So és un lípid bioactiu amb propietats anti-proliferatives que afavoreixen la diferenciació. Per tant, és l'augment de So causat per l'activitat d'ACER1 el que provoca l'aturada del creixement i la inducció de la diferenciació dels queratinòcits.

2.2.2.3.2 Ceramidasa alcalina 2

Analitzant els nivells de mRNA, s'ha pogut concloure que l'ACER2 és una CDasa altament expressada en la placenta, tot i que també s'expressa de manera moderada en altres teixits¹¹¹. L'ACER2 presenta una gran similitud en la seqüència de proteïna amb l'ACER1, amb diversos dominis trans-membrana, però en aquest cas localitzada en l'aparell de Golgi¹¹¹. Al tenir dominis transmembrana imparells, la cua N-terminal es troba orientada en el lumen de Golgi i la C-terminal en la cara citosòlica. S'ha demostrat que aquesta disposició és imprescindible per la correcta localització de

l'ACER2 en Golgi i per la seva activitat CDasa¹¹². El seu pH òptim es troba entre 7 i 9 i requereix Ca^{2+} en el lumen del Golgi per la seva òptima activitat tant *in vitro* com en cèl·lules¹¹². Tal com ocorre amb l'ACER1, l'ACER2 utilitza preferentment les Cer com a substrat enlloc de les dhCer o les fitoceramides¹¹¹. S'ha descrit que l'ACER2 catalitza la hidròlisi de la majoria d'espècies de Cer de mamífers, amb preferència per les Cer de cadena llarga insaturada¹¹². Malgrat la seva preferència per les Cer, l'ACER1 i ACER2 són capaces d'hidrolitzar dhCer de cadena molt llarga i insaturada (C24:1)⁹⁵; i són aquestes dhCer les espècies més abundants en les línies tumorals. Tenint en compte que ni l'AC ni la NC poden hidrolitzar dhCer, i que l'habilitat de l'ACER1 per hidrolitzar dhCer es limita als queratinòcits, sembla ser que és l'ACER2 la CDasa responsable de la generació de dhSo a partir de dhCer en les cèl·lules tumorals⁹⁵.

En funció dels seus nivells d'expressió, l'ACER2 estimula la proliferació cel·lular o l'aturada del creixement. Augments moderats de l'expressió d'ACER2 promouen la proliferació cel·lular i supervivència, segurament provocats per la disminució dels nivells de Cer i l'augment de S1P. Curiosament, si l'increment d'expressió d'ACER2 és molt elevat es pot arribar a fragmentar el complex de Golgi. Això provoca un augment anòmal dels nivells de So que inhibeixen la proliferació cel·lular¹¹¹. L'ACER2 també exerceix un paper important en la regulació de la glicosilació de proteïnes en el Golgi¹¹². La sobreexpressió d'ACER2 inhibeix la glicosilació del precursor de la subunitat $\beta 1$ de la integrina, el que provoca una inhibició de l'adhesió cel·lular a la matriu extracel·lular. Una altre estudi mostra que en cèl·lules HeLa l'expressió d'ACER2 augmenta en resposta a la privació de sèrum. El *knockdown* d'ACER2 inhibeix la proliferació de les cèl·lules HeLa i provoca apoptosi en un medi de cultiu sense sèrum. Aquests resultats suggereixen que la sobreexpressió d'ACER2 té un paper protector en la supervivència cel·lular en contra de la privació de sèrum¹¹¹.

2.2.2.3.3 Ceramidasa alcalina 3

L'ACER3, altrament anomenada fitoceramidasa alcalina (aPHC) per la seva capacitat d'hidrolitzar l'anàleg sintètic de Cer D-ribo-C12-NBD-fitoceramida *in vitro*, va ser la primera ACER clonada en mamífers¹¹³. L'ACER3 és homòloga a ambdues ACER1 i ACER2, amb diversos dominis transmembrana i localitzada tant en el ER com en el Golgi¹¹³. El seu pH òptim és al voltant de 9.5 i la seva activitat s'estimula amb Ca^{2+} ¹¹³. A diferència de les altres CDases, l'ACER3 té una especificitat pel substrat única. Mentre que la resta de CDases utilitzen com a substrat espècies de Cer abundants en els mamífers (C16, C24 i C24:1), l'ACER3 només catalitza espècies poc abundants, com les Cer de cadena llarga mono- o poli-insaturada (C18:1, C20:1 o C20:4), i no és capaç d'hidrolitzar-les si tenen cadena saturada (C18) o cadena molt llarga insaturada (C24:1)¹¹⁴. No obstant l'ACER3 es diferencia de les altres CDases per ser la única capaç d'hidrolitzar amb la mateixa eficiència Cer, dhCer i fitoceramides tant en cèl·lules com *in vitro*¹¹⁴ (figura 11). Cal destacar que les Cer i dhCer de cadena llarga poliinsaturades són substrats de l'ACER3 tot i que aquestes espècies no s'han detectat en cap línia cel·lular de mamífer¹¹⁴.

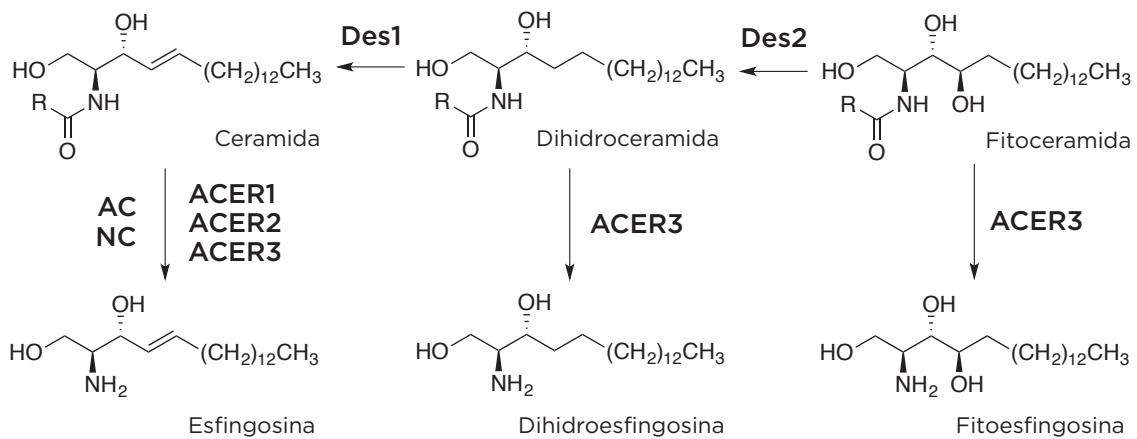


Figura 11: Metabolisme de les Cer, dhCer i fitoceramides per acció de les diferents CDases. S'indiquen les preferències de substrat per cada CDasa. Modificat de Mao i col., 2008⁹¹

Es van analitzar els nivells de mRNA de l'ACER3 en diverses línies cel·lulars per qPCR i es va observar que aquesta CDasa es trobava altament expressada en cèl·lules endotelials, fibroblasts, múscul llis i cèl·lules hematopoètiques¹¹⁴. A més els nivells de mRNA estaven correlacionats amb un augment d'activitat CDasa. Aquests resultats demostren que l'ACER3 és la CDasa alcalina més activa en una gran varietat de models cel·lulars. El *knockdown* de l'ACER3 inhibeix la proliferació cel·lular degut a una activació de p21, un inhibidor de la cinasa dependent de ciclina. Segurament aquesta inhibició de la proliferació cel·lular també és degut a una acumulació de Cer que actua alterant el creixement cel·lular. A més aquest silenciament gènic provoca una sobreexpressió de l'ACER2 i per tant es demostra que l'ACER3 i l'ACER2 treballen de manera coordinada per compensar la pèrdua d'activitat CDasa i poder regular així la proliferació cel·lular, controlant els nivells de Cer, So i SIP¹¹⁴.

2.2.2.4 Mètodes per determinar l'activitat CDasa

L'interès per les CDases en la biologia cel·lular ha impulsat el desenvolupament de noves metodologies per determinar l'activitat enzimàtica de la CDasa. El primer assaig que es va descriure es basava en l'ús de Cer marcades radioactivament amb ³H o ¹⁴C. Aquestes Cer eren hidro-litzades i es determinaven els nivells de radioactivitat presents en el producte de reacció, l'àcid gras¹¹⁵. Alternativament, per evitar l'ús de substrats radioactius i tots els seus inconvenients, es van dissenyar diversos anàlegs de Cer fluorescents, com la Cer-NBD¹¹⁶ o la Cer-BODIPY¹¹⁷. En aquests substrats, el fluoròfor està unit al final de la cadena de l'àcid gras de la Cer i per acció de la CDasa s'obté un àcid gras fluorescent. Una altre enfoc per mesurar activitat CDasa és l'avaluació de la So formada després de ser derivatitzada amb compostos fluorescents com el NDA (naftalè-2,3-dialdehid)¹¹⁸. Per la determinació de l'activitat enzimàtica amb tots aquests substrats, és necessari la separació cromatogràfica dels reactius i els productes per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) acoblat a un detector de fluorescència. Paral·lelament, per la

determinació de l'activitat bacteriana, es va descriure la Cer-C10-pyrene, un anàleg de Cer no fluorescent però que una vegada hidrolitzat per les CDases emet fluorescència¹¹⁹.

Degut a la validació de les CDases com a dianes terapèutiques, s'han desenvolupat inhibidors de les CDases com a possibles nous fàrmacs. La majoria d'aquests inhibidors han estat fruit d'un disseny racional, però molts d'ells han sorgit després de provar petites quimioteques de compostos. Tot i que existeixen diversos procediments per determinar l'activitat CDasa, el cribratge de llibreries de compostos requereix metodologies *high-throughput screening* o cribratge d'alt rendiment (HTS), i són pocs els procediments que permeten aplicar-les. Com s'ha indicat anteriorment, la majoria requereixen separació cromatogràfica. Un d'aquest mètodes HTS és l'ús d'un anàleg de Cer marcada amb dos fluoròfors, NBD i Nile Red, que exerceix transmissió d'energia de ressonància (FRET) i al hidrolitzar-se per acció de les CDases, permet la determinació de l'activitat enzimàtica a temps real¹²⁰. Així mateix, en un treball del nostre grup es va descriure l'ús d'un substrat fluorogènic, un anàleg cumarínic de Cer, anomenat RBM14C16, per la determinació de l'activitat de l'AC¹²¹ (figura 12).

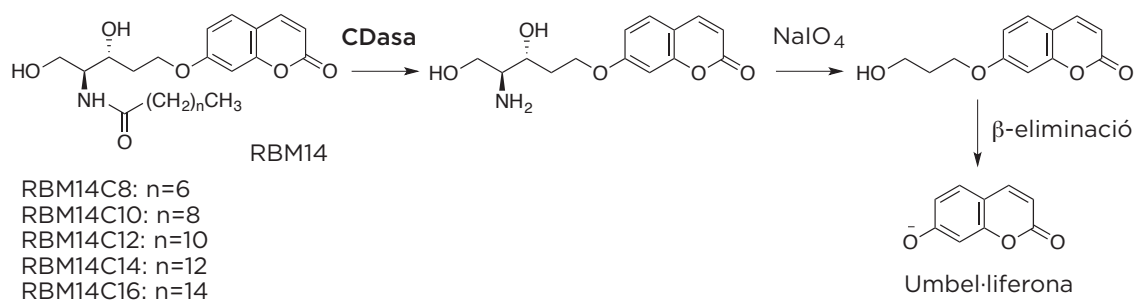


Figura 12: Transformació enzimàtica i química del RBM14 a umbel·liferona fluorescent

Els diferents RBM14 poden ser hidrolitzats per les CDases i el grup aminodiol resultant s'oxida químicament a un aldehyd. Seguidament una β -eliminació espontània fa que s'alliberi la umbel·liferona fluorescent. La umbel·liferona no emet fluorescència mentre es troba unida a l'estructura de la Cer. Altres anàlegs del RBM14C16 amb diferents longituds de cadena es van utilitzar més tard com a substrat de l'AC per el diagnòstic de la malaltia de Farber¹²².

2.2.3 Esgingosina-1-fosfat liasa

La S1PL és l'últim enzim del catabolisme dels esfingolípids que degrada de manera irreversible la S1P. La S1PL catalitza l'escissió de la cadena de carboni en les posicions 2-3, el que comporta la formació d'un aldehyd de cadena llarga (hexadecenal) i PEA¹²³. Ambdós productes són utilitzats més tard en la biosíntesi dels glicerolípids. És més, s'ha descrit que el producte de la reacció catalitzada per la S1PL, el *trans*-2-

hexadecenal exerceix un paper en la senyalització cel·lular que inclou alteracions en el citoesquelet i activació de l'apoptosi¹²⁴. Això indica que la funció biològica de la S1PL no es limita a la degradació de S1P, sinó que s'amplia a la generació directa d'un altre lípid bioactiu. Al ser l'últim enzim de via de degradació dels esfingolípids, la S1PL controla l'únic punt de sortida dels intermediaris dels esfingolípids i també l'entrada d'aquests al metabolisme dels fosfolípids. Per tant, la S1PL a més de regular els nivells de S1P, té un paper clau en el control del flux del metabolisme lipídic. L'esfinganina-1-fosfat (dhS1P), l'anàleg saturat de la S1P, també pot ser hidrolitzat per la S1PL generant PEA i l'aldehid saturat hexadecanal com a productes de degradació (figura 13).

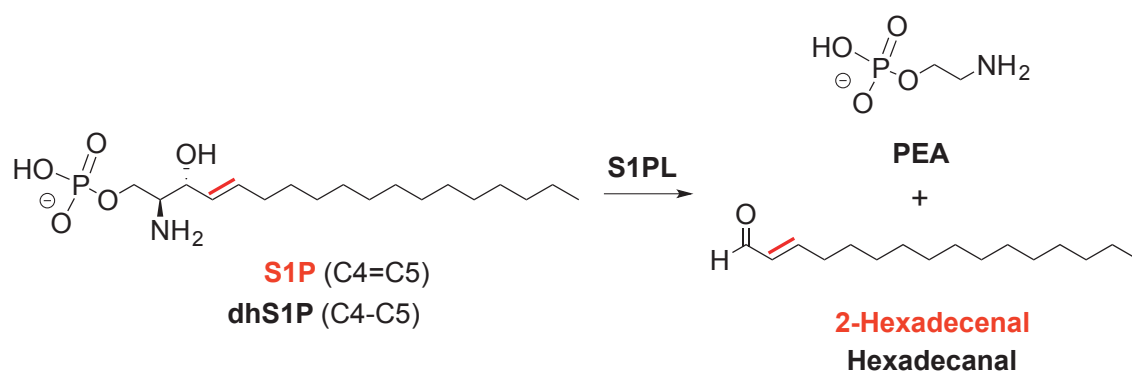


Figura 13. La hidròlisi de S1P i dhS1P per acció de la S1PL genera 2-hexadecenal o hexadecanal, respectivament

La identificació del gen de la S1PL humana (*SGPL1*) es va realitzar l'any 2000 pel grup de Van Veldhoven¹²⁵, que codifica per una proteïna de 63.5 kDa. El gen *SGPL1* s'expressa de manera ubiqua, excepte en els eritròcits i les plaquetes, i la seva expressió està lligada a teixits on la renovació cel·lular és constant, com l'intestí, tim o fetge¹²⁶. La S1PL homòloga de ratolí presenta un 84% d'identitat i un 92% de semblança a la S1PL humana. És un proteïna amb un únic segment transmembrana prop del N-terminal que es localitza en el lumen del ER. El domini catalític es troba en la cara citosòlica facilitant l'accés del substrat en el lloc actiu, concretament la S1P generada en el citosol per les SK¹²⁷. La proteïna també conté una regió d'aminoàcids involucrats en l'enllaç amb el piridoxal 5'-fosfat. La S1PL forma part d'una subclasse de liases carboni-carboni d'aldehid dependents de piridoxal 5'-fosfat i només reconeix l'isòmer de la base esfingoide amb la configuració natural com a substrat¹²⁷. La S1PL es localitza principalment al ER però un petit percentatge es troba en la membrana interna del mitocondri¹²⁸. És en el mitocondri on el producte de la reacció, la PEA, contribueix a la formació de fosfatidiletanolamina (PE), lípid comú en la membrana d'aquest orgànel cel·lular. També s'han detectat S1PL en les membranes MAM¹²⁹.

La majoria dels efectes observats per la modulació de S1PL es poden atribuir a les alteracions dels nivells intracel·lulars de S1P. La S1P promou el creixement cel·lular, migració, angiogènesi i metàstasi, i per tant actua de manera antagònica a l'apoptòtica Cer. Dins la cèl·lula es manté un equilibri dinàmic entre Cer i S1P per tal

de regular el destí cel·lular en resposta a un estrès. És en aquest punt de regulació on la S1PL té l'habilitat de desplaçar l'equilibri cap a la mort cel·lular al degradar i per tant bloquejar la senyal de proliferació pròpia de la S1P. Per tant la S1PL és imprescindible per mantenir l'homeòstasi cel·lular però també participa en el destí cel·lular.

Alteracions en la seva activitat pot contribuir a l'aparició de malalties, en especial aquelles on l'equilibri entre proliferació i mort és anormal, com és el cas del càncer o les malalties neurodegeneratives⁵. L'any 2009, Vogel i col·laboradors van publicar la caracterització d'uns ratolins *knockout* per la S1PL¹³⁰. Aquests ratolins no van sobreviure més de tres o quatre setmanes i presentaven greus problemes de creixement, anèmia, limfopènia i diverses anomalies als ronyons, cartílags i ossos. Els resultats suggereixen que els efectes observats després d'una inhibició completa de la S1PL, segurament es deuen a la acumulació de Cer, S1P i altres intermediaris dels esfingolípidis que afecten a l'homeòstasi lipídica alterant diverses vies de senyalització. Per tant, aquest model animal va ser particularment útil per establir la importància de la S1PL en la fisiologia animal i així plantejar noves estratègies terapèutiques tenint la S1PL com a diana.

La S1P participa en diversos processos cel·lulars essencials i això fa que les alteracions en la seva regulació contribueixin a l'aparició de múltiples malalties. S'ha demostrat que en diversos tipus de càncer hi ha alteracions en l'expressió de la S1PL. En aquestes cèl·lules malignes, la pèrdua de l'activitat S1PL provoca una acumulació de S1P i una reducció de la generació de Cer, que afavoreix la resistència a l'apoptosi i per tant s'aconsegueix escapar de la mort cel·lular¹³¹. Per tant la S1PL promou la tumorigènesi a través de l'activació de les vies de senyalització de la S1P.

La S1P exerceix un paper clau en el transport i la diferenciació de les cèl·lules immunitàries. És per això que el sistema immunitari és especialment sensible a alteracions en l'activitat S1PL. Els nivells de S1P en la sang i en la limfa són alts, en comparació amb la majoria de teixits. Aquesta diferència estableix un gradient en la concentració de S1P entre els fluids (sang i limfa) i els òrgans limfàtics, que es manté estrictament per l'activitat S1PL en aquests teixits. El gradient de S1P és essencial per la sortida dels limfòcits dels òrgans limfàtics¹³². A part d'aquest paper en el transport de limfòcits, la S1P i conseqüentment la S1PL, participen en la proliferació, supervivència i diferenciació de les cèl·lules immunitàries¹³³. És per això que l'alteració de l'activitat S1PL té greus conseqüències en el sistema limfàtic i comporta l'aparició de malalties immunitàries. Entre les diferents malalties associades a les alteracions d'esfingolípidis es troba la malaltia d'Alzheimer. Pacients d'Alzheimer presenten acumulacions de Cer i disminucions dels nivells de S1P, desequilibrant la balança cap a la mort cel·lular gradual de neurones. Aquests canvis en els nivells de Cer i S1P es deuen a que la S1PL i altres enzims relacionats en la degradació de S1P estant sobreexpressats en diferents regions cerebrals de pacients amb la malaltia d'Alzheimer¹³⁴.

Encara no s'ha demostrat la connexió directa entre mutacions de la S1PL o alteracions de la seva activitat amb malalties humanes concretes. No obstant, els estudis publicats recolzen la idea de que la S1PL és un regulador crític en diversos processos fisiològics i per tant és una prometedora diana farmacològica pel tractament de múltiples malalties, com malalties autoimmunes, neurodegeneratives o inflamatòries¹³⁵. Com a primer abordament, la inhibició de la S1PL és una prometedora estratègia terapèutica¹³⁶. S'ha demostrat que la pèrdua parcial de l'activitat S1PL afecta la resposta immunitària i ja s'han presentat inhibidors de la S1PL com a una nova classe de fàrmacs immunosupressors¹³⁰. Aquest és el cas del FTY720, un anàleg de So que actua com un potent immunosupressor ja que una vegada fosforilat és un agonista dels S1PR¹³⁷. El tractament amb FTY720 evita la sortida dels limfòcits dels nodes limfàtics causant una limfopènia i per tant un bloqueig de la resposta immunitària¹³⁸. La generació d'inhibidors específics de la S1PL permetrà augmentar els nivells de S1P intracel·lulars i per tant fer ús de la seves propietats de protecció contra la mort cel·lular. Per tal d'aconseguir aquest objectiu és imprescindible el desenvolupament de tècniques HTS per mesurar l'activitat S1PL i així descobrir nous inhibidors específics. Alternativament, l'activació de la S1PL endògena o l'administració d'una forma activa de l'enzim pot funcionar com a mecanisme per reduir els nivells de S1P en un context cel·lular on la senyalització de la S1P està contribuint a l'estat de la malaltia, com pot ser en el cas del càncer, fibrosi o angiogènesi patològica¹³⁹. De manera que, tant la inhibició com l'activació de la S1PL té finalitats terapèutiques.

2.2.3.1 Mètodes per determinar l'activitat S1PL

S'han descrit diverses metodologies per mesurar l'activitat S1PL utilitzant substrats radioactius o fluorescents. El mètode radiomètric més acceptat és el que implica l'ús de la [4,5-³H]dihidroesfingosina fosfat¹²⁷. Els inconvenients d'aquest assaig és la necessitat d'utilitzar material radioactiu, és un procediment tediós i la falta de reactius comercials per obtenir un substrat d'alta qualitat. Més recentment s'han desenvolupat nous mètodes basats en la fluorescència per mesurar l'activitat S1PL. Aquests mètodes utilitzen substrats fluorescents anàlegs de la S1P amb diferents fluoròfors com NBD¹⁴⁰ o un grup BODIPY¹⁴¹, on l'aldehid resultant fluorescent és pot detectar per HPLC acoblada a un detector de fluorescència. L'inconvenient d'aquesta metodologia és que requereix una extracció lipídica i una separació cromatogràfica i per tant no és aplicable a un enfoc HTS.

Un altre mètode independent de fluorescència però que requereix una separació cromatogràfica és el que van descriure Berdyshev i col·laboradors¹⁴². En aquest cas el substrat és la S1P i la determinació de l'activitat enzimàtica es basa en la quantificació del (*E*)-2-hexadecenal per LC/MS. Posteriorment el nostre grup va presentar una nova metodologia per determinar l'activitat S1PL per cromatografia de gasos acoblada a un espectròmetre de masses (GC/MS)¹⁴³. El substrat C17dhS1P és hidrolitzat per formar pentadecanal que es derivat amb penta-fluorobencil-

hidroxilamina (PFBHA) i quantificat per GC/MS. L'avantatge d'utilitzar aquest substrat enlloc de S1P¹⁴², és que el pentadecanal és més estable que el (*E*)-2-hexadecenal i per tant s'aconsegueix una determinació de l'activitat més acurada i precisa. Una altra aproximació és l'ús de substrats fluorogènics. En un altre treball del nostre grup es va descriure un anàleg cumarínic de la dhS1P com a substrat de la S1PL, el RBM13 (figura 14). Una vegada la S1PL catalitza la degradació del substrat, l'aldehid cumarínic resultant pateix una β -eliminació a pH neutre o alcalí que fa que s'alliberi el producte fluorescent, la umbel·liferona. La umbel·liferona no emet fluorescència mentre es troba unida a l'estructura de la dhS1P¹⁴⁴.

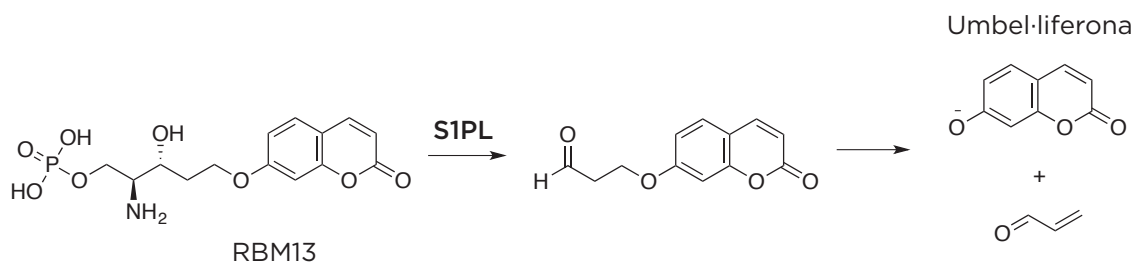


Figura 14: Reacció d'alliberació de la umbel·liferona del substrat fluorogènic RBM13 per acció de la S1PL¹⁴⁴

3 Autofàgia

L'autofàgia és un procés dinàmic en el que determinades proteïnes i orgànuls cel·lulars són degradats per acció dels enzims lisosomals. El mot autofàgia prové de les paraules gregues “autós” (que actúa sobre si mateix) i “phagía” (menjar). En condicions fisiològiques, l'autofàgia té un paper clau en l'homeòstasi cel·lular, funcionant com un sistema de control de qualitat intracel·lular. El propòsit és reciclar material per mantenir el metabolisme actiu durant la hipòxia, escassetat de metabòlits i evitar l'acumulació de material cel·lular danyat (incloent proteïnes o orgànuls)¹⁴⁵. Per tant la inducció d'autofàgia és una resposta adaptativa a l'estrès amb funcions citoprotectors¹⁴⁶. També és un procés necessari en la remodelació de teixits durant el desenvolupament i en la resistència davant infeccions¹⁴⁷. Ara bé, és un procés particularment important durant la falta de nutrients ja que amb l'autofàgia s'aconsegueix generar suficient energia pel manteniment de les activitats cel·lulars essencials.

3.1 Tipus d'autofàgia

En les cèl·lules de mamífer, existeixen tres tipus d'autofàgia (figura 15). S'anomenen: macroautofàgia, microautofàgia i autofàgia per xaperones (“chaperone-mediated autophagy”, CMA)¹⁴⁸.

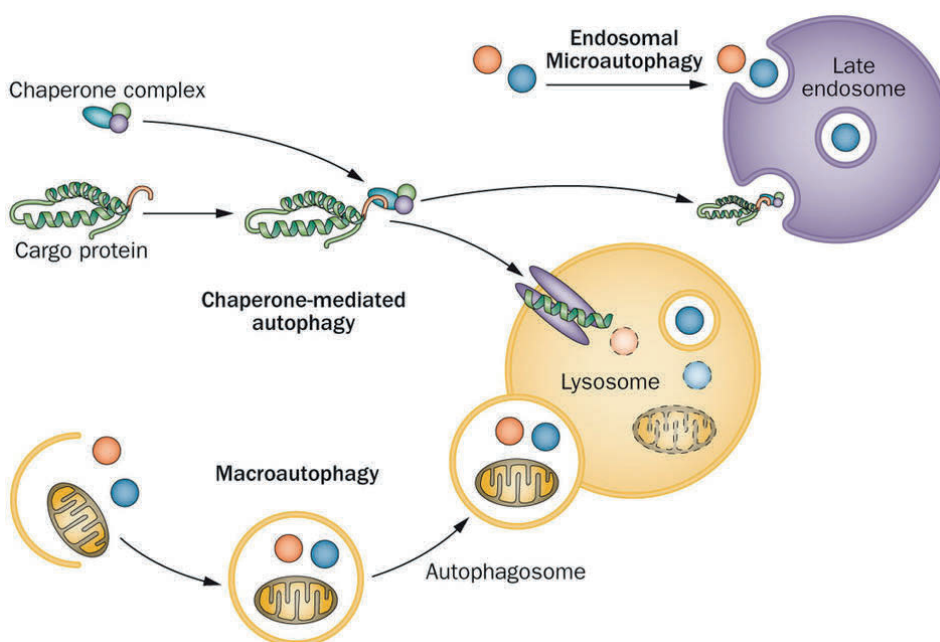


Figura 15: Tipus d'autofàgia: macroautofàgia (anomenada comunament “autofàgia”), microautofàgia o autofàgia per xaperones¹⁴⁸

La macroautofàgia, anomenada comunament “autofàgia”, és un procés amb varies etapes successives que es caracteritza per la formació d'unes vesícules de doble membrana denominades autofagosomes que capturen material citoplasmàtic i el

transporten fins els lisosomes (figura 16). Aquesta doble membrana s'origina a partir del fagofor, una estructura membranosa formada per lípids i proteïnes també anomenada “membrana d'aïllament”, que va creixent fins formar la vesícula. L'origen exacte del fagofor segueix sent desconegut, però sembla ser que prové de la membrana plasmàtica, el ER, el Golgi i el mitocondri¹⁴⁹. Durant l'elongació de la doble membrana, la proteïna LC3 associada a microtúbuls es conjuga amb la PE per formar LC3-II, un dels principals marcadors d'autofàgia. Els autofagosomes són transportats a través dels microtúbuls i la fusió d'aquests amb el lisosoma forma l'autofagolisosoma de membrana simple. Opcionalment, l'autofagosoma es fusiona amb un endosoma tardà per formar l'amfisoma que també acabarà fusionant-se amb el lisosoma. Dins del lisosoma, la H⁺ ATPasa vacuolar manté l'ambient àcid necessari per a que actuïn les hidrolases lisosomals degradant el material retingut¹⁵⁰. La degradació de proteïnes solubles i contingut citoplasmàtic genera aminoàcids i àcids grassos que es poden metabolitzar com a resposta a una demanda energètica en períodes d'estrès cel·lular. Aquesta via catabòlica generalment és estimulada davant l'escassetat de nutrients.

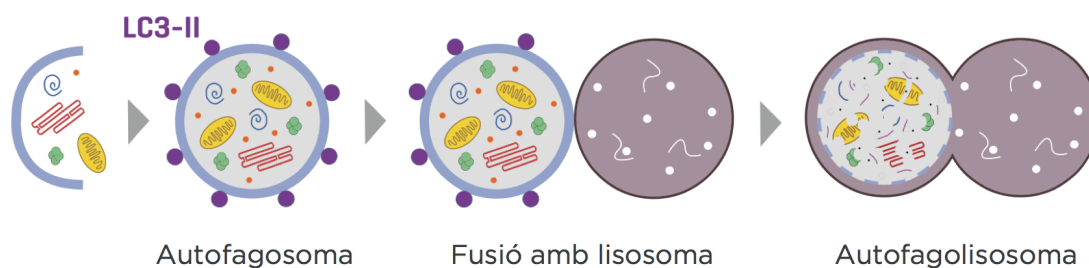


Figura 16: Representació esquemàtica de la progressió de l'autofàgia, des de la formació de l'autofagosoma fins a la degradació de la càrrega segregada en l'autofagolisosoma. Es destaca la presència i la degradació del marcador d'autofàgia LC3-II

Generalment l'autofàgia és una via de degradació citoplasmàtica no selectiva, tanmateix pot tenir dianes específiques com proteïnes agregades (agregafàgia), orgànuls com el mitocondri (mitofàgia), el ER (reticulofàgia) i els peroxisomes (pexofàgia), les gotes lipídiques (lipofàgia), les partícules de glicogen (glicofàgia), i patògens (xenofàgia)¹⁵¹. En aquests tipus d'autofàgia selectiva, diversos receptors participen en el reconeixement selectiu i en el reclutament de la càrrega en l'autofagosoma. El receptor millor caracteritzat és la proteïna sequestosoma 1 (SQSTM1) o p62. El catabolisme cel·lular està format principalment per dos vies, l'autofàgia i el sistema ubiquitina-proteosoma. Mentre el proteosoma està estrictament dedicat a la degradació de proteïnes, el lisosoma pot també degradar durant l'autofàgia altres constituents cel·lulars com orgànuls o lípids. En analogia al proteosoma, el reconeixement i la degradació d'agregats de proteïnes en l'autofàgia implica la ubiquitinació. p62 reconeix les proteïnes ubiquitinades, interactua amb la LC3-II (pel domini associat a ubiquitina) i d'aquesta manera es recluten les proteïnes en l'autofagosoma¹⁵².

En la microautofàgia, no és necessari la formació de vesícules intermediàries. Així doncs es formen invaginacions en la superfície dels endosomes tardans que atrapen el material citoplasmàtic a degradar per hidrolases luminals. El material a degradar pot ser engolit directament pels endosomes o de manera selectiva a través d'interacció amb les xaperones. En darrer terme, en la CMA les proteïnes amb la seqüència KFERQ són reconegudes i conduïdes al lisosoma per a ser degradades de manera selectiva mitjançant complexes de translocació, enlloc de l'ús de vesícules. Aquest tipus de transport requereix l'acció coordinada de xaperones Hsc70 que faciliten el desplegament de les proteïnes danyades i el seu translocament cap a l'interior del lisosoma a través del receptor de membrana lisosomal Lamp-2A (proteïna associada a la membrana del lisosoma 2A)¹⁵¹.

3.2 Vies de regulació de l'autofàgia

La iniciació de la formació del autofagosoma, la seva elongació, transport i fusió amb els lisosomes està controlat per un grup de gens relacionats amb l'autofàgia, els gens Atg (figura 17). D'entrada el complex ULK que engloba les proteïnes ULK1/2 ("Unc51-like kinase 1/2"), Atg13, Atg101 i FIP200 regula la iniciació de l'autofagosoma. Aquest complex està sota el control del complex mTORC1 que conté mTOR (diana de rapamicina en mamífers). mTOR està considerat com el principal inhibidor de l'autofàgia i actua com a un sensor de nutrients. En condicions d'abundància de nutrients, mTOR és activat per la via de senyalització de la fosfatidilinositol-3-cinasa classe I (PI3KC1) i la proteïna cinasa B (Akt). Per contra, l'escassetat de nutrients inhibeix mTOR (a través de receptors d'insulina) i resulta en una inducció d'autofàgia. La inhibició de mTOR està considerat un pas clau en la activació primerenca de l'autofàgia⁸³. No obstant, també existeixen mecanismes d'activació d'autofàgia independents de mTOR com és el cas de la via en la que participa la cinasa AMPK¹⁵³. AMPK fosforila el complex TSC1/TSC2 en resposta a nivells baixos d'ATP, el que comporta la inactivació de mTOR i la inducció d'autofàgia. AMPK també pot inhibir la proteïna Raptor del complex mTORC1 i per tant bloquejar l'efecte inhibidor de mTOR sobre ULK1.

Mentre mTOR està actiu, el complex ULK es manté retingut. Una vegada mTOR s'inactiva, el complex ULK es dissocia de mTOR i es transloca en el lloc on es formarà l'autofagosoma. El següent complex a activar és el complex PI3KC3 que regula la nucleació i assemblatge de la membrana del fagofor. Aquest complex està format per la fosfatidilinositol-3-cinasa classe 3 (PI3KC3) anomenada Vps34, la cinasa Vps15 i la Beclin 1. Quan el complex ULK s'activa, la ULK1 pot fosforilar la Vps34 i Beclin 1, i per tant activar el complex PI3KC3¹⁵⁴. Aquest complex s'inactiva per l'acció de Rubicon/UVRAG i per Bcl-2. A la vegada el complex interacciona amb diferents proteïnes activadores com l'Atg14L, Bif-1/UVRAG i Ambra1. Aquesta última és una proteïna pro-autofàgica que connecta el complex PI3KC3 als microtúbuls. El paper de ULK1 també és fosforilar Ambra1 i així alliberar el complex PI3KC3 del citoesquelet, forçant la localització del complex en el ER, el principal orgànul

responsable de la formació de l'autofagosoma¹⁵⁵. El complex PI3KC3 llavors produeix PI(3)P (fosfatidilinositol-3-fosfat) en la membrana de l'autofagosoma a partir de la fosforilació del fosfatidilinositol. En condicions basals la proteïna mAtg9 és transfereix entre el Golgi i els endosomes. Durant la inducció d'autofàgia la mAtg9 és la responsable de subministrar lípids principalment des del Golgi o els endosomes per la biogènesi de l'autofagosoma. Atès que la mAtg9 no s'ha detectat ens els autofagosomes, és probable que s'elimini abans que l'autofagosoma s'hagi completat¹⁵⁶.

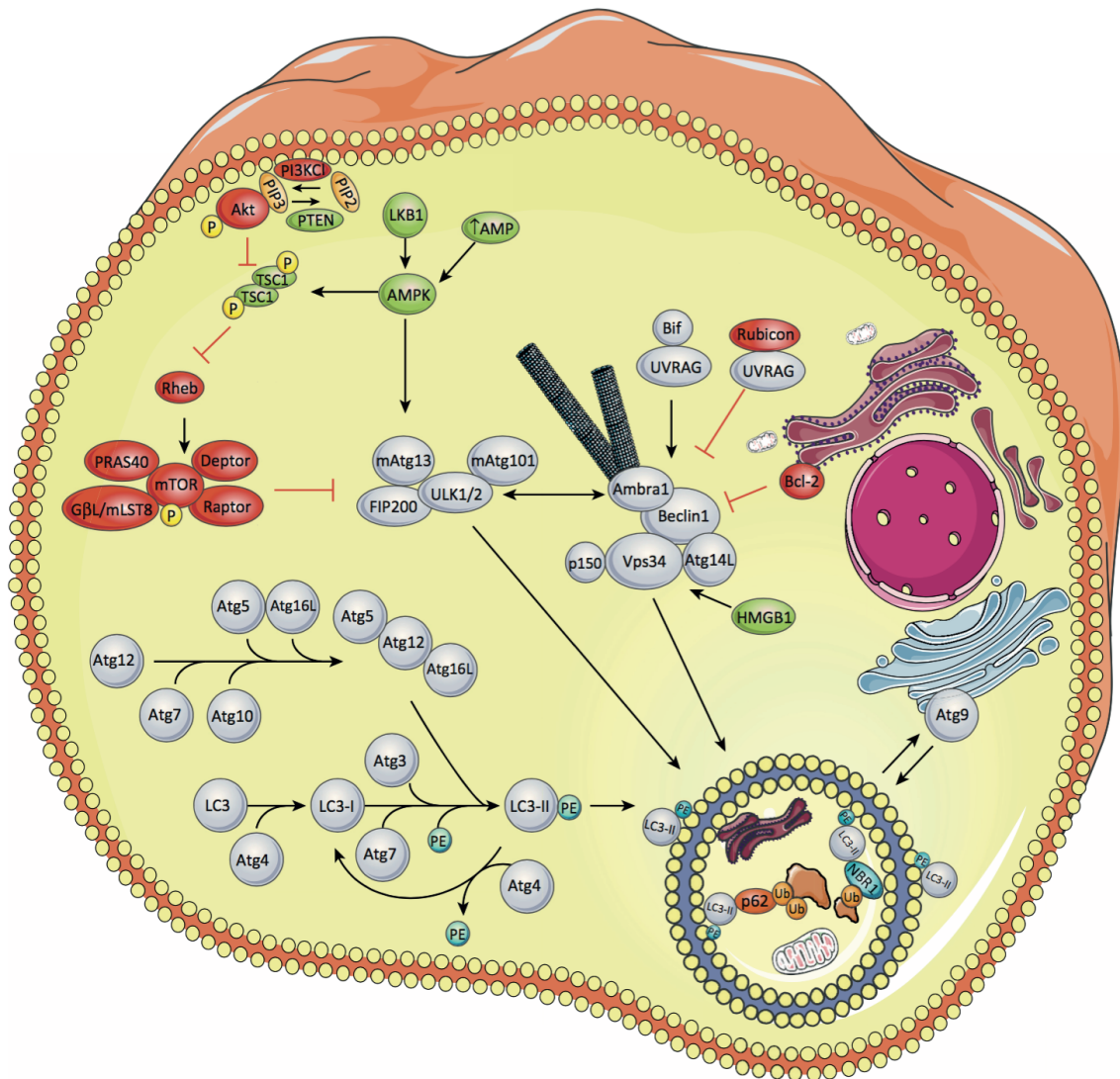


Figura 17: Mecanismes moleculars en la regulació de l'autofàgia. Extret de Maes i col., 2013¹⁵¹

La formació, expansió i tancament de la membrana de l'autofagosoma està regulada per dos processos on participen proteïnes tipus ubiquïtina. En primer lloc, l'Atg7 i l'Atg10 intervien en la formació del complex Atg5/Atg12. Aquest complex més tard s'uneix a l'Atg16L, formant el complex Atg16L. Paral·lelament la proteïna LC3 (proteïna associada a microtúbuls de cadena lleugera 1A/1B 3, Atg8 en llevats) és

processada per la cisteïna proteasa Atg4 per formar la LC3-I. Gràcies a l'Atg7, l'Atg3 i el complex Atg16L, la forma citosòlica LC3-I es conjuga pel residu de glicina amb la PE, generant la forma lipidada LC3-II associada a la membrana de l'autofagosoma. Les proteïnes WIPs ("WD repeat domain phosphoinositide interacting") que interaccionen amb el PI(3)P localitzat en la membrana de l'autofagosoma, són les encarregades de reclutar el complex Atg16L i la LC3-I i per tant la seva funció és essencial per la lipidació de la LC3-I¹⁵⁷. Després de la formació de l'autofagosoma, el complex Atg16L deixa l'autofagosoma i la LC3-II localitzada a la cara citosòlica es recicla per acció de l'Atg4 perdent així la PE. No obstant, la LC3-II que es troba en la cara interna del autofagosma és retinguda i per tant degradada pels enzims lisosomals. En humans la proteïna de llevat Atg8 té com homòlogues la proteïna LC3 però també les proteïnes de la subfamília GABARAP ("gamma-aminobutyric acid type A receptor-associated protein"). La LC3 i les GABARAP tenen la funció de reclutar proteïnes a l'autofagosoma com per exemple p62.

Una vegada completat la formació de l'autofagosoma, la membrana externa es fusiona amb el lisosoma alliberant el contingut a degradar en el lumen lisosomal. La membrana interna de l'autofagosoma i el seu contingut es degrada i s'obtenen aminoàcids i àcids grassos que s'alliberen altre cop al citosol. Són aquests aminoàcids els responsables de la reactivació de mTOR i en conseqüència s'atura l'autofàgia. A més s'estimula el reciclatge dels components de membrana i estructures usades, establint un cicle d'autoregulació que combina la disponibilitat de nutrients mitjançant l'autofàgia i l'homeòstasi del lisosoma¹⁵⁸. La terminació d'aquest procés és anomenat flux autofàgic. La magnitud d'aquest flux es pot mesurar amb els nivells de la proteïna LC3-II acumulada amb o sense el bloqueig del pas de la fusió de l'autofagosoma amb el lisosoma.

És interessant l'existència de diverses vies d'autofàgia. La via d'autofàgia dependent de Beclin 1 es defineix com la via canònica o clàssica; d'altra banda, la via independent de Beclin 1, és coneguda com l'autofàgia no canònica. L'activació de la via no canònica significa que l'autofàgia és induïda en cèl·lules on l'expressió de Beclin 1 no és suficient per induir l'autofàgia canònica. Cal destacar que les diferents vies no són excloents, i poden donar-se alhora l'autofàgia convencional i l'alternativa. En la via canònica o clàssica l'assemblatge de l'autofagosoma és promogut per la formació del complex entre Beclin 1 i Vps34. L'autofàgia canònica més comú és la dependent d'Atg5/Atg7, tot i que també existeix una via canònica independent d'Atg5/Atg7 on tampoc participa la LC3¹⁵⁹. Per contra, l'autofàgia no canònica o no clàssica és un procés que no requereix la participació de tot el conjunt de proteïnes Atg per formar l'autofagosoma. Aquesta via alternativa d'autofàgia és independent de Beclin 1 i normalment també de Vps34, tot i que no sempre implica independència de Vps34. Una característica comuna de l'autofàgia no canònica és la dependència de l'activitat del complex ULK 1/2 per la inducció d'autofàgia i d'Atg5/Atg7 i LC3 per la formació de l'autofagosoma¹⁶⁰.

3.3 Autofàgia i esfingolípids

Múltiples evidències indiquen que existeix una relació entre el metabolisme dels esfingolípids i l'autofàgia. A més, sembla ser que és el balanç entre les espècies d'esfingolípids el que determinarà el destí cel·lular. No obstant, la certesa que els esfingolípids estan associats al procés autofàgic, i els mecanismes pels quals ho assolixen, resten incomplets. Els esfingolípids són components lipídics que abunden a les membranes dels eucariotes i que intervenen en un ampli ventall de processos cel·lulars, i és per això que s'han convertit en forts candidats com a possibles lípids estructurals de l'autofagosoma. Concretament la Cer ha estat relacionada amb aquesta funció estructural¹⁶¹. Durant l'elongació de l'autofagosoma, s'utilitzen estructures membranoses del ER. Ja que és en aquest orgànu on es troben els enzims de la biosíntesi de novo de la Cer, és possible que aquests siguin reclutats en els autofagosomes i que segueixin produint esfingolípids¹⁶².

Diferents esfingolípids bioactius han estat descrits com reguladors de les vies d'autofàgia, sent la Cer i la S1P els millors caracteritzats (figura 18). Es coneix que la Cer exògena indueix autofàgia citotòxica, això ocorre en diferents tipus de càncer, com de colon, de mama, de cèrvix, nasofaringi i cèl·lules de glioma¹⁶². Així mateix, diversos estudis han assignat efectes en la inducció d'autofàgia a les Cer endògenes. Com per exemple s'ha descrit que el Tamoxifen, un antagonista de receptors d'estrògens utilitzat en càncer de mama, provoca una acumulació de Cer endògenes i amb conseqüència s'indueix mort cel·lular associada a l'autofàgia¹⁶³.

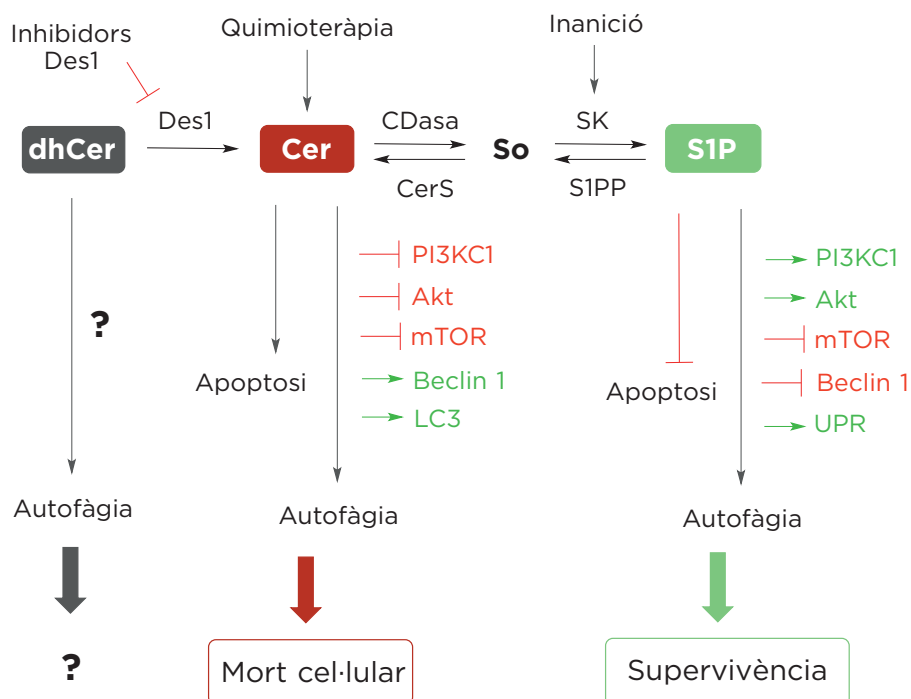


Figura 18: Model de l'autofàgia relacionada amb els esfingolípids i les seves conseqüències en el destí cel·lular. Modificat a partir de Li i col., 2014¹⁶². UPR, "unfolded protein response"

Els mecanismes per els quals la Cer, tant exògena com endògena, indueixen autofàgia són diversos. Una de les vies de senyalització implicades és la via on participa la PI3KC1 i Akt, molècules que regulen negativament l'autofàgia. Cadenes llargues de Cer inhibeixen la fosforilació de les cinases PI3KC1 i Akt, de manera que es reverteix l'efecte i es promou l'autofàgia¹⁶³. Després d'un tractament amb certs fàrmacs quimioterapèutics, com el Tamoxifen, la Cer inhibeix la via de senyalització de mTOR, augmentant l'expressió de Beclin 1, una proteïna pro-autofàgica¹⁶³. Altres estudis descriuen que la Cer inhibeix transportadors d'aminoàcids, provocant una falta de nutrients i estrès metabòlic que acabarà estimulant l'autofàgia a través de la inhibició de mTOR¹⁶⁴.

També s'ha demostrat que la Cer promou la dissolució del complex Beclin 1/Bcl-2. La Cer estimula la fosforilació de Bcl-2 a través de l'activació de la cinasa JNK1 (proteïna cinasa c-Jun N-terminal 1)¹⁶⁵. Com ja s'ha esmentat la Bcl-2 actua sobre la Beclin 1 inhibint la formació del fagofor i per tant al dissociar el complex es bloqueja la inhibició d'autofàgia. Una altra diana de la Cer, quan està localitzada en la membrana dels mitocondris, és la proteïna LC3 dels autofagosomes i que resulta amb la inducció d'autofàgia citotòxica, en aquest cas específic, la mitofàgia¹⁶⁶.

La S1P també ha estat relacionada amb l'autofàgia, però en aquest cas amb l'objectiu de la supervivència cel·lular davant l'escassetat de nutrients. Al contrari de l'autofàgia associada a la Cer, l'efecte de la S1P no està relacionat amb l'acumulació de Beclin 1 o la inhibició de PI3KC1 o Akt. S'ha demostrat que la S1P promou l'autofàgia per inhibició de mTOR, i que aquest efecte és independent de la via de senyalització de PI3KC1/Akt⁵³. Tot i així també s'ha descrit un efecte de la S1P independent de mTOR. L'augment dels nivells de S1P després de silenciar la fosfatasa S1PP (enzim catabòlic de la S1P) provoca l'activació de la resposta UPR ("unfolded protein response" o resposta a proteïnes mal plegades) i estrès del ER, amb la conseqüent activació d'autofàgia¹⁶⁷. S'observen algunes diferències entre l'autofàgia induïda per la Cer i la S1P, que podrien ser responsables del destí final de la cèl·lula cap a la supervivència o la mort. Tot i que ambdues molècules tenen la capacitat d'induir l'autofàgia, els efectes de la S1P són més atenuats en comparació amb la Cer. Les Cer actuen en etapes més primerenques com PI3KC1/Akt en comparació amb la S1P. Finalment l'estrès que desencadena la resposta també és diferent; les Cer augmenten per acció de diferents quimioterapèutics, en canvi els nivells de S1P només es veuen alterats per l'augment de l'activitat SK durant l'escassetat de nutrients⁵³. Aquestes observacions corroboren l'existència de l'anomenat "reòstat d'esfingolípids", on els nivells relatius i les funcions recíproques d'aquests metabòlits antagonistes (Cer i S1P), controlen i decideixen el destí final cel·lular.

Durant anys la dhCer s'ha utilitzat com a control negatiu de tractaments amb Cer per induir autofàgia, ja que les dhCer eren considerades molècules biològicament inactives. Ara bé, estudis més recents han identificat les dhCer com novadores mediadores de l'autofàgia³⁹. Tenint en compte els estudis descrits, les dhCer poden induir tant una autofàgia protectora com citotòxica. L'inhibidor de la Des1, XM462

provoca una acumulació de dhCer endògenes i una posterior inducció d'autofàgia que redueix la toxicitat de l'etopòsid en cèl·lules de càncer gàstric⁴⁴. D'altra banda, anticancerígens com la 4-HPR⁸¹ i el γ -TE⁸⁵ indueixen autofàgia citotòxica després d'una acumulació de dhCer. Cal destacar que cap dels mecanismes descrits per la qual la Cer indueix autofàgia són activats per la dhCer¹⁶³. Això fa pensar que les dhCer han de tenir un paper addicional en la regulació del destí cel·lular. Malauradament l'efecte de les dhCer en l'autofàgia segueix sent poc clar i controvertit.

3.4 Relació entre autofàgia i apoptosi

L'apoptosi i l'autofàgia són reconegudes com les principals vies de mort cel·lular programada. Mentre que l'apoptosi sempre resulta en mort cel·lular, generalment l'autofàgia és considerada un mecanisme de supervivència tot i que també pot contribuir a la mort cel·lular en diverses situacions. Existeix una complexa interacció entre apoptosi i autofàgia. El factor clau per escollir entre les dues vies de mort cel·lular és la disponibilitat d'ATP, element indispensable per la via apoptòtica. En certes situacions, l'autofàgia actua com a supressor de l'apoptosi davant una resposta a l'estrès per promoure la supervivència¹⁴⁶. Però també s'ha descrit que l'autofàgia pot promoure l'apoptosi mitjançant la degradació de reguladors negatius que controlen la maquinària de l'apoptosi com per exemple la fosfatasa FAP-1¹⁴⁷. D'altra banda si es degraden reguladors positius de l'apoptosi, com la caspasa-8, l'efecte resultant és el bloqueig de l'apoptosi^{168,169}. Tanmateix, en un altre context, l'autofàgia pot convertir-se en un mecanisme de mort cel·lular no-apoptòtic¹⁷⁰.

L'apoptosi també influeix directament en l'autofàgia. Normalment la regulació recau en la degradació d'inductors d'autofàgia per part de les caspases. Per exemple la Beclin 1 és un substrat per la caspasa-3¹⁷¹. La hidròlisi de Beclin 1 comporta una reducció de l'autofàgia i un augment en l'apoptosi en cèl·lules HeLa. Un altra proteïna essencial per l'autofàgia hidrolitzada per les caspases és l'Atg3 que regula la formació de l'autofagosoma. La degradació d'Atg3 per la caspasa-8 inactiva l'autofàgia, però si es torna a expressar l'Atg3 sencera s'aconsegueix restablir l'activitat autofàgica¹⁷². Per acabar, també s'ha descrit que l'efecte de les caspases sobre Ambra1, molècula activadora de Beclin 1, provoca la inhibició de l'autofàgia¹⁷³.

Diversos esfingolípid bioactius han resultat ser peces importants en la regulació entre apoptosi i autofàgia, determinant així el destí cel·lular. Aquesta connexió és deguda a que certes dianes dels esfingolípid es troben tant en les vies de senyalització de l'apoptosi com en l'autofàgia. L'efecte de la Cer sobre la inducció de l'apoptosi en el mitocondri és altament conegut. Així com també es coneix que la S1P promou la supervivència cel·lular i bloqueja l'apoptosi. De les dhCer s'ha descrit la seva capacitat de bloquejar els canals generats per la Cer en el mitocondri i així convertir-se en un lípid anti-apoptòtic³⁸. Per tant és altra cop la relació entre dhCer, Cer i S1P la que condiciona el destí cel·lular. La conversió de Cer a S1P fa que enlloc

de la inducció d'apoptosi s'activi l'autofàgia citoprotectora¹⁷⁴. En situacions d'hipòxia s'ha descrit que les dhCer exhibeixen efectes anti-apoptòtics i que promouen l'autofàgia protectora, però que també actuen com a reserva per la ràpida producció de Cer en cas que sigui necessari l'activació de l'apoptosi⁷⁰.

3.5 Autofàgia i càncer

El paper de l'autofàgia en el procés del càncer és controvertit. En cèl·lules sanes l'autofàgia és imprescindible pel manteniment de l'homeòstasi cel·lular, evitant l'estrès oxidatiu i la inestabilitat genòmica, fets que podrien portar a la transformació maligna. A més, l'autofàgia està implicada en l'activació de la immunosupervisió anticancerígena. Aquest és un procés per el qual el sistema immunitari elimina de forma constant cèl·lules potencialment cancerígenes abans que s'estableixin com a tumors malignes¹⁷⁵. Per tant, durant les primeres etapes de la iniciació de la tumorigènesi, l'autofàgia suprimeix la formació de tumors¹⁷⁶. No obstant això, si el càncer progressa, en cèl·lules neoplàsiques l'autofàgia constitueix un mitjà per fer front a l'estrès cel·lular (condicions d'hipòxia i falta de nutrients), ajudant a la supervivència, proliferació, invasió i metàstasi, afavorint així la progressió tumoral¹⁷⁷. A més s'ha descrit l'activació de l'autofàgia en resposta a diferents tractaments contra el càncer, convertint-se en un risc a patir resistència al tractament¹⁷⁸.

En condicions normals l'autofàgia evita l'aparició del càncer. S'ha demostrat en models de ratolí, que defectes en la maquinària de l'autofàgia provoquen una acceleració del procés tumoral. Per exemple ratolins *knockout* heterozigots pel gen de la Beclin 1 *BECN1*^{+/-} (els animals *BECN1*^{-/-} no són viables), desenvolupen tumors de manera espontània¹⁷⁹. Els mecanismes per els quals l'autofàgia actua com a supressora de tumors són diversos, com per exemple evitant l'acumulació de defectes genètics, que poden comportar a la transformació maligna. També contribueix a la mort¹⁸⁰ o senescència¹⁸¹ de les cèl·lules tumorals induïda per oncogens, dos mecanismes fonamentals per la supressió tumoral. Per altra banda, la inducció d'autofàgia també està implicada en la degradació d'oncoproteïnes¹⁸², l'activació de la resposta immunitària contra cèl·lules malignes¹⁷⁵ i la defensa contra infeccions víriques i bacterianes. Aquests patògens poden desencadenar un procés cancerigen com és el cas del virus de l'hepatitis B en el carcinoma hepatocel·lular¹⁸³ o l'*Helicobacter pylori* associat al carcinoma gàstric¹⁸⁴.

Una cop s'ha produït la transformació maligna, l'autofàgia promou la progressió del tumor i la seva resistència a la teràpia. Això és degut a que l'autofàgia redueix la sensibilitat de les cèl·lules cancerígenes a estímuls que en condicions normals provoquen la seva mort, com és la hipòxia o l'escassetat de nutrients¹⁴⁶. L'autofàgia a més aporta a les cèl·lules transformades una resistència a múltiples agents quimioterapèutics i permet la supervivència de cèl·lules alliberades de la membrana basal, el que permet la metàstasi tumoral.

En resum, tant la inducció com la inactivació de l'autofàgia pot contribuir a la tumorigènesi (figura 19). Degut a que l'autofàgia té dos papers completament oposats en la tumorigènesi, es considera un "arma de dos talls": limita la iniciació tumoral però promou la progressió i establiment del tumor¹⁸⁵. Inicialment, una disminució en l'activitat de l'autofàgia facilita l'adquisició de característiques malignes per part de les cèl·lules sanes. Més tard, una vegada s'ha establert el tumor, la restauració de l'autofàgia és essencial per la proliferació del càncer. Per tant la transició de la cèl·lula sana a la cèl·lula tumoral es deu en part a una pèrdua temporal, però no estable, de la capacitat d'activar l'autofàgia. El mecanisme per el qual la resposta autofàgica es restaura per iniciar la progressió tumoral, és desconeguda.

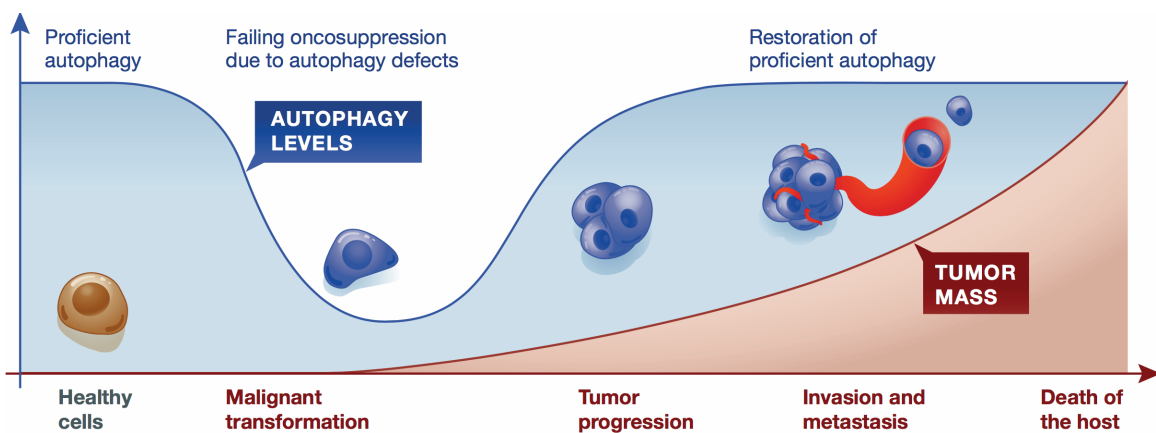


Figura 19: El paper de l'autofàgia en la transformació i progressió tumoral. Extret de Gazzulli i col., 2015¹⁸⁶

En l'àmbit mèdic, dos fàrmacs basats en la regulació de l'autofàgia estant sent provats actualment ens assajos clínics. És el cas de la cloroquina i la hidroxicloroquina, dos fàrmacs lisosomotròpics que bloquegen l'autofàgia inhibint la fusió entre l'autofagosoma i el lisosoma i per tant la seva degradació¹⁸⁷. No obstant en no actuar en processos exclusivament implicats en l'autofàgia, presenten múltiples efectes secundaris. És per això que a pressa la necessitat pel desenvolupament de noves molècules capaces d'inhibir l'autofàgia de manera selectiva i a poder ser, que només afectin a les cèl·lules malignes. Per tal d'assolir aquest repte és imprescindible la caracterització del procés autofàgic en el càncer abans de poder implementar l'ús d'aquests prometedors fàrmacs en la rutina clínica.

4 Inhibidors de Des1 que indueixen autofàgia (DIPACS)

La inhibició de l'enzim Des1 pot ser beneficiosa en un gran ventall de malalties en què l'autofàgia és insuficient i és útil la seva inducció. En el càncer, per exemple, l'ús de fàrmacs inductors d'autofàgia representa un mecanisme alternatiu per induir mort cel·lular en cèl·lules canceroses resistents a l'apoptosi¹⁸⁸. A continuació es presenten tres inhibidors de Des1 que s'ha descrit la seva capacitat per induir autofàgia (DIPACS, "Des 1 inhibitory pro-autophagic compounds" o inhibidors de Des1 pro-autofàgics) (figura 20), el celecoxib (CCX), fenoxodiol (PXD) i resveratrol (RV).

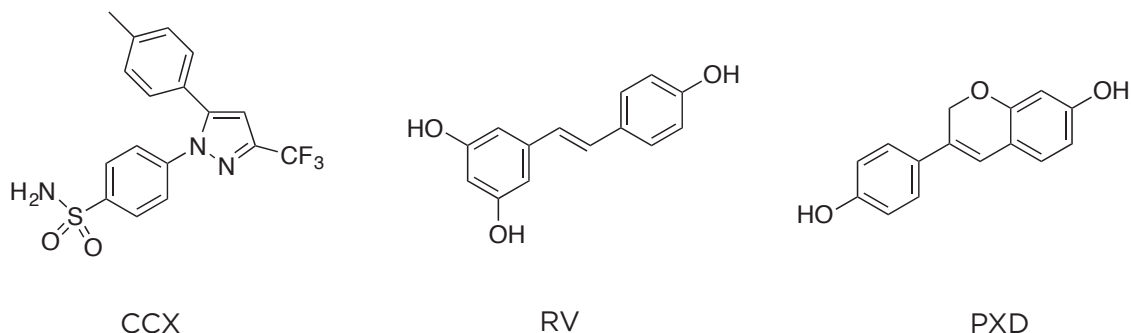


Figura 20: Estructures químiques dels fàrmacs inductors d'autofàgia. Celecoxib (CCX), resveratrol (RV) i fenoxodiol (PXD)

4.1 Celecoxib

El CCX (4-[5-(4-metilfenil)-3-(trifluorometil) pirazol-1-il] benzenesulfo namida) és un fàrmac antiinflamatori amb una potent activitat antitumoral¹⁸⁹. És un coxib, una classe d'antiinflamatoris no esteroïdals (AINEs) que inhibeixen de manera molt selectiva la ciclooxigenasa 2 (COX-2). La ciclooxigenasa (COX) és un enzim clau en la síntesi de prostaglandines a partir de l'àcid araquidònic. Existeixen dues isoformes, anomenades ciclooxigenasa 1 (COX-1) i COX-2. Mentre que la COX-1 s'expressa de manera constitutiva en diversos teixits, la COX-2 és induïble durant la inflamació i la carcinogènesi¹⁹⁰. Més recentment s'ha descrit la existència d'una tercera isoforma, la ciclooxigenasa 3 (COX-3)¹⁹¹, no obstant la seva implicació en la fisiologia humana encara no és coneguda del tot. Els coxib es van dissenyar amb l'objectiu d'inhibir la COX-2, que és induïda durant la inflamació o la carcinogènesi, sense que s'afectés l'activitat de la COX-1 que s'expressa sobretot en el tracte gastrointestinal, ronyons i plaquetes. És en aquests teixits on COX-1 té la funció de generar prostaglandines implicades en la protecció gàstrica, excreció d'aigua o l'activació plaquetària. En canvi COX-2 semblava només estar implicada en el procés inflamatori. Des de la seva sortida al mercat en 1999, s'han realitzat múltiples investigacions de l'anomenada "hipòtesi de la COX-2"^{192,193} que descriu que els coxib redueixen el dolor i la inflamació inhibint COX-2 i a més eviten els efectes secundaris propis dels AINEs no selectius, que inhibeixen tant COX-2 com COX-1. El CCX i altres coxib com rofecoxib i valdecoxib, van ser acceptats com a fàrmacs en base als resultats obtinguts en diversos assajos clínics que comparaven l'efecte d'aquests compostos amb AINEs,

demostrant que els coxib eren igual d'eficaços i presentaven menys efectes secundaris gastrointestinals. El primer estudi en que es va suggerir que els coxib augmentaven el risc de patir alteracions cardiovasculars greus com la mort cardiovascular, infart de miocardi o ictus, es va realitzar poc després de la seva venta¹⁹². No obstant, Merck (EEUU), l'empresa que comercialitzava el fàrmac, va minimitzar l'impacte del descobriment. No va ser fins 2005, en un assaig clínic amb CCX, quan va quedar clarament demostrat que els coxib augmentaven fins a tres vegades el risc de patir alteracions cardiovasculars greus¹⁹⁴. Es va descobrir que la COX-2 s'expressava de manera constitutiva en les cèl·lules endotelials i és requerida la seva activitat per la síntesi de prostaglandines amb un paper en la protecció vascular. Per tant la seva inhibició selectiva, pot provocar efectes adversos greus en el sistema cardiovascular¹⁹³. Des d'aquest moment la FDA (administració d'aliments i fàrmacs dels Estats Units), recomana que els coxib s'han de reservar per a pacients amb un alt risc de patir alteracions gastrointestinals o per aquells que són intolerants o no responen als AINEs¹⁹⁵.

S'ha descrit que els coxibs, i concretament el CCX, indueixen apoptosi i aturada del cicle cel·lular en diversos tipus de cèl·lules de càncer i es coneix que la seva activitat antitumoral és independent de la seva activitat inhibidora de COX-2¹⁹⁶. Tot i així, no és coneix amb profunditat el mecanisme molecular per el qual el CCX exerceix els seus efectes citotòxics. No obstant, s'ha demostrat que part dels seus efectes estant relacionats amb el metabolisme dels esfingolípid. El CCX ha estat descrit com a inhibidor de Des1 en cèl·lules intactes amb una IC₅₀ al voltant de 80 μM⁴⁹. El tractament de CCX en diverses línies canceroses indueix un augment significatiu de dhCer mentre que les Cer disminueixen, en una resposta depenent del temps i la concentració, mentre que amb altres coxibs no s'observaven canvis en els nivells d'esfingolípid. Per tant la inhibició de Des1 per part del CCX, també és independent de la seva acció sobre COX-2. Tot i així, la conversió de les dhCer acumulades en l'apoptòtica Cer dona com a resultat la mort de la cèl·lula¹⁹⁷. La inhibició de Des1 sembla contribuir als efectes antiproliferatius de CCX⁴⁹, ja que el tractament amb miriocina (inhibidor de l'enzim SPT) redueix la potència antiproliferativa del CCX. Altres efectes del CCX sobre la cèl·lula inclouen l'aturada del cicle cel·lular en G₁/G₀, l'activació de l'apoptosi i la inducció de l'autofàgia¹⁹⁸. Concretament en cèl·lules de càncer gàstric el mecanisme per el qual el CCX indueix apoptosi i autofàgia, és a través de la via de senyalització d'Akt¹⁹⁹.

4.2 Resveratrol

El RV (3,5,4'-trihidroxiestilbè) és un estilbenoid, un polifenol natural derivat de l'estilbè amb reconegudes propietats antioxidants²⁰⁰. El RV es troba en abundància en la pell del raïm, però també en altres baies o fruits secs com nabius, cacauets o festucs²⁰¹. En les plantes, el RV exerceix una funció antioxidant mitjançant la protecció contra el dany solar. Els productes alimentaris contenen tant les isoformes

cis i *trans* del RV, i majoritàriament és troba glicosilat. La glicosilació evita l'oxidació enzimàtica, fet que fa que augmenti l'estabilitat i la biodisponibilitat del RV²⁰².

L'existència de múltiples efectes biològics per part del RV és causada principalment per l'abundància i diversitat de dianes moleculars que té aquest compost com una àmplia gamma de diferents cinases, factors de transcripció, citocines i altres. La seva capacitat per modular diferents vies de senyalització fa que el RV exerceixi un paper fisiològic complex. Entre els seus efectes s'ha descrit les propietats anti-inflamatòries i anti-fibròtiques²⁰³, antitumorals^{204,205}, protecció en malalties renals²⁰⁶ i activitat contra l'obesitat²⁰⁷, diabetis²⁰⁸, trombosi²⁰⁹, esteatosi hepàtica²¹⁰ i altres malalties cardiovasculars²¹¹. Es creu que l'excés de ROS al cervell està involucrat en la patogènesi de diverses malalties neuro-degeneratives com ara la malaltia d'Alzheimer, el Parkinson, la malaltia de Huntington o els accidents cerebrovasculars. És per això que el RV ha estat designat com a un prometedor agent terapèutic natural amb potencial farmacològic contra aquestes patologies²¹². La principal capacitat del RV és la seva propietat antioxidant, tot i que cal remarcar que aquesta depèn de la concentració i del tipus cel·lular. S'ha demostrat que el RV a concentracions baixes actua com a antioxidant, mentre que a concentracions elevades funciona com un prooxidant. El RV com a antioxidant exerceix un efecte dual: elimina els radicals lliures com hidroxils o superòxids i augmenta l'activitat dels enzims antioxidants²¹³. L'activitat anticancerígena del RV també depèn de la seva concentració, mentre que en una dosi baixa el RV actua com un agent antiapoptòtic i cardioprotector²¹⁴, a dosis més elevades el RV interfereix en les tres etapes de la carcinogènesi: iniciació, promoció i progressió. En la major part de les línies canceroses estudiades, el RV atura el cicle cel·lular en la fase G₁/S, bloqueja la proliferació²¹⁵, i després d'un tractament prolongat induïx apoptosi²¹⁶. També s'ha demostrat que el RV inhibeix la invasió i la metàstasi tant *in vitro* com *in vivo* a través de la reducció de l'expressió de la metaloproteïna MMP-9, sobreexpressada en tumors malignes²⁰⁴. Diversos estudis han demostrat que el RV és capaç d'induir l'autofàgia canònica o no canònica en una sèrie de tipus de càncer a través de múltiples vies de senyalització modulant l'expressió o activitat de proteïnes clau¹⁶⁰. Per exemple, Trincheri i col·laboradors presenten que el RV induïx l'autofàgia canònica a través de l'activació de PI3K en càncer colorectal²¹⁷. Mentre que també s'ha descrit la inducció d'autofàgia independent de Beclin 1 en resposta al RV en cèl·lules de càncer de mama²¹⁸.

En relació amb els esfingolípids, s'ha descrit que el RV provoca un augment de la generació intracel·lular i acumulació de Cer que resulta en la mort apoptòtica en cèl·lules de leucèmia²¹⁹. La inhibició de l'enzim esfingosina SK1, sembla estar relacionada amb la citotoxicitat del RV²²⁰. A part d'inhibir la SK1, el RV està descrit com a inhibidor de Des1. En les cèl·lules de càncer gàstric HGC27, el RV està involucrat en l'activació de l'autofàgia degut a la inhibició de Des1 i la conseqüent acumulació de dhCer²²¹. Aquest efecte és reproduït per l'inhibidor directe de Des1, XM462 (eina farmacològica en que s'ha comprovat la inducció d'autofàgia a través de l'acumulació de dhCer)⁴⁴. Aquests experiments recolzen que, com a mínim en

part, la inducció d'autofàgia pel RV és deguda a la inhibició de Des1 en aquests models cel·lulars. En ser un compost fenòlic, segurament el RV inhibeix Des1 de manera indirecta alterant l'estat redox de la cèl·lula²²².

4.3 Fenoxodiol

El PDX 3-(4-hidroxifenil)-2H-1-benzopiran-7-ol és un anàleg sintètic de la genisteïna, una isoflavona vegetal. La genisteïna presenta activitats antitumorals com la inducció de l'apoptosi i l'autofàgia, i la inhibició de la proliferació i l'angiogènesi²²³. No obstant, degut a que té una taxa de metabolització elevada i la seva acció és relativament modesta, la genisteïna no s'ha considerat un possible agent quimioterapèutic. En aquest sentit el PDX presenta una millora respecte la genisteïna, ja que és entre 5 i 20 vegades més efectiu en inhibir la proliferació tumoral que el seu anàleg natural²²⁴. S'han atribuït múltiples efectes al PDX, tots relacionats amb l'activitat antitumoral. Inicialment es va descriure el PDX com un inhibidor de la topoisomerasa II, alterant la integritat del genoma durant la divisió cel·lular i provocant la mort cel·lular²²⁵. Més tard el PDX va mostrar una potent activitat antiangiogènesi, inhibint la proliferació de les cèl·lules endotel·lials, la migració dels capil·lars i l'expressió de la metaloproteïna MMP-2, el principal enzim encarregat de la degradació de la matriu extracel·lular²²⁶. També es va demostrar que el PDX restaura la sensibilitat en les cèl·lules de càncer epitelial d'ovari resistents a la quimioteràpia²²⁷, suggerint que el PDX pot actuar com a un quimiosensibilitzador, és a dir un fàrmac que fa que les cèl·lules tumorals siguin més sensibles a la quimioteràpia. Els mecanismes d'acció del PDX per inhibir la proliferació tumoral són la inducció de l'aturada del cicle cel·lular en G₁ per l'augment de l'expressió de p21²²⁸, l'activació de l'apoptosi tant dependent com independent de caspases per la inhibició de proteïnes antiapoptòtiques^{229,230} i la inhibició de l'enzim ENOX2 de la membrana cel·lular, una NADH oxidasa associada a la superfície de les cèl·lules tumorals. El resultat és un augment de NADH citosòlic que afecta l'activitat de Des1, tenint en compte la seva naturalesa d'enzim redox²³¹. El NADH acumulat, simultàniament, inhibeix la SK1 inclinant el balanç Cer/S1P cap a l'apoptosi^{231,232}.

En base als prometedors estudis realitzats *in vitro* i *in vivo*, en el 2004 la FDA va concedir l'aprovació del fàrmac, i el PDX es va començar a estudiar en assajos clínics amb humans. Els resultats positius obtinguts en la fase I van permetre que el PDX entrés en assajos clínics fase II/III, on principalment s'administrava el fàrmac a pacients amb càncer relacionats amb el sistema hormonal, com el d'ovari o pròstata²²⁴. Malauradament, tot i que els resultats preclínic eren prometedors, durant la fase III es va concloure que el PDX no mostrava evidències d'activitat clínica en pacients de càncer d'ovari resistents al platí (PROC)²³³ i es van aturar els estudis amb aquest fàrmac. En qualsevol cas, aquestes dades no impliquen que el PDX no pugui ser eficaç en altres tipus de càncer, tot i que els investigadors incideixen en la poca activitat del PDX quan s'administra per via oral en el tractament del càncer humà.

5 Liposomes

Els liposomes (del grec “lipos”, greix, i “soma”, cos) són petites vesícules esfèriques anàlogues a la membrana cel·lular eucariòtica. Els liposomes poden encapsular molècules en el seu interior i ser utilitzats com a mètode de subministrament de fàrmacs, funcionant com a transportadors entre l'exterior i l'interior de la cèl·lula. Aquestes estructures van ser descrites per primer cop per l'hematòleg Alec D. Bangham en 1964²³⁴. Per definició, els liposomes són vesícules concèntriques en que un espai aquós (regió hidrofílica) es troba completament embolcallat per una bicapa lipídica (regió hidrofòbica) (figura 21).

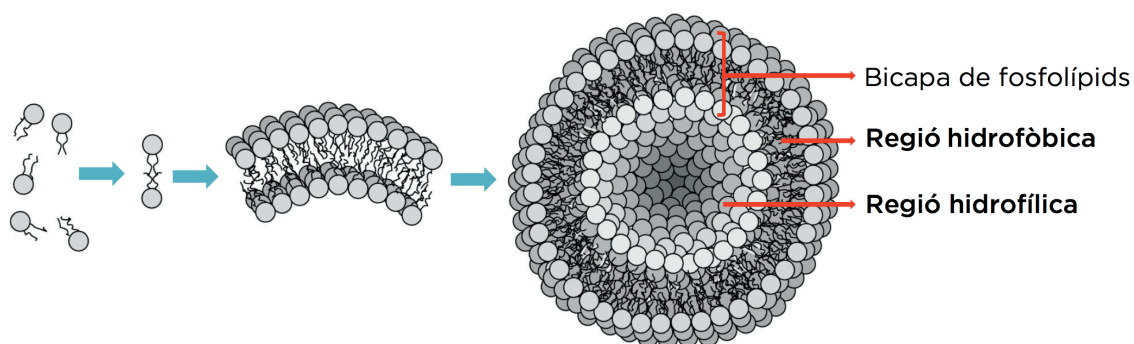


Figura 21: Els fosfolípids en presència d'aigua de manera espontània formen bicapes lipídiques i eventualment liposomes. Modificada de Balazs i Godbey, 2011²³⁵

Aquesta membrana generalment està formada per l'acoblament de fosfolípids, lípids amfipàtics que tenen un cap hidròfil i una cua hidròfoba formada per llargues cadenes hidrocarbonades. Quan els fosfolípids es troben dispersos en un medi aquós, espontàniament s'organitzen de tal manera que els caps s'orienten cap a l'exterior i les cues cap a l'interior, formant així el liposoma²³⁶.

Els liposomes es poden classificar en funció de la seva estructura, el mètode de preparació i la seva composició. Els paràmetres que defineixen l'estructura del liposoma són el nombre de bicapes lipídiques i la mida de la vesícula. En funció del nombre de bicapes els liposomes es classifiquen en vesícules unilaminars (ULV), vesícules multilaminars (MLV) i vesícules multivesiculars (MVV) (figura 22). Els ULV són els liposomes més comuns, amb una sola bicapa lipídica i un compartiment central hidrofílic. Els MLV es caracteritzen per posseir múltiples bicapes lipídiques concèntriques, separades entre si per capes aquoses. També existeixen les vesícules oligolaminars (OLV), que són liposomes amb més d'una bicapa però amb menys que el nombre designat per definir els MLV. Finalment els MVV són liposomes formats per un conjunt de vesícules internes no concèntriques²³⁷.

Els liposomes també poden ser classificats en funció de la seva mida. En el cas dels ULV existeixen tres subtipus: els liposomes més petits, amb una mida entre 20 i 200 nm, s'anomenen vesícules unilaminars petites (SUV). Si aquests són més grans de

200 nm estaríem parlant de vesícules unilaminars grans (LUV) mentre que els liposomes que sobrepassen 1 µm de grandària s'anomenen vesícules unilaminars gegants (GUV). Els MLV, OLV i MVV generalment tenen una mida intermèdia entre els LUV i els GUV.

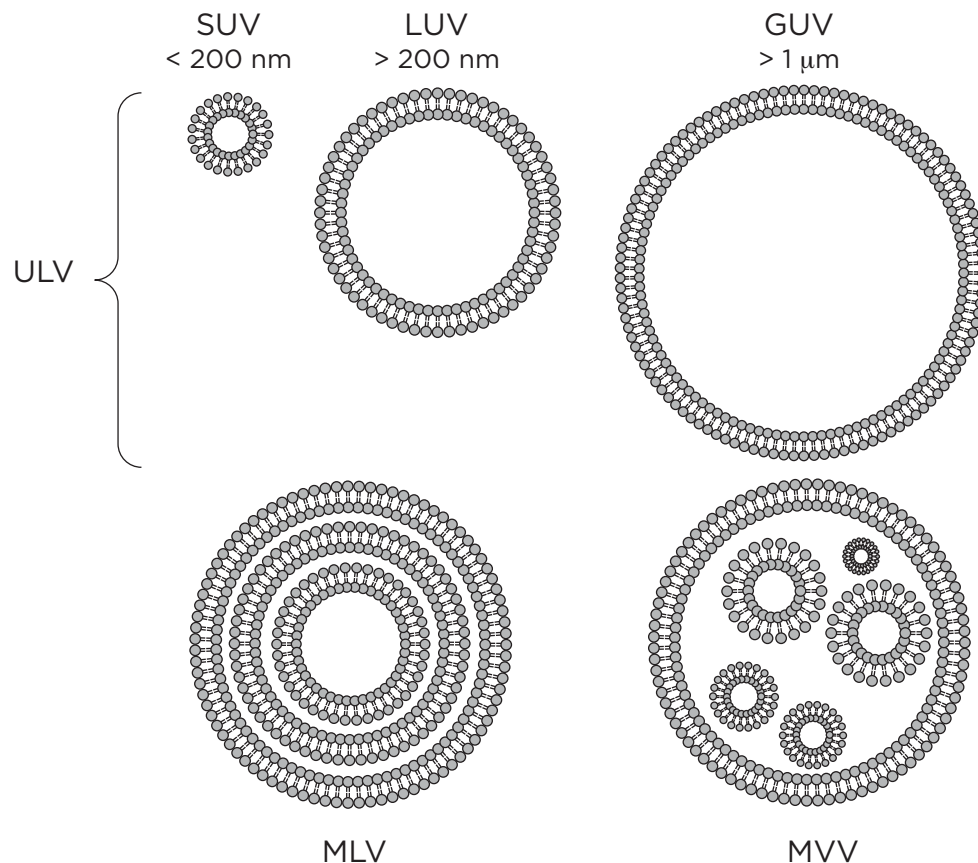


Figura 22: Classificació dels liposomes en funció de paràmetres estructurals. ULV, vesícules unilaminars; SUV, vesícules unilaminars petites; LUV, vesícules unilaminars grans; GUV, vesícules unilaminars gegants; MLV, vesícules multilaminars; MVV, vesícules multivesiculars

Un altre paràmetre que permet classificar els liposomes és el seu mètode de preparació. La correcta elecció de la metodologia dependrà de múltiples variables com la mida del liposoma, la naturalesa del medi on es troben les vesícules o les característiques fisicoquímiques del material a encapsular²³⁸. Cal destacar les tècniques d'evaporació per fase reversa, la congelació i descongelació, i la de deshidratació i hidratació; aquesta última és segurament una de les més utilitzades. Finalment també es poden distingir els liposomes en funció de la composició de la membrana i de les seves aplicacions. En destaquen els liposomes sensibles a pH, els immunoliposomes (liposomes amb anticossos en la seva superfície) o els liposomes catiónics.

Un dels aspectes més importants per la caracterització dels liposomes és la seva mida, un factor que determina el seu comportament físic i biològic²³⁹. La determinació de la mida dels liposomes es realitza normalment per DLS ("dynamic

light scattering” o dispersió dinàmica de la llum). Un altre aspecte clau en la caracterització dels liposomes és l'eficiència d'encapsulació (EE), és a dir el percentatge de producte encapsulat dins del liposoma. Aquest valor és dedueix quantificant el producte total i el producte que ha quedat fora del liposoma, per després poder aplicar la següent fórmula:

$$EE\% = \frac{\text{Producte total} - \text{producte lliure}}{\text{Producte total}} \times 100$$

5.1 Liposomes catiónics

Els liposomes catiónics són liposomes on part dels lípids presents en la bicapa lipídica són catiónics, és a dir, presenten una càrrega neta positiva, que es combinen amb altres lípids neutres per formar les vesícules. Els lípids utilitzats en els liposomes són estructures amb un cap hidrofílic i una cua hidrocarbonada hidrofòbica. Concretament els lípids catiónics acostumen a assolir la càrrega positiva a través d'una o més amines presents en el cap polar de l'estructura lipídica. Els més utilitzats són el clorur de *N*-[1-(2,3-dioleiloxi)propil]-*N,N,N*-trimetilamoni (DOTMA), [1,2-bis(oleoiloxi)-3-(trimetil-amoni)propà] (DOTAP) o dioctadecil-amido-glicil-espermina (DOGS)²³⁵. Variacions en l'estructura dels lípids, com la mida del cap polar, la longitud de la cua hidrocarbonada o el nombre d'insaturacions de l'alquí, aporten característiques úniques per les aplicacions del liposoma. Els liposomes catiónics es van presentar l'any 1987 per Felgner i col·laboradors²⁴⁰ amb l'objectiu de millorar la introducció de material genètic a la cèl·lula. La presència d'amines carregades positivament en els lípids del liposoma faciliten la unió amb anions com els que es troben en els fosfats del DNA. L'ús de liposomes per la transformació o transfecció de DNA en una cèl·lula s'anomena lipofecció.

La membrana plasmàtica és el major obstacle per al transport de material a l'interior de la cèl·lula. Una de les aproximacions per resoldre aquest problema és l'ús de liposomes catiónics. La càrrega positiva dels lípids del liposoma facilita la interacció espontània i electrostàtica amb components de la membrana plasmàtica carregats negativament, com glicoproteïnes, glicolípid o components de la matriu extracel·lular²⁴¹. Una vegada el liposoma es troba en la superfície cel·lular, es desencadena l'endocitosi amb la conseqüent invaginació de la membrana plasmàtica i la transferència del liposoma als compartiments endosomals (figura 23).

Es coneix que la membrana de l'endosoma està formada per fosfatidilcolines (PC), PE, SM i al voltant d'un 18% de lípids aniònics com la fosfatidilserina (PS)²⁴². Majoritàriament els lípids carregats negativament es troben en la cara exterior de l'endosoma, tot i que es poden trobar en una petita proporció en el lumen. Degut a la asimetria de la membrana plasmàtica els lípids aniònics es localitzen en la cara citosòlica, i és en el moment de la invaginació de la membrana en l'endocitosi que aquests queden situats en la cara externa de l'endosoma. Una vegada dins de

l'endosoma, a causa de la tendència que tenen les membranes amb càrrega positiva i negativa a adherir-se i fusionar-se, la membrana del liposoma es fusiona amb la membrana de l'endosoma. La mescla entre lípids catiónics del liposoma i aniònics de l'endosoma adopten l'estructura anomenada fase hexagonal H_{II} , o micel·les invertides²⁴³. Aquest fet comporta la desestabilització de la membrana de l'endosoma i l'alliberació del contingut del liposoma en el citosol.

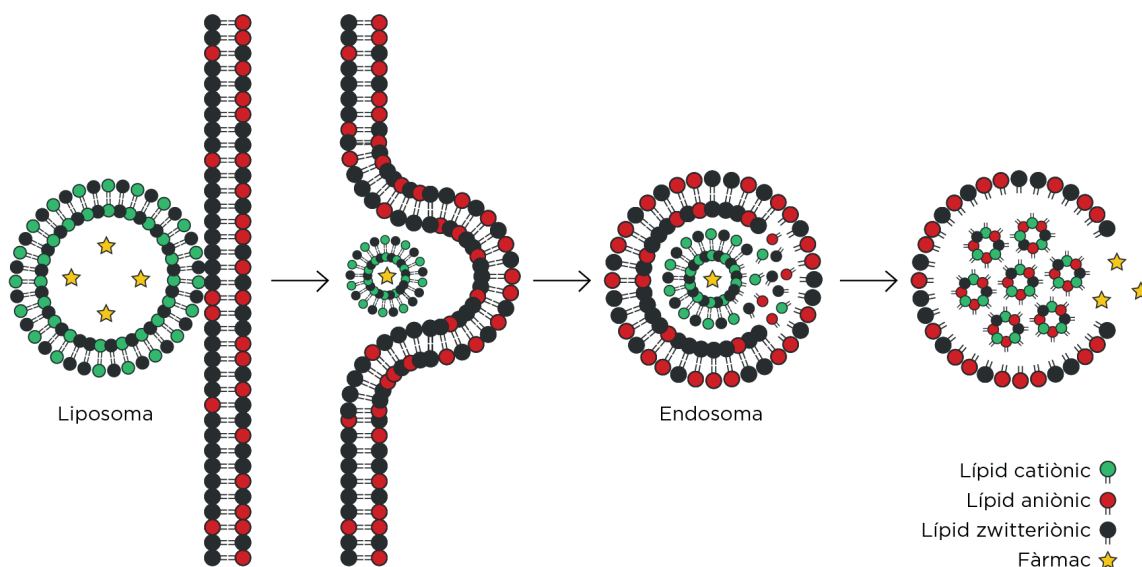


Figura 23 Model de l'alliberació intracel·lular del liposoma catiónic. El liposoma és atret per les càrregues negatives de la membrana plasmàtica i és endocitat. Dins de l'endosoma les membranes es fusionen i s'adopta l'estructura de fase hexagonal H_{II} , que acaba desestabilitzant l'endosoma i alliberant el contingut del liposoma en el citosol

5.2 Liposomes com a transportadors de fàrmacs

Els liposomes són utilitzats com a transportadors de fàrmacs degut a les seves propietats úniques. El liposoma és capaç de transportar tant molècules hidrofíliques en l'interior del seu espai aquós com molècules hidrofòbiques o amfifíliques que es poden intercalar en la bicapa lipídica. A més si en la superfície del liposoma s'addicionen lligands, com per exemple anticossos, les vesícules poden reconèixer receptors específics i per tant actuar de manera altament selectiva. Un altre avantatge, és que els liposomes ofereixen una protecció de la molècula encapsulada evitant així la seva degradació i a més incrementen la seva permeabilitat i solubilitat. Com que els liposomes presenten certa similitud amb les membranes cel·lulars, les vesícules són generalment endocitades per les cèl·lules i per tant permeten el transport de molècules al citosol. A més els liposomes són altament biocompatibles, ja que són biodegradables i no són tòxics, immunogènics o carcinògens²⁴⁴, de manera que ofereixen una àmplia gamma d'aplicacions biomèdiques. Actualment s'han aprovat diversos fàrmacs encapsulats en liposomes. Com és el cas del Doxil[®],

que en 1995 es va convertir en el primer fàrmac encapsulat en liposomes aprovat pel tractament del càncer²⁴⁵. Es tracten d'uns liposomes units a PEG que encapsulen la doxorubicina, fàrmac utilitzat contra el càncer d'ovari, de mama i el sarcoma de Kaposi. Els liposomes són una eina molt útil pel tractament de malalties com l'Alzheimer, ja que en encapsular certs fàrmacs en liposomes, s'aconsegueix travessar la barrera hematoencefàlica i dirigir una teràpia selectiva en les regions patològiques del cervell²⁴⁶. L'ús dels liposomes en l'àmbit de la cosmètica també aporta beneficis, ja que millora la permeabilitat de la pell i ajuda a la difusió dels components actius dels cosmètics²³⁸. En base als prometedors assajos clínics, el desenvolupament de nous liposomes és actualment un tema recurrent en la nanomedicina, generant liposomes que poden ser estimulats per certa temperatura, pH, activitats enzimàtiques, camps magnètics o llum. Aquests nous liposomes més intel·ligents exhibeixen un sistema d'administració de fàrmacs amb un gran potencial per la seva aplicació clínica²⁴⁷.

OBJECTIUS

Entre tots els esfingolípids, són la Cer/dhCer i S1P les molècules que tenen un paper més determinant en l'homeòstasi cel·lular. En l'anomenat "reòstat dels esfingolípids" aquestes espècies es troben en equilibri regulant vies de senyalització oposades que repercuteixen en el destí cel·lular, entre elles l'autofàgia. És per això que els enzims involucrats en la formació d'aquests esfingolípids són clau per la determinació del destí cel·lular cap a supervivència o mort. Entre aquests enzims destaquen **Des1**, en la generació de Cer; les **CDases** en la conversió de Cer a So; i finalment **S1PL**, encarregat de la degradació de S1P.

La majoria d'assajos descrits per la determinació de l'activitat CDasa i S1PL requereixen separació cromatogràfica i per tant impedeixen l'aplicació de procediments HTS. Tenint en compte aquesta mancança metodològica, els primers objectius d'aquesta tesi són:

- 1** Determinar l'habilitat de les ceramidases alcalines per hidrolitzar els substrats fluorogènics RBM14 per tal de mesurar la seva activitat en llisats cel·lulars
- 2** Millorar la permeabilitat cel·lular als substrats fluorogènics de l'esfingosina-1-fosfat liasa per poder analitzar la seva activitat en cèl·lules intactes

Múltiples estudis relacionen les dhCer amb la inducció d'autofàgia, però la seva implicació en la mort cel·lular o en la supervivència continua sent controvertit. En aquest context el darrer objectiu d'aquesta tesi és:

- 3** Validar el paper de les dihidroceramides com a mediadores en la inducció d'autofàgia i estudiar la seva implicació en el destí cel·lular

Els resultats del primer i segon objectiu es presenten i discuteixen en els capítols 1 i 2 respectivament. Mentre que els resultats del tercer objectiu es descriuen i es comenten en el capítol 3 inclòs en aquesta tesi.

RESULTATS

CAPÍTOL 1

Determinació de l'activitat
ceramidasa alcalina utilitzant
aminodiols fluorogènics cumarínics

ARTICLE

“Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic *N*-acylated coumarin-containing aminodiols”

RESULTATS ADDICIONALS

Estudi de la hidròlisi del substrat RBM14 per l'ACER3

ARTICLE 1

Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic *N*-acylated coumarin-containing aminodiols

Mireia Casasampere¹, Luz Camacho¹, Francesca Cingolani¹, Josefina Casas¹, Meritxell Egido-Gabás¹, José Luís Abad¹, Carmen Bedia¹, Ruijuan Xu², Kai Wang², Daniel Canals², Yusuf A. Hannun², Cungui Mao² i Gemma Fabrias¹.

¹Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), 08034 Barcelona, Spain

²Department of Medicine, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY 11794-8155, USA

Journal of Lipid Research. **2015**; 56: 2019-28

Factor d'impacte: 4.56

La contribució de Mireia Casasampere a aquest treball presentat com a capítol 1 d'aquesta tesi, correspon al disseny d'experiments, i obtenció i elaboració de les dades presentades en les figures 4, 5 i 6. També ha contribuït a l'escriptura del primer esborrany. Els resultats mostrats en les figures 2 i 3, i la taula 1 varen formar part de la tesi doctoral de Francesca Cingolani, presentada el 2015 dins del programa de Doctorat de Biomedicina de la Universitat de Barcelona.

Josefina Casas Brugulat
Directora de tesi

RESUM

Activitat de les ceramidases neutra i alcalines sobre aminodiols fluorogènics N-acilats que contenen cumarina

Objectiu: En articles previs, s'havia descrit per part del nostre grup la síntesi i aplicació dels compostos RBM14 per determinar l'activitat de l'AC. Els compostos RBM14 són anàlegs cumarínics de Cer amb diferents longituds de la cadena alifàtica. L'objectiu d'aquest treball s'ha centrat en la determinació de l'habilitat de les altres CDases, la NC i les ACERs, per hidrolitzar aquests substrats.

Metodologia: L'activitat CDasa es va determinar mesurant la fluorescència alliberada pels substrats RBM14 quan són hidrolitzats. L'assaig es va realitzar en plaques de 96 pous utilitzant el tampó apropiat per cada CDasa en funció del seu pH òptim d'activitat. La font enzimàtica per estudiar la NC va consistir en enzim recombinant bacterià i humà. D'altra banda, en el cas de les ACERs, es va treballar en microsomes de llisats cel·lulars on les diferents ACERs estaven sobreexpressades o silenciades. Per comprovar aquests fenotips es van realitzar anàlisis de mRNA per qPCR, determinació de proteïna per Western Blot i anàlisi del esfingolipidoma per UPLC/MS.

Resultats: En la NC humana recombinant, l'afinitat del substrat augmentava directament amb l'increment de la longitud de la cadena alifàtica, sent el RBM14C16 el millor substrat. Tots els substrats RBM14, sobretot el RBM14C14 i el RBM14C16, van ser hidrolitzats a pH bàsic tant en llisats com en cèl·lules intactes de fibroblasts d'embrions de ratolí que no expressen la NC. Això suggereix que com a mínim una de les tres ACERs és capaç d'hidrolitzar els substrats RBM14. Es van detectar nivells més baixos de fluorescència amb els substrats RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16 respecte el control en microsomes de cèl·lules HCT116 on l'ACER3 estava silenciada de manera estable. No obstant, els microsomes de les dues línies cel·lulars HeLa ACER1-TET-ON i ACER2-TET-ON en presència de tetraciclina no van mostrar activitat en hidrolitzar cap dels substrats RBM14.

Conclusions: A part de l'AC, els compostos RBM14 són hidrolitzats per la NC i per l'ACER3, però no són substrats adequats per les ACER1 i ACER2.

Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic *N*-acylated coumarin-containing aminodiols

Mireia Casasampere,* Luz Camacho,* Francesca Cingolani,* Josefina Casas,* Meritxell Egido-Gabás,* José Luís Abad,* Carmen Bedia,* Ruijuan Xu,[†] Kai Wang,[†] Daniel Canals,[†] Yusuf A. Hannun,[†] Cungui Mao,[†] and Gemma Fabrias^{1,*}

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC),* Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), 08034 Barcelona, Spain; and Department of Medicine,[†] State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY 11794-8155

Abstract Ceramidases catalyze the cleavage of ceramides into sphingosine and fatty acids. Previously, we reported on the use of the RBM14 fluorogenic ceramide analogs to determine acidic ceramidase activity. In this work, we investigated the activity of other amidohydrolases on RBM14 compounds. Both bacterial and human purified neutral ceramidases (NCs), as well as ectopically expressed mouse neutral ceramidase hydrolyzed RBM14 with different selectivity, depending on the *N*-acyl chain length. On the other hand, microsomes from alkaline ceramidase (ACER)3 knock-down cells were less competent at hydrolyzing RBM14C12, RBM12C14, and RBM14C16 than controls, while microsomes from ACER2 and ACER3 overexpressing cells showed no activity toward the RBM14 substrates. Conversely, *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA) overexpressing cells hydrolyzed RBM14C14 and RBM14C16 at acidic pH. Overall, NC, ACER3, and, to a lesser extent, NAAA hydrolyze fluorogenic RBM14 compounds. Although the selectivity of the substrates toward ceramidases can be modulated by the length of the *N*-acyl chain, none of them was specific for a particular enzyme. **■** Despite the lack of specificity, these substrates should prove useful in library screening programs aimed at identifying potent and selective inhibitors for NC and ACER3.—Casasampere, M., L. Camacho, F. Cingolani, J. Casas, M. Egido-Gabás, J. L. Abad, C. Bedia, R. Xu, K. Wang, D. Canals, Y. A. Hannun, C. Mao, and G. Fabrias. **Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic *N*-acylated coumarin-containing aminodiols.** *J. Lipid Res.* 2015. 56: 2019–2028.

Supplementary key words ceramides • lipids • mass spectrometry • sphingolipids • enzymology • umbelliferone • high throughput screening.

This work was supported, in whole or in part, by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Grants SAF2011-22444 and CTQ2014-54743-R to G.F.), the Fundació la Marató de TV3 (Grants 112130 to J.C. and 112132), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca of Generalitat de Catalunya (Grant 2009SGR1072 to G.F.), National Cancer Institute (Grant NCI P01 97132 to Y.A.H.), and National Institutes of Health (Grant R01CA163825 to C.M.). L.C. and F.C. were supported by predoctoral fellowships and C.B. was supported by postdoctoral contracts awarded by the Generalitat de Catalunya.

Manuscript received 22 June 2015 and in revised form 12 August 2015.

Published, JLR Papers in Press, August 18, 2015

DOI 10.1194/jlr.D061564

Copyright © 2015 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

This article is available online at <http://www.jlr.org>

Sphingolipids are bioactive molecules exerting a plethora of activities at the cellular level by activating different cell signal transduction pathways. Among these activities, ceramide and sphingosine are inducers of different types of cell death, while sphingosine 1-phosphate activates proliferative signals and counteracts the cytotoxicity of ceramides and sphingosine. Ceramidases are ubiquitous amidohydrolases that catalyze the cleavage of ceramides into sphingosine and fatty acids. Because sphingosine is the precursor of sphingosine 1-phosphate, ceramidases contribute to the balance between cytotoxic and proliferative signals. According to their optimum pH, ceramidases fall into three groups, acidic, neutral, and alkaline (1). Five human ceramidases that are encoded by five distinct genes have been cloned: an acidic ceramidase (AC), a neutral ceramidase (NC), and three alkaline ceramidases (ACERs). AC is a lysosomal enzyme encoded by the acid ceramidase gene, *ASAH1*, while NC, encoded by the neutral ceramidase gene, *ASAH2*, is found in the plasma membrane. While AC is ubiquitously expressed, NC is highly expressed in the small intestine along the brush border, where it is involved in the catabolism of dietary sphingolipids, thus regulating the levels of bioactive sphingolipid metabolites in the intestinal tract (2).

Abbreviations: AC, acidic ceramidase; ACER, alkaline ceramidase; ACER1-TET-ON, HeLa T-REX cells stably transfected with ACER1; ACER2-TET-ON, HeLa T-REX cells stably transfected with alkaline ceramidase 2; *ASAH1*, acid ceramidase gene; *ASAH2*, neutral ceramidase gene; CerC12NBD, *N*-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]dodecanoyl]-D-erythro-sphingosine; FD-pcDNA5/TO-*ASAH2*, Farber cells transfected with the pcDNA5/TO plasmid containing mouse *ASAH2*; FRET, fluorescence resonance energy transfer; hACER, human alkaline ceramidase; HCT116-shACER3, HCT116 cells transfected with shRNA against human alkaline ceramidase 3; HCT116-shRNA, HCT116 cells transfected with nonspecific shRNA; hNC, human neutral ceramidase; HTS, high-throughput screening; mACER, mouse alkaline ceramidase; MEF, mouse embryonic fibroblast; mNC, mouse neutral ceramidase; NAAA, *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase; NBD, 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl; NC, neutral ceramidase; pCDase, *Pseudomonas aeruginosa* neutral ceramidase; shACER3, ACER3-specific shRNA; shCtrl, control shRNA; TBST, TBS-Tween.

¹To whom correspondence should be addressed.

e-mail: gemma.fabrias@iqac.csic.es

The three ACERs include Asah3/Acer1, Asah3L/Acer2, and Acer3. Acer1 is encoded by the *ASAH3/ACER1* gene and is exclusively expressed in the endoplasmic reticulum of skin cells. Acer2, encoded by the *ASAH3L/ACER2* gene, is a Golgi resident enzyme particularly abundant in placenta. Finally, Acer3 is encoded by the *PHCA/ACER3* gene and is localized to both the endoplasmic reticulum and the Golgi. An interesting feature of the three ACERs is their activation by Ca^{2+} ions.

Different substrate selectivities have been reported for the several ceramidases. Thus, AC prefers C12 and C14 ceramides, while preferential hydrolysis of C16 and C18 ceramides occurs with NC. As for ACERs, ACER1 hydrolyzes mainly very long chain (C20 to C24) ceramides (1), while ACER2 seems to be responsible for the deamidation of ceramides with various acyl-chains (2), and dihydroceramides with unsaturated long acyl chains ($\text{C}_{18:1}$ and $\text{C}_{20:1}$) (3). Finally, ACER3 hydrolyzes ceramides, dihydroceramides, and phytoceramides with unsaturated long acyl chains ($\text{C}_{18:1}$ and $\text{C}_{20:1}$) (4).

Validation of ceramidases as therapeutic targets has been carried out mainly for AC (5, 6) and NC (7, 8). This has triggered the development of ceramidase inhibitors as leads for the further development of potential drugs. Most ceramidase inhibitors have been discovered after either rational design or screening of a small series of compounds. Although a number of procedures for the determination of ceramidase activities have been reported (9), massive screening relies on the availability of high-throughput methods, only a few of which have been described (10–12). These include a fluorescent sphingolipid fluorescence resonance energy transfer (FRET) probe that allows homogeneous ratiometric determination of enzyme activity in real-time (12). In a previous article (10), we reported on the use of a coumarinic analog of ceramide, namely RBM14C16 (Fig. 1), to determine AC activity. Other analogs of RBM14C16 with different *N*-acyl chain lengths were later reported as AC substrates and for use in diagnosis of Farber disease (11). Among the several analogs, RBM14C12 was the preferred substrate for AC. Lysates from Farber cells overexpressing AC (13) hydrolyzed RBM14C12 with apparent K_m and V_{max} values of 26 μM and 334 pmol/min/mg protein.

Besides ceramidases, other amidohydrolases include those involved in the hydrolysis of bioactive *N*-acylethanolamines to fatty acids and ethanolamine. These amidohydrolases include *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA), which it is only active at acidic pH (14). Comparison of the primary structures of NAAA and AC revealed a high sequence homology. They also share functional features, and they belong to the choloylglycine hydrolase family (15).

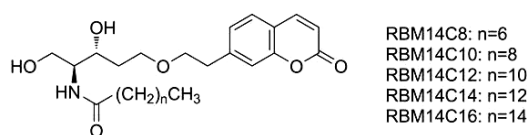


Fig. 1. Chemical structures of RBM14 compounds.

In this work, we show that RBM14 compounds are hydrolyzed by NC, ACER3, and NAAA, but not by ACER1 and ACER2. Each amidohydrolase exhibits different substrate selectivity depending on the nature of the *N*-acyl chain. The results presented underscore the usefulness of these compounds in massive screening programs aimed at identifying amidohydrolase inhibitors.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials

Dulbecco's modified Eagle's medium, FBS, penicillin/streptomycin solution, nonessential amino acids, tetracycline, and puromycin, were from Sigma. Zeocin was from Genaxxon Bioscience and blasticidin was from CalBiochem. Opti-MEM and lipofectamine 2000 were from Invitrogen. Antibodies were purchased from: anti-ACER2 (HPA014092) and anti-actin (A2228) (Sigma); anti-rabbit (NA934V) and anti-mouse (RPN4201V) secondary antibodies (GE Healthcare). Recombinant human NC (hNC) was obtained from R&D Systems. Bacterial CDase was obtained following the reported procedure (16). The latter protein was obtained at a 0.33 mg/ml final concentration and it was stored at -80°C . Once thawed, the enzyme solution was kept at 4°C until activity loss. pcDNA3.1(+) (empty vector) and pcDNA3.1(+) harboring the human NAAA gene were kindly provided by Professor Natsuo Ueda.

Cells

Cells were cultured at $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ in Dulbecco's modified Eagle's medium high glucose supplemented with 10% FBS and 1% penicillin/streptomycin solution. Nonessential amino acids (0.1 mM) were also added to HEK293T cells. Zeocin (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and blasticidin (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) were also added to HeLa T-REX cells [HeLa T-REX-human ACER (hACER)2, HeLa T-REX-mouse ACER (mACER)1, and control vector HeLa T-Rex pcDNA4]. mACER1 and hACER2 gene expression were induced by adding 10 ng/ml tetracycline to the medium. Puromycin (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to ACER3 knockdown HCT116 cells (HCT116-shACER3) and their controls (HCT116-shRNA). Antibiotics other than penicillin/streptomycin were removed during treatments.

Overexpression of hACER2 and mACER1

To overexpress ACER2, we used the stable cell line HeLa T-Rex/ACER2 that we constructed in our previous study (17). To overexpress ACER1, we applied the same expression system. The coding sequence of the mACER1 was cloned into the empty vector, pcDNA4, to construct the expression vector, pcDNA4-ACER1, which was used to generate the stable cell line, HeLa-T-Rex/ACER1, as described in our previous study (17).

Knockdown of ACER3 in HCT116 cells

A lentiviral vector expressing a control shRNA (shCtrl) (CCGGCAACAAGATGAAGAGCACCAACTCGAGTTGGTGCTCTTC-ATCTTGTGTTTTT) or ACER3-specific shRNA (shACER3) (CCGGTATACAGCTGTTGCATATTTGCTCGAGCAAATATGCAACAGCTGTATATTTTTG) from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) was packaged into lentiviral particles in HEK293T cells using a viral packaging kit (GeneCopocia, Rockville, MD) and lentiviruses expressing shCtrl or shACER3 were then transduced into HCT116 cells according to the manufacturer's protocol. Forty-eight hours later, the transduced cells were replated and treated with 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin (Sigma-Aldrich) for 2 weeks. Puromycin-resistant

clones were expanded before their ACER3 mRNA levels and ACER activity were determined, as described below.

Overexpression of mouse NC. Twenty-four hours before transfection, Farber cells were plated in 6-well plates (2.5×10^5 cells per well). Then cells were transfected with 2.5 μg /well of pcDNA5/TO (empty vector) or pcDNA5/TO harboring the mouse *ASAH2* gene (pcDNA5/TO-*ASAH2*) using opti-MEM/lipofectamine, following the manufacturer's instructions. Test compounds were added 24 h after transfection.

Overexpression of NAAA. Twenty-four hours before transfection, HEK293T cells were plated in 100 mm Petri dishes (3×10^6 cells per dish) and were transfected with 8 μg /well of pcDNA3.1(+) (empty vector) or pcDNA3.1(+) harboring the human *NAAA* gene (pcDNA3.1-*NAAA*) using opti-MEM/lipofectamine following the manufacturer's instructions. Test compounds were added 48 h after transfection.

Cell lysates

Cell pellets were resuspended in the appropriate volume of a 0.25 M saccharose solution. The suspension was submitted to three cycles of 5 s sonication (probe) at 10 watts/5 s resting on ice. The cell lysate was centrifuged at 600 *g* for 10 min. The supernatant was collected and protein concentration was determined as specified below.

Microsomal preparations

The above 600 *g* centrifugation supernatants were transferred to 1.5 ml ultracentrifuge tubes and were spun at 100,000 *g* for 45 min to 1 h at 4°C. Pellets were either stored at -80°C or protein concentration was measured, adjusted with a 0.25 M saccharose solution to the appropriate concentration, and used for activity determination or processed for quantitative (q)PCR or Western blot.

Ceramidase activities

All in vitro assays were conducted in 96-well plates at a final volume of 100 μl /well. Reaction buffers were: *Pseudomonas aeruginosa* neutral ceramidase (pCDase) [50 mM HEPES buffer, 1 mM CaCl_2 (pH 7.4) in the presence or absence of 0.3% (w/v) Triton X-100]; NC [50 mM HEPES, 150 mM NaCl, 1% sodium cholate (pH 7.4)]; ACER [50 mM HEPES, 1 mM CaCl_2 (pH 9.0)]. Final amounts of protein per well are indicated in the figure legends. For the determination of K_m and V_{\max} (pCDase and hNC), serial dilutions of substrates in the appropriate reaction buffer were made from 80 μM (pCDase) or 200 μM (hNC) solutions prepared from a 4 mM stock solution in ethanol. Cell lysates: substrates were tested at 40 μM concentration by adding the appropriate volume of 0.1 mM solutions in the suitable buffer, prepared from 4 mM stock solutions in ethanol. The reaction mixtures contained: pCDase (10 μl /well of protein, 40 μl /well of substrate at the required concentrations, and 50 μl /well of buffer); hNC (20 μl /well of protein, 40 μl /well of substrate at the required concentrations, and 40 μl /well of buffer); *ASAH2*^(-/-) mouse embryonic fibroblasts (MEFs) and ACERs (25 μl /well of protein and 75 μl /well of 53 μM substrate). The reaction mixture was incubated at 37°C for 3 h, except for the determination of K_m and V_{\max} (30 min). In all cases, reactions were stopped with 25 μl /well of methanol and then 100 μl /well of NaIO_4 [2.5 mg/ml in 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.6)] was added. After incubation at 37°C for 1 h in the dark, 100 μl /well of 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.6) was added and fluorescence was measured spectrophotometrically at excitation and emission

wavelengths of 355 and 460 nm, respectively. The same reaction mixtures without enzymes were used as blanks.

To determine ceramidase activity in intact cells, the day before the assay, 2×10^4 cells per well were seeded in a 96-well plate. Cells were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO_2 . Medium was replaced by 100 μl of fresh medium to which the required volume of a 4 mM stock solution of the RBM14 substrate in ethanol had been added to obtain a 40 μM final concentration (1% final concentration of ethanol). The plate was incubated for 3 h at 37°C, 25 μl /well of methanol were added and the assay was continued as described above for cell lysates.

NAAA activity

The reaction mixtures contained 25 μl /well of protein (1 mg/ml, 25 μg /well), 40 μl /well of 0.1 mM substrate solution (40 μM final concentration) in reaction buffer [100 mM acetic/acetate buffer (pH 4.5)], and 35 μl /well of reaction buffer. The reaction mixture was incubated at 37°C for 3 h, stopped with 25 μl /well of methanol, and the assay was continued as described in the above section.

Protein concentration determination

Protein concentrations were determined with BSA as a standard using a BCA protein determination kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Western blot analysis

Thirty micrograms of microsomal protein were combined with Laemmli sample buffer and heated at 55°C for 30 min. Samples were loaded onto a 12% polyacrylamide gel, separated by electrophoresis at 140 V/1 h, and transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane (100 V/1 h). Unspecific binding sites were then blocked with 5% milk in TBS-Tween (TBST) (ACER2) or 3% BSA in TBST (actin). Anti-ACER2 antibody was diluted 1:1,000 in 5% milk in TBST. Anti-actin antibody was diluted 1:2,000 in 3% BSA in TBST. Membranes were incubated overnight at 4°C under gentle agitation. After washing with TBST, membranes were probed with the correspondent secondary antibody for 1 h at room temperature (ACER2, anti-rabbit diluted 1:1,000 in 3% BSA in TBST; actin, anti-mouse diluted 1:10,000 in 5% milk in TBST). Antibody excess was eliminated by washing with TBST and protein detection was carried out using ECL and membrane scanning with LI-COR C-DiGit® blot scanner. Band intensities were quantified by LI-COR Image Studio Lite software.

qRT-PCR analysis

Total RNA was isolated from cells using RNeasy® Mini kit from QIAGEN protocol. RNA concentration was measured by spectrophotometric absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-8000 spectrophotometer. RNA was treated with DNase I to remove genomic DNA contamination. Quantities from 1 μg to 100 ng of DNase I-treated RNA were retrotranscribed to cDNA using Superscript® II reverse transcriptase from Invitrogen and stored at -20°C. cDNA preparations were used to quantify specific transcripts in a LightCycler® 480 real-time PCR system, using SYBR® Green mix (Roche, Germany) and the following pairs of primers: mACER1 (forward, 5'-CAGGAGTACAGGAAGACCAGC-3'; reverse, 5'-CCTTGTTCATCACCCGGATT-3'); hACER2 (forward, 5'-CTTTCGGGAATGACCCGGGTA-3'; reverse, 5'-GCATACACAGC-CCAGGTAGG-3'); hACER3 (forward, 5'-TGACCTGATGGAATA-TCGGCTC-3'; reverse, 5'-CGCCGAGTTCTGGAATACAGT-3'); and GAPDH (forward, 5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3'; reverse, 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'). For all ACER, the initial PCR steps were: 10 min at 95°C, followed by 45 cycles of a 10 s melting at 95°C, and a 30 s annealing/extension at 60°C.

The final step was a 1 min incubation at 60°C. All reactions were performed in triplicate. Relative mRNA abundances of the different genes were calculated from the second derivative maximum of their respective amplification curves (Cp, calculated by duplicates). Cp values for target genes (Tg) were compared with the corresponding values for the GAPDH reference gene to obtain the ΔC_p values ($\Delta C_p = C_p\text{GAPDH} - C_p\text{Tg}$).

RT-PCR analysis

Total RNA isolation, reverse transcription, and cDNA PCR amplification were performed as indicated in the previous section. Primers were: mACER1, 5'-TTGCAGCTTCTGGCAGCGGA-3' (forward) and ACTTTGCATCCACCAGGGCCA-3' (reverse); mACER2, 5'-GCTGGATCAGCGACCAAGCCT-3' (forward) and AGGCGAAGCACACAGCCC-3' (reverse); mACER3, 5'-ACTG-GAGAAGCGGTACATTGCTG-3' (forward) and 5'-GGGAGC-TCATCCAACAGCTGCATT-3' (reverse); and microglobulin, 5'-GCTATCCAGAAAACCCCTCAA-3' (forward) and 5'-CATGTC-TCCGATCCCAGTAGACGGT-3' (reverse). Conditions for the three ACERs were: one cycle of 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 57°C for 30 s, 2°C for 20 s, and 1 cycle of 72°C for 5 min. Conditions for β -2-microglobulin were: one cycle of 94°C for 2 min, 30 cycles of 94°C for 30 s, 62°C for 30 s, 72°C for 20 s, and 1 cycle of 72°C for 5 min. The PCR products were separated by 1% (w/v) agarose gel electrophoresis. The separated DNA fragments were visualized by ethidium bromide staining and photographed under UV light.

LC/MS

Lipid extracts and LC/MS analysis were carried out as previously described (18, 19).

Statistics

Comparison between two means has been carried out with the unpaired two-tailed *t*-test and statistical differences are marked with asterisks. For comparison of more than two means, data have been analyzed by one-way ANOVA test followed by Bonferroni's multiple comparison test. Statistical differences between means are pointed out with different letters atop each bar (same letter indicates no statistical difference).

The quality of the assays for NC and ACER3 has been assessed by calculating the Z factor, which is a valuable tool to evaluate the robustness and suitability of high-throughput screening (HTS) assays (20). This parameter is calculated using the equation: $Z = 1 - [3 \text{ SD of sample} + 3 \text{ SD of background}] / (\text{mean of sample} - \text{mean of background})$. The SD values represent the standard deviation values (of sample and background). The Z factors were calculated using 5 ng of protein (buffer in background) and 20 μM substrate (RBM14C16) for hNC and 25 μg of protein (buffer in background) and 20 μM substrate (RBM14C14) for ACER3. For both enzymes, data were obtained from 15 replicates for both sample and background.

RESULTS

Neutral ceramidases hydrolyze RBM14

Because different NCs have been reported, we tested and compared the activity of bacterial NC, mNC, and hNC on RBM14 compounds. The bacterial ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa* was purified as previously reported (16). Prior to screening the enzyme activity on the fluorogenic

substrates, the assay was optimized with this enzyme. Because an aldehyde is produced in the oxidation step of the development phase of the procedure (1), the presence of primary amines in the solution must be avoided. Therefore, Tris was substituted with HEPES, which was also compatible with the presence of Ca^{2+} in the solution, and so it could be used for ACER. Although Triton X-100 has been previously used in ceramidase activity measurements, we found that it decreased the fluorescence signal (Fig. 2A). Therefore, it was omitted in the assays. The higher hydrophilicity of the RBM14 compounds, as compared with other substrates used [i.e., 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl (NBD)-labeled ceramides], allows avoiding the use of Triton X-100 in activity determinations. As concluded from the kinetic parameters, the best substrates for pCDase were RBM14C14 \approx RBM14C12 > RBM14C10 \gg RBM14C8 (Fig. 2B; Table 1).

Determination of enzyme activity in vitro was also carried out with human recombinant enzyme (hNC). As shown in Fig. 2C and Table 1, as in the case of pCDase, the substrate affinity for hNC increased directly with increasing the *N*-acyl chain length, as concluded from the decrease of the K_m values. Kinetic parameters show that substrate preference is RBM14C16 \approx RBM14C14 \gg RBM14C12 \gg RBM14C10 $>$ RBM14C8.

The hydrolysis of RBM14 compounds by NC was also determined in intact cells. Farber cells, which do not hydrolyze RBM14, were transfected with mNC [Farber cells transfected with the pcDNA5/TO plasmid containing mouse *ASAH2* (FD-pcDNA5/TO-*ASAH2*)]. In these experiments, in which all substrates were tested simultaneously at the same concentration (40 μM), NC showed a slight preference for the *N*-C10 analog (Fig. 2D). This was also the case in cell lysates (Fig. 2E). Interestingly, the *N*-C8 analog was also hydrolyzed by mNC, in contrast to AC, which does not accept this compound as substrate (11), and the hNC and bacterial NC, for which the C8 and the C10 derivatives are poor substrates.

To confirm the robustness of the assay, we calculated the Z factor, a statistical parameter used to evaluate the suitability of a HTS assay based on the range of the signal and the internal variation of the measurements. A score of $1 > Z \geq 0.5$ indicates a good assay, and a score of $Z = 1$ indicates a perfect assay. Our calculated Z factor for the NC assay using the pure human protein was 0.69 ± 0.17 using the best substrate, RBM14C16. This result demonstrated that the assay is suitable for HTS applications.

Hydrolysis of RBM14 by ACERs

As mentioned in the introduction, three different ACERs have been reported, all of them exhibiting an optimum activity at pH around 9.0. Because NC exhibits residual ceramidase activity at basic pH, the effectiveness of ACERs to hydrolyze RBM14 was first explored using MEFs defective in the *ASAH2* gene (*ASAH2*^{-/-} MEFs). As expected, lysates from these cells were significantly less competent at hydrolyzing RBM14C12 than wild types at neutral pH values (Fig. 3A). As shown in Fig. 3B, all the analogs except for RBM14C8 were hydrolyzed in intact cells, with

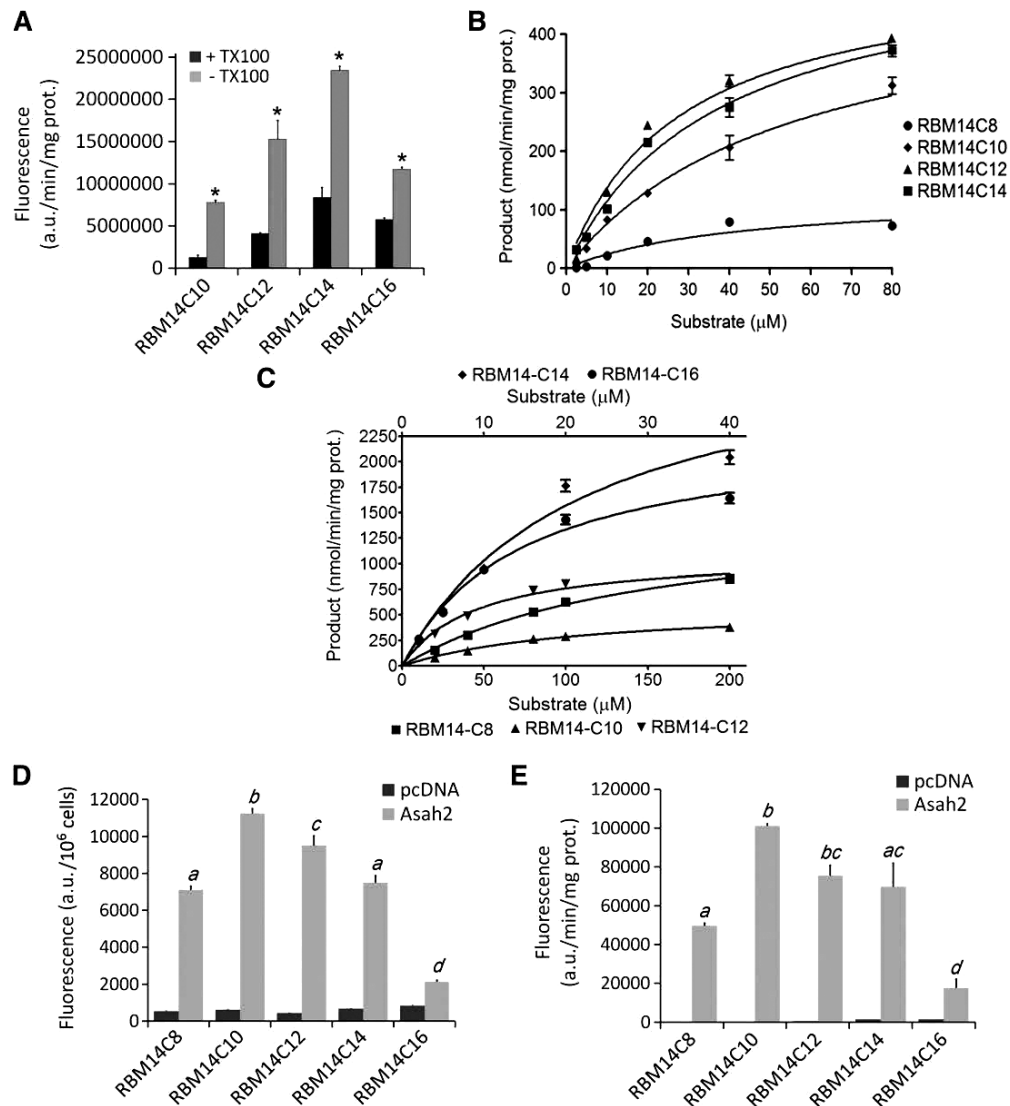


Fig. 2. Hydrolysis of RBM14 by NC. Experiments were carried out as detailed in the Experimental Procedures using pure pCDase (A), pure hNC (E), or Farber cells transfected with empty pcDNA5/TO or pcDNA5/TO-mASAH2 either intact (C) or lysed (D). In (A) and (B), the experiments were performed in 50 mM HEPES with 1 mM CaCl₂, pH = 7.4. In (A), incubations were performed in the presence or absence of Triton X-100 (TX100) and substrates were tested at 40 μM concentration with 10 ng protein. In (B), experiments were conducted in the absence of Triton X-100 with 50 ng protein. In (C), the substrates were tested in intact cells (2×10^4 cells/well) with 40 μM substrates. In (D), substrates (40 μM) were tested with cell lysates containing 14 μg of protein in 50 mM HEPES with 150 mM NaCl and 1% sodium cholate (pH 7.4). In (E), compounds were used at the specified concentrations using 5 ng of hNC and the same buffer as in (D). Data are mean \pm SD of three to five independent experiments with triplicates. In (A), asterisks indicate significant difference between samples with and without Triton X-100 ($P < 0.001$, unpaired two-tailed *t*-test). In (C) and (D), data were analyzed by one-way ANOVA test [$P < 0.0001$ (C); $P < 0.0005$ (D)] followed by Bonferroni's multiple comparison test. Different letters denote a statistically significant difference between groups ($P < 0.05$).

RBM14C14 producing the highest fluorescence values. Hydrolysis of RBM14 was also analyzed in *ASAH2*^(-/-) MEF lysates at different pH. As shown in Fig. 3C, the highest activity occurred at basic pH, at which RBM14C14 gave the highest hydrolysis rates. The activity observed at neutral pH is likely to correspond to residual activity of ACERs. These results suggested that RBM14s, mainly the C16 analog, were hydrolyzed by at least one of the three ACERs.

We then determined the levels of mRNA for the different ACERs in *ASAH2*^(-/-) MEFs. As shown in Fig. 3D, these cells have high levels of ACER3 transcript. In contrast, levels of ACER2 mRNA are very low and ACER1 mRNA is undetectable. These results are in agreement with reported data (<http://biogps.org>) and suggest that ACER3 is the ACER involved in the hydrolysis of RBM14 at basic pH in *ASAH2*^(-/-) MEFs.

TABLE 1. K_m and V_{max} of RBM14 hydrolysis by NC

	pCDase			hNC		
	K_m	V_{max}	K_m/V_{max}	K_m	V_{max}	K_m/V_{max}
RBM14C8	46 ± 18.1	101 ± 20.4	0.45	262 ± 32.1	2,201 ± 321	0.119
RBM14C10	33 ± 4.2	408 ± 22.6	0.080	181 ± 21.2	807 ± 82	0.225
RBM14C12	15 ± 3.0	470 ± 35.9	0.032	55 ± 4.8	1,186 ± 122	0.047
RBM14C14	22 ± 2.9	469 ± 24.5	0.048	39 ± 4.9	4,716 ± 453	0.0083
RBM14C16	n.d.	n.d.	—	16 ± 3.3	2,372 ± 298	0.0069
C16Cer	139 (23)	5300 (23)	0.026	—	—	—
CerC12NBD	—	—	—	33 (29)	826 (29)	0.040

K_m is given in micromoles and V_{max} as nanomoles per minute per milligram protein. Data are mean ± SD of three to five independent experiments with triplicates. Protein amounts were: pCDase, 50 ng; hNC, 5 ng. Experiments were carried out as detailed in the Experimental Procedures. In the case of pCDase, the assays were performed in the absence of Triton X-100. C16Cer, *N*-palmitoylsphingosine. n.d., not determined.

To confirm hydrolysis of RBM14 by ACER3, microsomal preparations from ACER3 knockdown of HCT116 (HCT116-shACER3) cells and the corresponding mock cells (HCT116-shRNA) were incubated with the fluorogenic probes for 3 h in HEPES buffer with 1 mM Ca^{2+} at pH 9.0. As shown in Fig. 4A, significantly lower fluorescence levels were released from RBM14C12, RBM14C14, and RBM14C16 by ACER3 knockdown than by wild-type cells, indicating that ACER3 hydrolyzes these three fluorogenic RBM14 derivatives. As expected, ACER3 mRNA levels were about four times lower in ACER3 knockdown cells than in wild types (Fig. 4B). The activity of the ACER3 knockdown cells was evident by lipid analysis. Thus, microsomes from ACER3 knockdown cells had significantly lower levels of sphingosine and dihydrosphingosine than mock cells (Fig. 4C). Furthermore, although significantly higher levels of 16:0, 24:1, and 24:2 ceramides were

detected in ACER3 knockdown cells than in mock cells, these increases were low (Fig. 4C). However, amounts of 16:0, 24:0, and 24:1 ceramide monohexosides and lactosylceramides were significantly increased in ACER3 knockdown over controls, suggesting metabolism of the augmented ceramide via glycosylation. No difference was observed for sphingomyelins between the two cell lines (data not shown).

To evaluate whether ACER2 hydrolyzes the fluorogenic substrates, we used a stable HeLa-based cell line expressing ACER2 in HeLa T-REx cells under the control of a tetracycline-inducible promoter system (3). This inducible expression system allows the expression of ACER2 to be turned on/off by adding/removing tetracycline to the medium. As expected, addition of tetracycline to the culture medium provoked a dramatic increase in the levels of ACER2 mRNA in HeLa T-REx cells stably transfected with

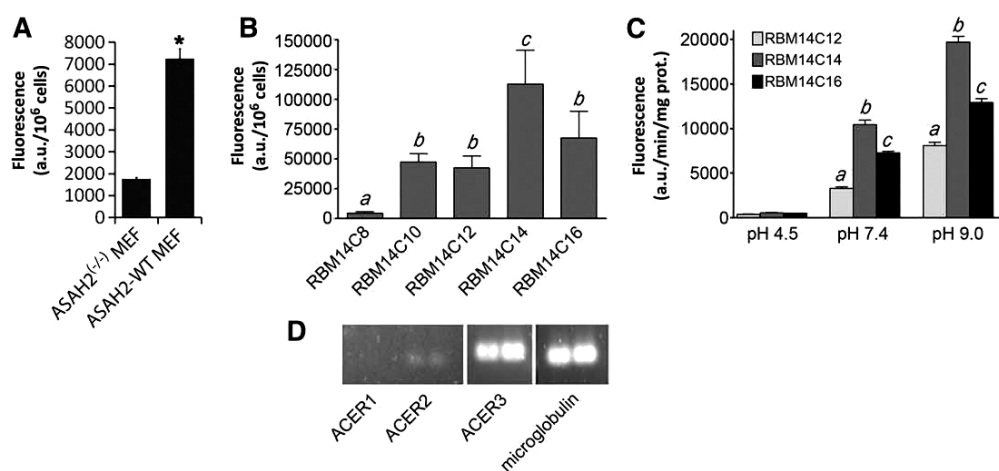


Fig. 3. Hydrolysis of RBM14 compounds by intact (B) and lysed (A, C) *ASAH2*^(-/-) MEFs. In (A), experiments were performed at pH 7.4 and data correspond to the mean ± SD of two experiments with triplicates using 17 and 12 μg of protein. The asterisk denotes statistical significance at $P < 0.00005$ (unpaired two-tailed *t*-test, $n = 6$). In (B), data (mean ± SD) were obtained from three different experiments with triplicates (3.7 , 5.1 , and 6.5×10^4 cells/well); In (C), incubations were carried out with 25 μg of protein at acid, neutral, or alkaline pH. Data correspond to the mean ± SD of three to five experiments with triplicates. Data were analyzed by one-way ANOVA test [$P < 0.0001$ (B); $P < 0.0001$ (C, pH 7.4); $P < 0.0001$ (C, pH 9.0)] followed by Bonferroni's multiple comparison test. Different letters denote a statistically significant difference between groups ($P < 0.05$). D: Agarose gel electrophoresis ACER analysis of the RT-PCR products obtained from mRNA isolated from *ASAH2*^(-/-) MEFs. Primers and PCR conditions are detailed in the Experimental Procedures. A representative image is shown.

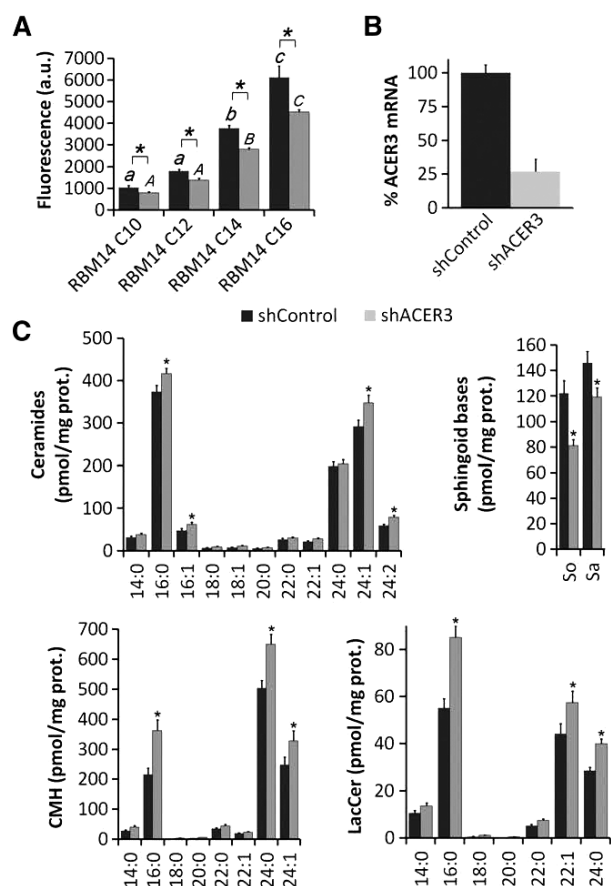


Fig. 4. Hydrolysis of RBM14 compounds by ACER3. A: Activity of microsomes isolated from ACER3 knockdown and mock HCT116 cells over the fluorogenic substrates. Incubations were carried out with 6 μg of protein in 50 mM HEPES buffer with 1 mM CaCl_2 at pH 9.0. Data, shown as mean \pm SD, correspond to three different experiments with duplicates. Data were analyzed by one-way ANOVA test [shCtrl, $P < 0.0001$ (A); shACER3, $P < 0.0001$ (A)] followed by Bonferroni's multiple comparison test. Different letters denote statistically significant differences between means at $P < 0.05$ as found by this test. Lowercase letters correspond to the shCtrl group and capitalized letters correspond to the shACER3 group. B: ACER3 and ACER2 mRNA levels in ACER3 knockdown and mock HCT116 cells as determined by qPCR. C: Amounts of ceramide, sphingoid bases, ceramide monoheptosides (CMH) and lactosylceramides (LacCer) in microsomes isolated from ACER3 knockdown and mock HCT116 cells as determined by LC/MS. Data correspond to the mean \pm SD of two experiments with triplicates. Mean (\pm SD) sphingoid base phosphate levels were 2.2 ± 0.2 pmol/mg protein for shCtrl and 1.7 ± 0.2 pmol/mg protein for shACER3. Asterisks indicate significant difference between shCtrl and shACER3 at $P < 0.05$ (unpaired two-tailed *t*-test).

ACER2 (ACER2-TET-ON cells) over those of cells cultured in tetracycline-free medium (Fig. 5A). In agreement, Western blot analysis with antibodies against ACER2 showed that expression of ACER2 was induced with tetracycline (10 ng/ml, 24 h) in ACER2-TET-ON cells (Fig. 5B). In contrast, microsomes of ACER2-TET-ON cells cultured in the presence of tetracycline had no activity on the fluorogenic substrates (Fig. 5C). Conversely, tetracycline provoked a low, but significant, decrease in fluorescence from

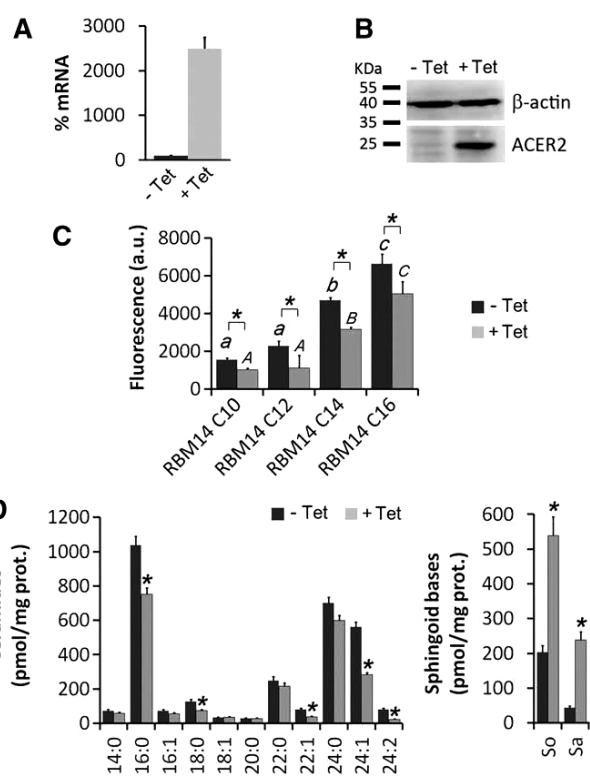


Fig. 5. Hydrolysis of RBM14 compounds by ACER2. HeLa T-REx ACER2-TET-ON cells were grown in the absence (-Tet) or presence (+Tet) of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. A: ACER2 mRNA levels as quantified by qPCR. B: Representative Western blot showing the levels of ACER2 protein in microsomes (6 μg of protein). C: Hydrolysis of the fluorogenic substrates by microsomes isolated from HeLa T-REx ACER2-TET-ON cells grown in the absence (-Tet) or presence (+Tet) of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. Incubations were carried out with 6 μg of protein in 50 mM HEPES buffer with 1 mM CaCl_2 at pH 9.0. D: Amounts of ceramide and sphingoid bases in microsomes isolated from HeLa T-REx ACER2-TET-ON cells grown in the absence (-Tet) or presence (+Tet) of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. Data correspond to the mean \pm SD of three experiments with duplicates. In (C), data (mean \pm SD) were analyzed by one-way ANOVA test ($P < 0.0001$) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Different letters denote a statistically significant difference between means at $P < 0.05$ as found by this test. Lowercase letters correspond to the ACER2-TET-ON cells grown in the absence (-Tet) of tetracycline group and capitalized letters correspond to the ACER2-TET-ON cells grown in the presence (+Tet) of tetracycline group. Asterisks indicate a significant difference between samples from cells treated with and without tetracycline at $P < 0.05$ (unpaired two-tailed *t*-test). In (D), data correspond to the mean \pm SD of two experiments with triplicates. Mean (\pm SD) sphingoid base phosphate levels were: -Tet, 5.1 ± 0.3 pmol/mg protein; +Tet, 16.9 ± 1.1 pmol/mg protein.

all substrates tested as compared with tetracycline-free control cells. That the expressed enzyme was active was proven by LC/MS analysis. Thus, microsomes from ACER2-TET-ON cells treated with tetracycline contained significantly lower levels of 16:0, 18:0, 22:1, 24:0, 24:1, and 24:2 ceramides than microsomes from cells cultured in the absence of tetracycline (controls) (Fig. 5D). The higher difference was observed for the 24:1 and 24:2 species. In agreement with the activity of the overexpressed ACER2,

microsomes from tetracycline-treated ACER2-TET-ON cells had significantly higher levels of free bases than controls (Fig. 5D).

The same tetracycline-inducible enzyme expression system was used to evaluate the ability of ACER1 to hydrolyze the fluorogenic substrates. Addition of tetracycline to the culture medium provoked an increase in the levels of ACER1 mRNA in HeLa T-REX cells stably transfected with ACER1 (ACER1-TET-ON cells) over controls (cells incubated in tetracycline-free medium) (Fig. 6A). However, microsomes of ACER1-TET-ON cells cultured in the presence of tetracycline had no activity on the fluorogenic substrates (Fig. 6B). Contrarily, tetracycline provoked a low, but significant, decrease in fluorescence from RBM14C14 and RBM14C16, as compared with tetracycline-free controls. Evidence that the overexpressed enzyme was active was obtained by LC/MS analysis of microsomes isolated from both cells treated with or without tetracycline. Thus, tetracycline induced a significant decrease in the levels of 22:0, 22:1,

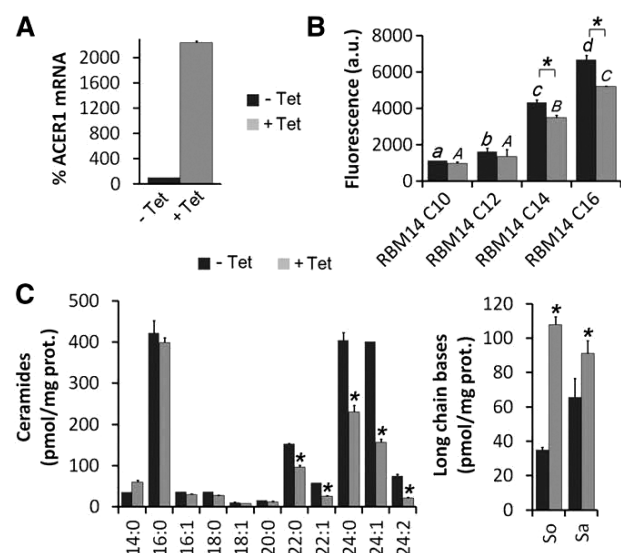


Fig. 6. Hydrolysis of RBM14 compounds by ACER1. HeLa T-REX ACER1-TET-ON cells were grown in the absence (–Tet) or presence (+Tet) of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. A: mRNA levels as quantified by qPCR. B: Hydrolysis of the fluorogenic substrates by microsomes isolated from HeLa T-REX ACER2-TET-ON cells grown in the absence (–Tet) or presence (+Tet) of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. Incubations were carried out with 6 μ g of protein in 50 mM HEPES buffer with 1 mM CaCl₂ at pH 9.0. C: Amounts of ceramide and sphingoid bases in microsomes isolated from HeLa T-REX ACER2-TET-ON cells grown in the absence (–Tet) or presence (+Tet) of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. Data correspond to the mean \pm SD of two experiments with triplicates. In (B), data were analyzed by one-way ANOVA test ($P < 0.0001$) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Different letters denote a statistically significant difference between means at $P < 0.05$ as found by this test. Lowercase letters correspond to the ACER2-TET-ON cells grown in the absence (–Tet) of tetracycline group and capitalized letters correspond to the ACER2-TET-ON cells grown in the presence (+Tet) of tetracycline group. In (B) and (C), asterisks indicate significant difference between samples from cells treated with and without tetracycline at $P < 0.05$ (unpaired two-tailed t -test). Mean (\pm SD) sphingoid base phosphate levels were: –Tet, 2.7 ± 0.3 pmol/mg protein; +Tet, 7.7 ± 0.5 pmol/mg protein.

24:0, 24:1, and 24:2 ceramides and an increase in the amounts of free bases, mainly sphingosine (Fig. 6C).

Because RBM14C14 is the best substrate for ACER3, the Z factor was calculated using cell lysates from *ASAH2*^(–/–) MEFs. A Z factor of 0.74 ± 0.05 was found, demonstrating that the assay is suitable for HTS applications.

Hydrolysis of RBM14 by NAAA

Because NAAA has been shown to have a low, but significant, ceramide hydrolyzing activity over *N*-lauroyl-sphingosine at pH 4.5 (15), we tested to determine whether NAAA was able to hydrolyze the RBM14 compounds. To this end, HEK293T cells were transiently transfected with an expression vector harboring the human NAAA gene, and the activity over RBM14 was determined in cell lysates at acidic pH. As shown in Fig. 7, lysates from NAAA-transfected cells produced significantly more fluorescence from RBM14C14 and RBM14C16 than lysates from cells transfected with the empty vector. These increases were 1.6 and 2.7 for RBM14C14 and RBM14C16, respectively.

DISCUSSION

Ceramidases are amidohydrolases that catalyze the cleavage of ceramides and dihydroceramides to release fatty acids and sphingosine and sphinganine, respectively. Fluorescence spectroscopy-based methods to determine ceramidase activity have gained attention due to their high sensitivities and signal-to-noise ratios. In this context, different fluorophores, such as NBD (21–23), BODIPY, (24), lissamine-rhodamine (24), and Nile Red (25) have been incorporated into either the fatty acyl or the sphingoid base moiety to produce fluorescent (dihydro)ceramides as ceramidase substrates. Despite the advantage of fluorescent over radioactive methods, the former are not amenable for high-throughput formats. In contrast, fluorogenic substrates are susceptible for high-throughput configurations. Reported ceramidase fluorogenic substrates include FRET-based dually labeled ceramides (12, 26) in which donor and

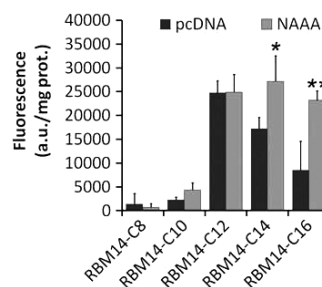


Fig. 7. Hydrolysis of RBM14 fluorogenic substrates by NAAA. Lysates (25 μ g of protein) from HEK293 T cells transfected with NAAA or the empty plasmid were incubated for 3 h with the substrates (40 μ M) as detailed in the Experimental Procedures. Data correspond to the mean \pm SD of two experiments with three to four replicates. Asterisks indicate a significant difference between samples from cells transfected with NAAA-containing or empty plasmid at $*P < 0.025$ and $**P < 0.005$ (unpaired two-tailed t -test).

acceptor FRET pairs are located as part of the acyl chain and/or the sphingoid base of the substrate, and fluorescence is displayed by the ceramidase hydrolysis-promoted fluorescence quencher release. On the other hand, a series of fluorogenic coumarin-containing ceramidase substrates has also been described (10, 11). These compounds (RBM14 compounds, Fig. 1) were first reported as substrates of the AC (10, 11), but the studies described herein show that they are also hydrolyzed by other amidohydrolases such as NC, ACER3, and, to a lesser extent, NAAA.

In the first case, NC includes bacterial, human, and mouse enzymes. Comparison of the K_m/V_{max} ratios indicate that the bacterial enzyme exhibits a preference for RBM14C12 and RBM14C14 ($K_m/V_{max} = 0.032$ and 0.048 , respectively), while the human enzyme hydrolyzes RBM14C14 and RBM14C16 preferentially ($K_m/V_{max} = 0.0083$ and 0.0069 , respectively). In both cases, the substrate affinity increases directly with increasing the *N*-acyl chain length, as concluded from the decrease of the K_m values. This correlation is particularly evident with the human enzyme, which has, in general, less affinity for the coumarinic substrates than the bacterial enzyme. In contrast, the latter hydrolyzes RBM14 with lower reaction rates than the human enzyme. As compared with reported substrates, hydrolysis of *N*-hexadecanoylsphingosine by pure pCDase occurs with a K_m of $139 \mu\text{M}$ and a V_{max} of $5,300 \text{ nmol/min/mg}$ of protein ($K_m/V_{max} = 0.026$) (23) (Table 1). Thus, the enzyme exhibits a lower affinity for *N*-hexadecanoylsphingosine than for the best fluorogenic substrate, RBM14C12, but the reaction rate is ten times faster with the former than with the later. On the other hand, pure hNC hydrolyzes *N*-[12-[(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino]dodecanoyl]D-erythro-sphingosine (CerC12NBD) with a K_m of $33.41 \mu\text{M}$ and a V_{max} of 826 nmol/min/mg of protein ($K_m/V_{max} = 0.040$) (29) (Table 1). Therefore, RBM14C16 is a better substrate of hNC than CerC12NBD, as its K_m value is one-half lower ($16 \mu\text{M}$) and its V_{max} is almost three times higher, which affords a K_m/V_{max} ratio 5.8 times lower (0.0069) (Table 1).

Regarding the mNC, studies were carried out using acid ceramidase-deficient Farber cells transiently transfected with the mouse *ASAH2* gene. In this case, a preferential trend for the short acyl chain substrates was observed both in intact and lysed cells. The similarity between both sets of results excludes the possibility that the substrate preference observed in intact cells is due to putative transacylation of the administered substrate. Intriguingly, the mNC also hydrolyzes RBM14C8, which is not accepted as a substrate by any other ceramidase so far studied. The different substrate preferences between bacterial NC, hNC, and mNC are likely due to differences in their amino acid sequences that may impart different 3D structures to the substrate binding pockets.

Among the three ACERs, only ACER3 has been shown to hydrolyze RBM14, with a preferential activity over the C14 derivative. This conclusion was drawn from results obtained in *ASAH2*^(-/-) MEFs, which exhibited an expected lower capacity to hydrolyze RBM14C12 than wild-type MEFs at neutral pH. These cells, containing ACER3 as the almost


exclusive ACER, were able to hydrolyze the fluorogenic substrates. As expected, lipid analysis of microsomes from ACER3 knockdown HCT116 cells contained lower amounts of free sphingoid bases than control cells. However, although they also had a higher content of C16:0, C24:1, and C24:2 ceramides, they were not as high (less than 30%) as we expected based on the decrease in ACER3 mRNA levels. Because accumulation of ceramide has been reported to induce cell death, further metabolism of ceramide to more complex lipids could explain the low levels found in these cells. The fact that ACER3 knockdown HCT116 cells contained significantly higher levels of ceramide monohexosides and lactosylceramide supports this possibility.

As mentioned in the Results section, microsomes from ACER1 and ACER2 overexpressing cells produced less fluorescence from the substrates than control microsomes, suggesting a lower capacity of the former to hydrolyze RBM14 compounds. These intriguing results suggest that overexpression of ACER1 and ACER2 provokes a downregulation of other ceramidases. Because the assay was conducted in microsomes at basic pH, ACER3, which hydrolyzes RBM14, is the most plausible candidate. Furthermore, ACER3 is highly expressed in HeLa T-REx cells (3). Experimental evidence has been reported that ACER3 knockdown upregulates the expression of ACER2 (4). However, no data have been reported that overexpression of one ACER affects the expression of other ceramidases. Nevertheless, transcript analysis showed that tetracycline did not affect ACER3 mRNA levels in either ACER1-TET-ON or ACER2-TET-ON cells (data not shown). Whether the enzyme activity is reduced by ACER1 and ACER2 overexpression is not known. In this regard, it is possible that activity is decreased by product (sphingoid bases) inhibition, because the total sphingosine/sphinganine levels in cells grown in the presence of tetracycline increased 2- and 3-fold over controls for ACER1 and ACER2 overexpressing cells, respectively. In any case, the overall results shown indicate that neither ACER1 nor ACER2 hydrolyze RBM14.

The lack of hydrolysis of RBM14 compounds by ACER1 and ACER2 could be explained by their reported preference for very long chain ceramides (1, 2, 17, 27), while ACER3 hydrolyzes long chain, but not very long chain, unsaturated ceramides (4). Considering that RBM14 bears a modification in the sphingoid base moiety, another plausible explanation is that ACER3 tolerates this modification, while ACER1 and ACER2 do not. In this regard, ACER3 can hydrolyze ceramides, dihydroceramides, and phytoceramides, while ACER1 and ACER2 are more restrictive toward the ceramide sphingoid base portion (28).

Bioactive *N*-acylethanolamines, including the endocannabinoid anandamide and the anti-inflammatory and neuroprotective *N*-palmitoylethanolamine, are hydrolyzed to fatty acids and ethanolamine by fatty acid amide hydrolase and NAAA. The latter, discovered by Ueda and collaborators (14), was shown to work only at acidic pH. NAAA has no homology to fatty acid amide hydrolase, but shares homology with AC and was reported to hydrolyze *N*-lauroylsphingosine at acidic pH (15). In agreement with the AC activity of NAAA, in this article, we show that NAAA hydrolyzes

RBM14C14 and RBM14C16, although both appear to be poor substrates.

In summary, besides AC, NC, ACER3, and NAAA also hydrolyze fluorogenic RBM14 compounds. Although the selectivity of the substrates toward ceramidases can be modulated by the length of the *N*-acyl chain, none of them is specific for a particular enzyme, except for RBM14C8, which seems to be accepted only by the ectopically expressed mNC. Despite the lack of specificity, the excellent *Z* factors obtained for the assays with both NC and ACER3 warrant the suitability of these substrates in high-throughput library screening programs aimed at identifying potent and selective inhibitors of NC and ACER3, which are currently unknown. 

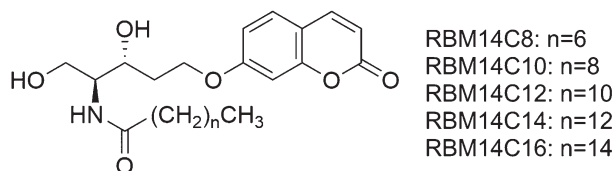
The authors thank Dr. Marta Casado for her help with qPCR and Professor Natsuo Ueda for the kind gift of pcDNA3.1(+) and pcDNA3.1(+)-NAAA plasmids.

REFERENCES

- Mao, C., R. Xu, Z. M. Szulc, J. Bielawski, K. P. Becker, A. Bielawska, S. H. Galadari, W. Hu, and L. M. Obeid. 2003. Cloning and characterization of a mouse endoplasmic reticulum alkaline ceramidase: an enzyme that preferentially regulates metabolism of very long chain ceramides. *J. Biol. Chem.* **278**: 31184–31191.
- Sun, W., J. Jin, R. Xu, W. Hu, Z. M. Szulc, J. Bielawski, L. M. Obeid, and C. Mao. 2010. Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *J. Biol. Chem.* **285**: 8995–9007.
- Mao, Z., W. Sun, R. Xu, S. Novgorodov, Z. M. Szulc, J. Bielawski, L. M. Obeid, and C. Mao. 2010. Alkaline ceramidase 2 (ACER2) and its product dihydrosphingosine mediate the cytotoxicity of *N*-(4-hydroxyphenyl)retinamide in tumor cells. *J. Biol. Chem.* **285**: 29078–29090.
- Hu, W., R. Xu, W. Sun, Z. M. Szulc, J. Bielawski, L. M. Obeid, and C. Mao. 2010. Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **285**: 7964–7976.
- Park, J. H., and E. H. Schuchman. 2006. Acid ceramidase and human disease. *Biochim. Biophys. Acta.* **1758**: 2133–2138.
- Zeidan, Y. H., R. W. Jenkins, J. B. Korman, X. Liu, L. M. Obeid, J. S. Norris, and Y. A. Hannun. 2008. Molecular targeting of acid ceramidase: implications to cancer therapy. *Curr. Drug Targets.* **9**: 653–661.
- Ito, M., N. Okino, and M. Tani. 2014. New insight into the structure, reaction mechanism, and biological functions of neutral ceramidase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1841**: 682–691.
- Duan, R-D., and A. Nilsson. 2009. Metabolism of sphingolipids in the gut and its relation to inflammation and cancer development. *Prog. Lipid Res.* **48**: 62–72.
- Nieves, I., P. Sanllehí, J. L. L. Abad, G. Fabriàs, J. Casas, A. Delgado, G. Fabrias, J. Casas, and A. Delgado. 2015. Chemical probes of sphingolipid metabolizing enzymes. In *Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapy*. Y. A. Hannun, C. Luberto, C. Mao, et al., editors. Springer Science, New York. In press.
- Bedia, C., J. Casas, V. Garcia, T. Levade, and G. Fabrias. 2007. Synthesis of a novel ceramide analogue and its use in a high-throughput fluorogenic assay for ceramidases. *ChemBioChem.* **8**: 642–648.
- Bedia, C., L. Camacho, J. L. Abad, G. Fabrias, and T. Levade. 2010. A simple fluorogenic method for determination of acid ceramidase activity and diagnosis of Farber disease. *J. Lipid Res.* **51**: 3542–3547.
- Bhabak, K. P., A. Hauser, S. Redmer, S. Banhart, D. Heuer, and C. Arenz. 2013. Development of a novel FRET probe for the real-time determination of ceramidase activity. *ChemBioChem.* **14**: 1049–1052.
- Medin, J. A., T. Takenaka, S. Carpentier, V. Garcia, J. P. Basile, B. Segui, N. Andrieu-Abadie, N. Auge, R. Salvayre, and T. Levade. 1999. Retrovirus-mediated correction of the metabolic defect in cultured Farber disease cells. *Hum. Gene Ther.* **10**: 1321–1329.
- Tsuboi, K., Y-X. Sun, Y. Okamoto, N. Araki, T. Tonai, and N. Ueda. 2005. Molecular characterization of *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase, a novel member of the choloylglycine hydrolase family with structural and functional similarity to acid ceramidase. *J. Biol. Chem.* **280**: 11082–11092.
- Tsuboi, K., N. Takezaki, and N. Ueda. 2007. The *N*-acylethanolamine-hydrolyzing acid amidase (NAAA). *Chem. Biodivers.* **4**: 1914–1925.
- Wu, B. X., C. F. Snook, M. Tani, E. E. Büllesbach, and Y. A. Hannun. 2007. Large-scale purification and characterization of recombinant *Pseudomonas* ceramidase: regulation by calcium. *J. Lipid Res.* **48**: 600–608.
- Xu, R., J. Jin, W. Hu, W. Sun, J. Bielawski, Z. Szulc, T. Taha, L. M. Obeid, and C. Mao. 2006. Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J.* **20**: 1813–1825.
- Canals, D., D. Mormeneo, G. Fabriàs, A. Llebaria, J. Casas, and A. Delgado. 2009. Synthesis and biological properties of Pachastrissamine (jaspine B) and diastereoisomeric jaspines. *Bioorg. Med. Chem.* **17**: 235–241.
- Garanto, A., N. A. Mandal, M. Egado-Gabás, G. Marfany, G. Fabriàs, R. E. Anderson, J. Casas, and R. González-Duarte. 2013. Specific sphingolipid content decrease in Cerkl knockdown mouse retinas. *Exp. Eye Res.* **110**: 96–106.
- Zhang, J. H., T. D. Chung, and K. R. Oldenburg. 1999. A simple statistical parameter for use in evaluation and validation of high throughput screening assays. *J. Biomol. Screen.* **4**: 67–73.
- Nikolova-Karakashian, M., E. T. Morgan, C. Alexander, D. C. Liotta, and A. H. Merrill. 1997. Bimodal regulation of ceramidase by interleukin-1beta. Implications for the regulation of cytochrome p450 2C11. *J. Biol. Chem.* **272**: 18718–18724.
- Tani, M., N. Okino, S. Mitsutake, and M. Ito. 1999. Specific and sensitive assay for alkaline and neutral ceramidases. *J. Biochem.* **125**: 746–749.
- Okino, N., M. Tani, S. Imayama, and M. Ito. 1998. Purification and characterization of a novel ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biol. Chem.* **273**: 14368–14373.
- He, X., C. M. Li, J. H. Park, A. Dagan, S. Gatt, and E. H. Schuchman. 1999. A fluorescence-based high-performance liquid chromatographic assay to determine acid ceramidase activity. *Anal. Biochem.* **274**: 264–269.
- Bhabak, K. P., D. Proksch, S. Redmer, and C. Arenz. 2012. Novel fluorescent ceramide derivatives for probing ceramidase substrate specificity. *Bioorg. Med. Chem.* **20**: 6154–6161.
- Nieuwenhuizen, W. F., S. van Leeuwen, F. Gotz, and M. R. Egmond. 2002. Synthesis of a novel fluorescent ceramide analogue and its use in the characterization of recombinant ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Chem. Phys. Lipids.* **114**: 181–191.
- Sun, W., R. Xu, W. Hu, J. Jin, H. A. Crellin, J. Bielawski, Z. M. Szulc, B. H. Thiers, L. M. Obeid, and C. Mao. 2008. Upregulation of the human alkaline ceramidase 1 and acid ceramidase mediates calcium-induced differentiation of epidermal keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**: 389–397.
- Mao, C., and L. M. Obeid. 2008. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* **1781**: 424–434.
- Airola, M. V., W. J. Allen, M. J. Pulkoski-Gross, L. M. Obeid, R. C. Rizzo, and Y. A. Hannun. 2015. Structural basis for ceramide recognition and hydrolysis by human neutral ceramidase. *Structure.* **23**: 1482–1491.

ERRATUM

The authors of “Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic N-acylated coumarine-containing aminodiols” (*J. Lipid Res.* 56: 2019–2028) have informed the *Journal* that the original chemical structure shown in Fig. 1 was incorrect. The oxygen atom in the ether bridge should be directly attached to the coumarine unit. This error does not affect the results or conclusions of this work. The corrected Fig. 1 appears below.



RESULTATS ADDICIONALS CAPÍTOL 1

Estudi de la hidròlisi del substrat RBM14 per l'ACER3

Introducció

En l'article presentat anteriorment es demostra que els compostos RBM14, a part de ser substrats per l'AC, són substrats de la NC i l'ACER3, però no de l'ACER1 i l'ACER2. L'anàlisi sobre la capacitat d'hidrolitzar el substrat per part de l'ACER3 es va realitzar en un model cel·lular que expressava de manera estable un shRNA contra aquesta CDasa. Per tal de corroborar els resultats presentats, es realitza l'anàlisi de la hidròlisi dels substrats RBM14 en un nou model cel·lular. En aquest cas la línia humana HEK293T transfectada amb un plàsmid que codifica per l'ACER3 de ratolí.

Materials i mètodes

Materials:

Juntament amb els materials descrits en l'article presentat en el capítol 1, es va adquirir el plàsmid pCMV6 que codifica per l'ACER3 unida a un tag Myc-DDK (MR218055) a OriGene (figura 24).

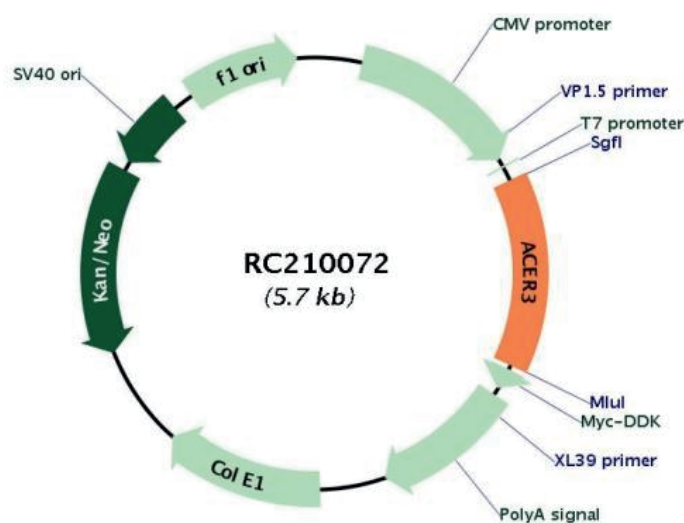


Figura 24: Plàsmid pCMV6 que codifica per l'ACER3 unida a un tag de Myc-DDK

Cultiu cel·lular:

El model cel·lular utilitzat són les HEK293T, cèl·lules embrionàries de ronyó humà que expressen de manera estable l'antigen T que s'uneix als promotors SV40 del vector per tal d'augmentar la seva l'expressió. Es van cultivar a 37°C, 5% de CO₂ en medi de cultiu "Dulbecco's modified Eagle's medium" (DMEM) amb un alt percentatge de glucosa i suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví i un 1% de penicil·lina i estreptomicina.

Sobreexpressió d'ACER3:

Per sobreexpressar l'ACER3, les cèl·lules HEK293T es van transfectar amb el plàsmid pCMV6 que codifica per l'ACER3 unida a un tag Myc-DDK (figura 24). 24 h abans de la transfecció, les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous (2.5×10^5 cèl·lules per pou) i es van transfectar amb 2.5 µg/pou del plàsmid pCMV6/ACER3 i 10 µl de Lipofectamina 2000[®] en 1 ml de medi de cultiu opti-MEM durant 7h. Passat aquest temps es van afegir 2 ml de DMEM fresc en cada pou i es van incubar 16 h més. Les cèl·lules es van recollir i centrifugar per obtenir el pellet cel·lular.

Determinació de l'activitat CDasa:

La determinació de l'activitat CDasa en els microsomes aïllats a partir dels llisats cel·lulars es va realitzar seguint la metodologia descrita en l'article presentat en el capítol 1.

Resultats

L'ACER3 hidrolitza el RBM14:

Per confirmar la hidròlisi del RBM14 per part de l'ACER3, les preparacions microsomals de les cèl·lules HEK293T que sobreexpressen l'ACER3 i les controls (cèl·lules transfectades sense el plàsmid) es van incubar amb les sondes fluorogèniques durant 3 h en tampó HEPES a pH 9.

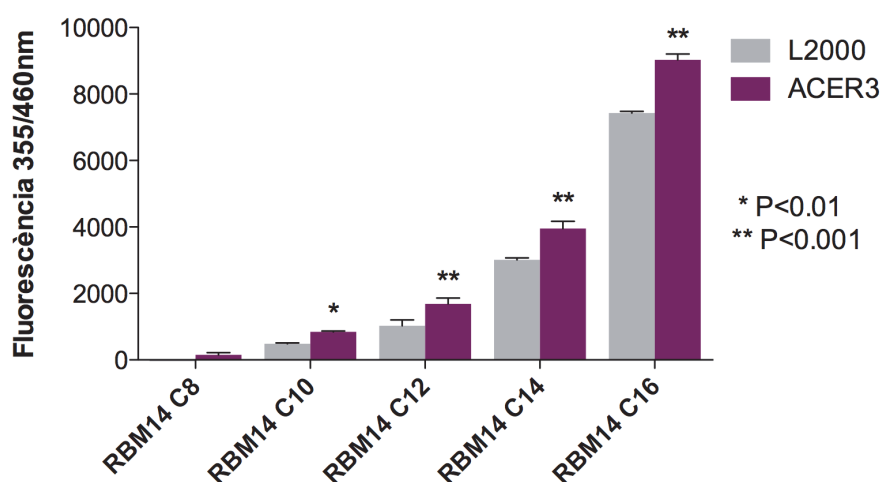


Figura 25: Hidròlisi dels compostos RBM14 en microsomes aïllats de HEK293T control (L2000) i sobreexpressant l'ACER3 (ACER3). Els substrats (40 µM) es van incubar amb microsomes que contenen 6 µg de proteïna en tampó HEPES 50 mM amb 1 mM de CaCl₂ a pH 9. Les dades corresponen a les mitjanes ±SD de dos experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa entre les mostres control i les cèl·lules que sobreexpressen l'ACER3 (*P<0.01, **P<0.001; prova t de Student de dues cues per dades independents)

Com es mostra en la figura 25, es va alliberar una fluorescència significativament més elevada dels compostos RBM14C10, RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16 en les cèl·lules que sobreexpressen l'ACER3, en comparació amb les cèl·lules control que han estat

transfectades sense el plàsmid. Aquest resultat indica que l'ACER3 és capaç d'hidrolitzar aquests derivats fluorogènics del RBM14.

Tot i haver-se detectat més fluorescència en les cèl·lules transfectades amb el plàsmid que codifica per l'ACER3, les cèl·lules control van presentar una senyal basal molt elevada, tenint en compte que l'única ACER capaç d'hidrolitzar el RBM14 és l'ACER3. Per descartar possibles interferències amb la NC, les preparacions microsomals es van incubar durant 3 h en tampó HEPES a pH 9 i pH 7.5 amb les sondes fluorogèniques, en aquest cas només el RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16. Tal com s'esperava es van repetir els resultats a pH 9, alliberant més fluorescència dels substrats les cèl·lules que sobreexpressaven l'ACER3 (figura 26). A pH neutre tot i que es va detectar senyal de fluorescència, no es van apreciar diferències significatives entre les cèl·lules control i les transfectades amb el plàsmid que codifica per l'ACER3.

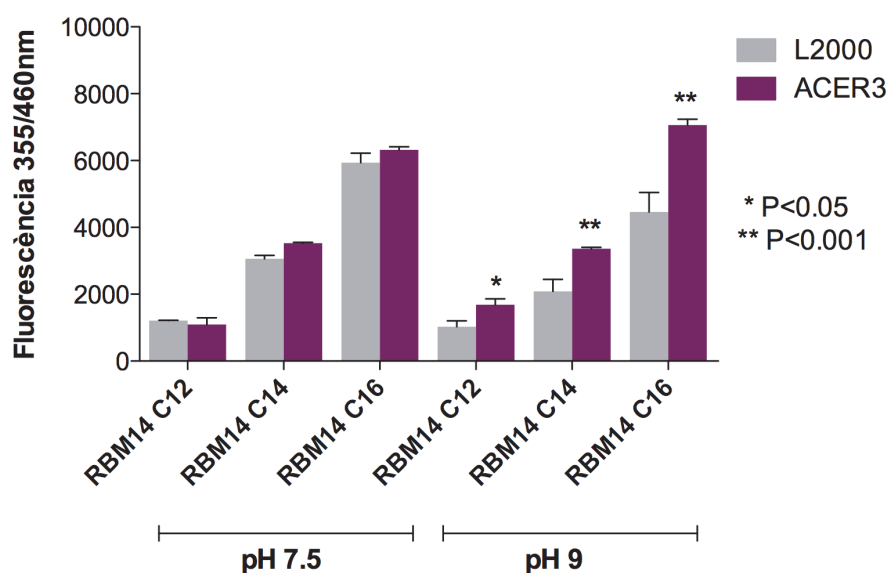


Figura 26: Hidròlisi dels compostos RBM14 en microsomes aïllats de HEK293T control (L2000) i sobreexpressant ACER3 (ACER3) en un tampó de reacció neutre (pH 7.5) o bàsic (pH 9). Els substrats (40 μ M) es van incubar amb microsomes que contenien 6 μ g de proteïna en tampó HEPES 50 mM amb 150 mM de NaCl i 1% de colat sòdic a pH 7.5 o tampó HEPES 50 mM amb 1 mM de CaCl_2 a pH 9. Les dades corresponen a les mitjanes \pm SD de dos experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa entre les mostres control i les cèl·lules que sobreexpressen l'ACER3 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$; prova *t* de Student de dues cues per dades independents)

CAPÍTOL 2

Determinació de l'activitat esfingosina-1-fosfat liasa en cèl·lules intactes utilitzant sensors fluorogènics encapsulats en liposomes catiónics

ARTICLE

“Improved fluorogenic sensors for the *in vivo* quantification of sphingosine-1-phosphate lyase activity”

RESULTATS ADDICIONALS

Elecció del model cel·lular per l'estudi

Validació dels liposomes RBM148 en la recerca d'inhibidors de la S1PL

ARTICLE 2

Improved fluorogenic sensors for the *in vivo* quantification of sphingosine-1-phosphate lyase activity

Pol Sanllehi^{1,2}, **Mireia Casasampere**^{1,2}, José Luís Abad¹, Gemma Fabrias¹, Olga López³, Jordi Bujons⁴, Josefina Casas¹ i Antonio Delgado^{1,2}.

¹Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), 08034 Barcelona, Spain

²Universitat de Barcelona (UB), Facultat de Farmàcia, Departament de Farmacologia, toxicologia i química mèdica, Unitat de química farmacèutica (associada a CSIC), 08034 Barcelona, Spain

³Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Biofísica de lípids i interfases (BLI), Departament de tecnologia química i de tensioactius, 08034 Barcelona, Spain

⁴Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Departament de química biològica i modelització molecular, 08034 Barcelona, Spain

Enviat a Chemistry-A European Journal

Factor d'impacte: 5.77

La contribució de Mireia Casasampere a aquest treball presentat com a capítol 2 d'aquesta tesi, correspon al disseny d'experiments, i obtenció i elaboració de les dades presentades en les figures 4, 5, 6, 7, S5, S6, S7, S8, S9 i S10. També ha contribuït a l'escriptura del primer esborrany. Els resultats mostrats als esquemes, figures 1, 2, 3, S1, S2, S3, S4 i taula 1 varen formar part de la tesi doctoral de Pol Sanllehi, presentada el 2016 dins el programa de Doctorat de Química Orgànica Experimental i Industrial de la Universitat de Barcelona.

Josefina Casas Brugulat
Directora de tesi

RESUM

Sensors fluorogènics millorats per a la quantificació *in vivo* de l'activitat esfingosina-1-fosfat

Objectius: En un article previ, s'havia descrit per part del nostre grup, un nou mètode aplicable a assajos HTS per determinar l'activitat S1PL utilitzant el substrat fluorogènic RBM13. No obstant, el RBM13 presentava limitacions, com ara la seva baixa afinitat cap a la S1PL; així com la incapacitat per travessar la membrana plasmàtica, el que impedeix el seu ús en estudis amb cèl·lules vives. Els objectius d'aquest treball són en primer lloc millorar la sonda RBM13 amb la síntesi de nous anàlegs, i d'altra banda aconseguir la incorporació de les sondes a l'interior de la cèl·lula i així poder determinar l'activitat S1PL en cèl·lules intactes.

Metodologia: La síntesi de les noves sondes RBM77 i RBM148 es va obtenir mitjançant la reacció de metàtesi creuada d'olefines (OCM) catalitzada per ruteni entre un precursor esfingoide i un derivat cumarínic. Els estudis de modelització molecular en la hS1PL es van realitzar amb els substrats RBM13, RBM77 i RBM148 units al cofactor piridoxal fosfat en el centre actiu de l'enzim (PDB 4Q6R). L'activitat S1PL es va determinar mesurant la fluorescència alliberada per les sondes quan són hidrolitzades. En primer lloc, la validació dels compostos RBM77 i RBM148 com a nous substrats de la S1PL i la determinació dels seus paràmetres cinètics es va realitzar amb la hS1PL recombinant com a font enzimàtica. En segon lloc es van preparar els liposomes catiònics formats per una mescla 1:1 de PC i DOTAP que encapsulaven els diferents substrats fluorogènics. La caracterització dels liposomes va consistir en la determinació de la seva mida per DLS i la determinació de l'EE. Finalment, l'avaluació de l'activitat S1PL utilitzant els substrats encapsulats es va realitzar en llisats cel·lulars o en cèl·lules intactes de fibroblasts de ratolí MEF SGPL1^{+/+}, SGPL1^{+/-}, SGPL1^{-/-} i en la línia cel·lular HEK293T transfectada amb el gen *Sgp11* que codifica per la S1PL.

Resultats: Els paràmetres cinètics obtinguts amb els nous substrats van ser millors que els del RBM13, amb una K_M menor i una V_{max} més elevada. En termes de relació V_{max}/K_M , el RBM77 es va comportar com el millor substrat. No obstant, la completa alliberació d'umbel·liferona del substrat RBM77 va requerir una solució etanòlica de KOH. En canvi amb el RBM148 era suficient l'addició del tampó glicina/NaOH per obtenir una senyal de fluorescència òptima. Els estudis de modelatge van mostrar que el grup cumarina dels substrats no interacciona amb el centre actiu de l'enzim i que la presència del doble enllaç en RBM77 i RBM148 no influeix en la seva disposició espacial. La simulació dinàmica molecular va mostrar que les estructures eren majoritàriament estables després d'una lleugera reordenació inicial en l'enzim. De la mateixa manera que va ocórrer en els estudis en la hS1PL recombinant, les sondes RBM77 i RBM148 es van comportar com a millors substrats que el RBM13 en llisats cel·lulars. Gràcies a l'encapsulació dels substrats fluorogènics en liposomes catiònics es va aconseguir determinar l'activitat S1PL en cèl·lules intactes. La senyal de

fluorescència era dependent de la concentració de substrat i, tal com s'esperava, més elevada en les cèl·lules que sobreexpressaven la S1PL. Degut a que l'addició de la solució etanòlica de KOH pertorbava l'estabilitat cel·lular i no va permetre una lectura òptima de fluorescència, no es van obtenir els resultats esperats amb la sonda RBM77. Per aquest motiu en comparació amb el RBM13 i el RBM77, la sonda RBM148 va demostrar ser el millor substrat per mesurar l'activitat S1PL en cèl·lules vives. Finalment es va confirmar la idoneïtat dels liposomes RBM148 per a l'avaluació de possibles inhibidors de la S1PL en cèl·lules intactes HEK293T amb l'inhibidor de referència 3c.

Conclusions: Les sondes RBM77 i RBM148 van ser validades com a nous substrats de la S1PL amb uns paràmetres cinètics millors que el RBM13. Ambdós substrats eren adequats per la determinació de l'activitat S1PL en llisats cel·lulars i útils per al descobriment de nous inhibidors enzimàtics. L'encapsulació de les sondes en liposomes catiònics va permetre la seva incorporació a dins la cèl·lula i per tant la determinació de l'activitat S1PL en cèl·lules intactes. En comparació amb les altres sondes, en termes de sensibilitat, el RBM148 va resultar ser el millor substrat per a la seva aplicació en cèl·lules vives.

Improved fluorogenic sensors for the *in vivo* quantification of sphingosine-1-phosphate lyase activity

Pol Sanllehí,^{1,2} Mireia Casasampere,^{1,2} José Luís Abad,¹ Gemma Fabriàs,¹ Olga López,³ Jordi Bujons,⁴ Josefina Casas,^{*1} and Antonio Delgado^{*1,2}

(1) Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), Department of Biomedical Chemistry, Jordi Girona 18-26; 08034-Barcelona, Spain

(2) University of Barcelona (UB), Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Toxicology and Medicinal Chemistry, Unit of Pharmaceutical Chemistry (Associated Unit to CSIC), Avda. Joan XXIII s/n, 08028-Barcelona, Spain.

(3) Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Group of Biophysics of Lipids and Interfaces (BLI), Department of Chemical and Surfactants Technology, Jordi Girona 18 26; 08034 Barcelona, Spain

(4) Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Department of Biological Chemistry and Molecular Modelling, Jordi Girona 18-26; 08034-Barcelona, Spain.

Abstract

Compounds RBM77 and RBM148 have been designed as “second generation” fluorogenic sensors for the determination of sphingosine-1-phosphate lyase activity. Their design has been inspired in the application of the principle of vinylogy from our previously reported probe RBM13. The new probes are superior to RBM13 in terms of kinetic parameters (V_{\max} and K_M) and sensitivity in cell lysates. Moreover, by encapsulation into cationic liposomes, probe RBM148 can be used for the determination of S1PL activity in intact cells.

INTRODUCTION

The development of non-natural sphingolipids amenable for monitoring sphingolipid metabolism represents an interesting contribution to the chemical toolbox. These molecules should prove useful in diagnostics, as well as to investigate sphingolipid metabolizing enzymes *in situ* or to identify new hits in drug discovery programs.

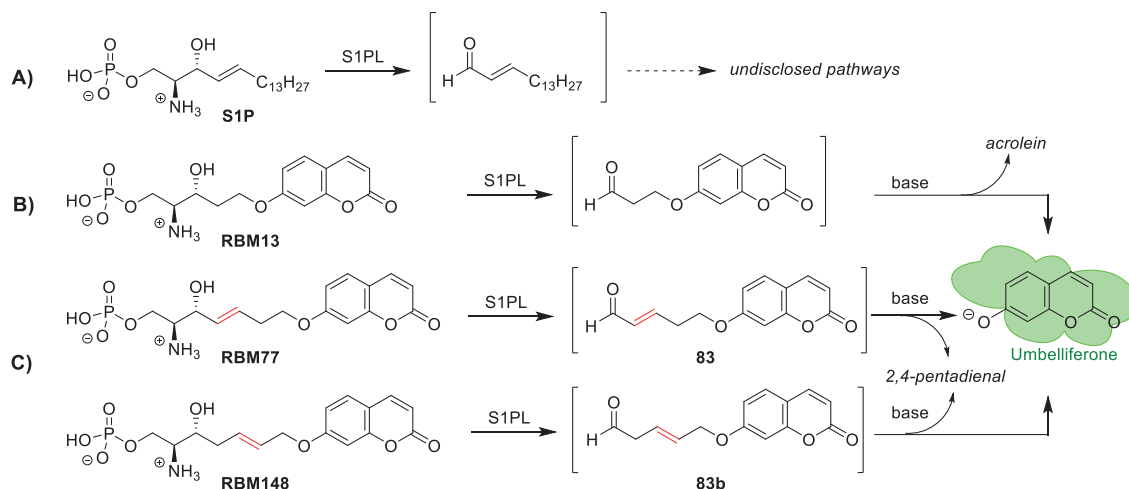
Sphingosine-1-phosphate lyase (S1PL) is a pyridoxal 5'-phosphate (PLP) dependent enzyme that catalyzes the cleavage of sphingosine-1-phosphate (S1P) and sphinganine-1-phosphate into (*E*)-2-hexadecenal or 2-hexadecanal, respectively, and ethanolamine phosphate in the catabolism of sphingolipids.^[1] The enzyme is localized in the membrane of the endoplasmic reticulum (ER) and its activity, together with that of sphingosine-1-phosphate kinases (SK) and sphingosine-1-phosphate phosphatase (S1PP) is crucial for the so-called “sphingolipid rheostat” in the cell.^[2] In fact, it is widely accepted that the cell fate depends, *inter alia*, on the ratio of the proliferative S1P *versus* the apoptotic sphingosine (So) and ceramide (Cer). Moreover, S1PL is a promising target for the treatment of inflammatory, autoimmune and neurodegenerative diseases.^[3] Compounds that potently inhibit S1PL activity directly by binding to the enzyme have been reported in the literature. The most recent and promising ones are mainly heterocyclic compounds arising from massive HTS programs,^[4-7] some of them with IC₅₀ values in the nM range.^[8,9] The development of tools to monitor the activity of S1PL has attracted the attention of several groups, as evidenced by the variety of probes and analytical techniques described so far.^[10] In a previous work,^[11] we reported a high throughput screening (HTS) method to monitor S1PL activity based on the fluorogenic substrate **RBM13** (Scheme 1). This substrate evolves, *via* a retro-aldol type reaction, to give umbelliferone as fluorescent readout in cell lysates assays in a microtiter plate format.^[11] However, an inherent limitation of **RBM13** was its relatively low affinity towards S1PL (high K_M) and a low V_{max},^[12] which required the use of higher amounts of protein in comparison with other reported methods,^[13] as well as its lack of cell permeability, which prevented its use in live cell studies. Based on these considerations, we have developed improved “second generation” analogs of our previously reported **RBM13** probe in an attempt to circumvent most of the above limitations.

RESULTS AND DISCUSSION

Design and synthesis of the probes

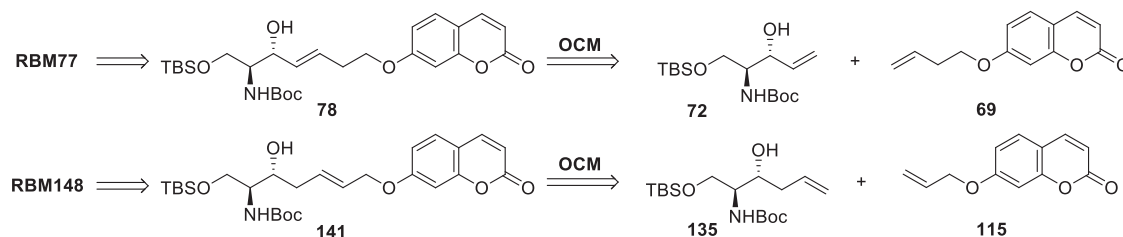
We hypothesized that the presence of a relatively bulky umbelliferyl group only two atoms apart from the C1-C3 amino hydroxy phosphate core required for substrate recognition and processing by S1PL could be, at least in part, responsible for the modest kinetic parameters of the probe. We reasoned that appropriate compounds in which the coumarin ring would be placed farther from the reactive site could be better S1PL substrates than **RBM13** (Scheme 1). Based on this assumption, we designed probes **RBM77** and **RBM148**, containing a vinyl spacer between the amino phosphate core and the umbelliferone reporter. As a result of this

vinylation approach,^[14] a similar reactivity can be expected for the resulting aldehyde products of the S1PL reaction (Scheme 1).



Scheme 1. (A): Metabolic degradation of S1P by S1PL; (B) **RBM13**, a first generation S1PL probe; (C) Conceptual design of probes **RBM77** and **RBM148** by **RBM13** vinylogation.

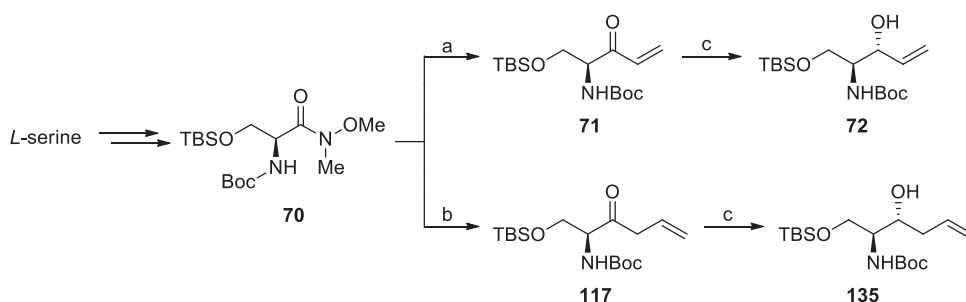
The retrosynthetic analysis of probes **RBM77** and **RBM148** relied on a Ru-catalyzed olefin cross-metathesis (OCM) between a suitable configured sphingoid moiety and an alkenyl-substituted umbelliferone fragment (Scheme 2).



Scheme 2. Retrosynthetic approach to probes **RBM77** and **RBM148**.

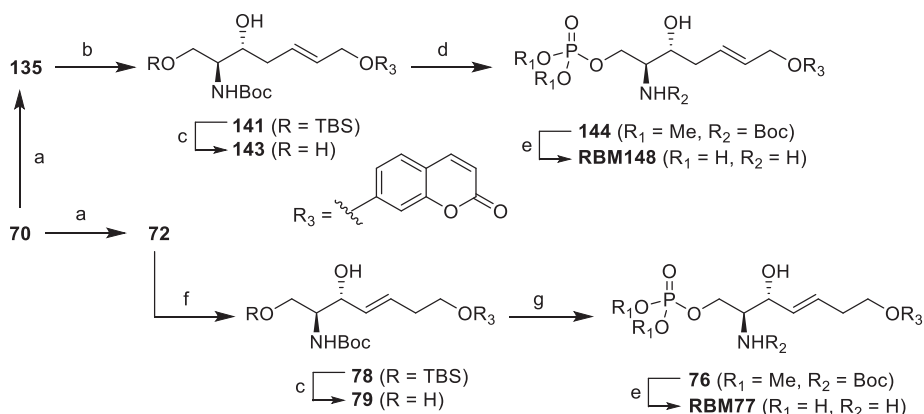
Coumarin derivatives **69** and **115** were obtained by nucleophilic substitution of the *in situ* generated umbelliferone alkoxide and the appropriate allylic or homoallylic electrophile,^[15,16] whereas the sphingoid moieties **72** and **135** were obtained from Weinreb amide **70**,^[17] as indicated in Scheme 3. Nucleophilic addition of vinyl or allyl Grignard reagents to **70** afforded ketones **71** and **117**, which were diastereoselectively reduced (LiAlH(*O*-*t*-Bu)₃) in EtOH at -78 °C^[17-19] to the corresponding *anti* aminoalcohols **72** and **135**, respectively. Since ketone **117** showed a high propensity to isomerize to the conjugated enone, it was reduced without purification.

The above *anti*-diastereoselection in the reduction of ketones **71** and **117** was confirmed by configurational assignment of the new C₃ stereocenters in **72** and **135** *via* the corresponding (*R*)- and (*S*)-*a*-methoxy-*a*-phenylacetic (MPA) esters and ¹H-NMR analysis, according to the method developed by Riguera^[20] (see Supporting).



Scheme 3. Reagents and conditions: (a) vinylmagnesium bromide, THF, 0 °C to rt (71 %). (b) allylmagnesium chloride, THF, -20 °C to rt. (c) $\text{LiAlH}(\text{O}t\text{-Bu})_3$, EtOH, -78 °C (for **72**: 90 %, dr = 98:2 *anti/syn*; for **135**: 78 % over 2 steps, dr = 99:1 *anti/syn*)

OCM from alkene **72** and coumarin **69**, using 2nd generation Grubbs catalyst,^[17] afforded **78** as a 94:6 *E:Z* mixture. Deprotection of **78** (TBAF-THF), and site-selective phosphorylation of **79** led to dimethyl phosphate **76** in good overall yields. Finally, silylation (TMSBr) and methanolysis, with simultaneous deprotection of the phosphate esters and the *N*-Boc groups, afforded the zwitterionic amino phosphate **RBM77** (Scheme 4)



Scheme 4. Reagents and conditions: (a) see Scheme 3; (b) **115**, Grubbs cat. 2nd gen., CH_2Cl_2 , reflux (66 %, dr = 93:7 *E/Z*); (c) TBAF, THF, 0 °C; (d) **143**, $(\text{MeO})_2\text{POCl}$, 1-methylimidazole, CH_2Cl_2 , 0 °C to rt; (e) (i) TMSBr, CH_3CN , 0 °C to rt. (ii) $\text{CH}_3\text{OH}/\text{H}_2\text{O}$ (95% v/v), rt; (f) **69**, Grubbs cat. 2nd gen., CH_2Cl_2 , reflux (63 %, dr = 94:6 *E/Z*); (g) **79**, $(\text{MeO})_2\text{POCl}$, 1-methylimidazole, CH_2Cl_2 , 0 °C to rt.

A similar protocol was applied starting from homoallylic alcohol **135**, as indicated in Scheme 4. In this case, OCM reaction between alkene **135** and coumarin **115** gave a 93:7 *E:Z* mixture of adducts **141**, from which the *E* isomer could be cleanly separated by flash chromatography. Deprotection of the OTBS group, site-selective phosphorylation of **143**, and final deprotection of **144** (TMSBr, followed by methanolysis) yielded **RBM148** in good yield.

Validation of probes **RBM77** and **RBM148** as substrates with recombinant human enzyme (hS1PL)

Initial assays showed that the release of umbelliferone from aldehyde **83** (see Supporting), the expected compound arising from S1PL cleavage of **RBM77** (Scheme 1) was incomplete after 6

h using the standard Gly-NaOH buffer (pH = 10.6) (Figure S3A). Stronger bases at high concentrations (ie. ≥ 200 mM KOH/EtOH or aq NaOH) led to a decrease of the fluorescence signal from umbelliferone over time (Figure S3B), whereas lower base concentrations (ie. ≤ 50 mM) and shorter incubation times gave a constant low fluorescence signal for up to 60 min (-B Figure S3C).

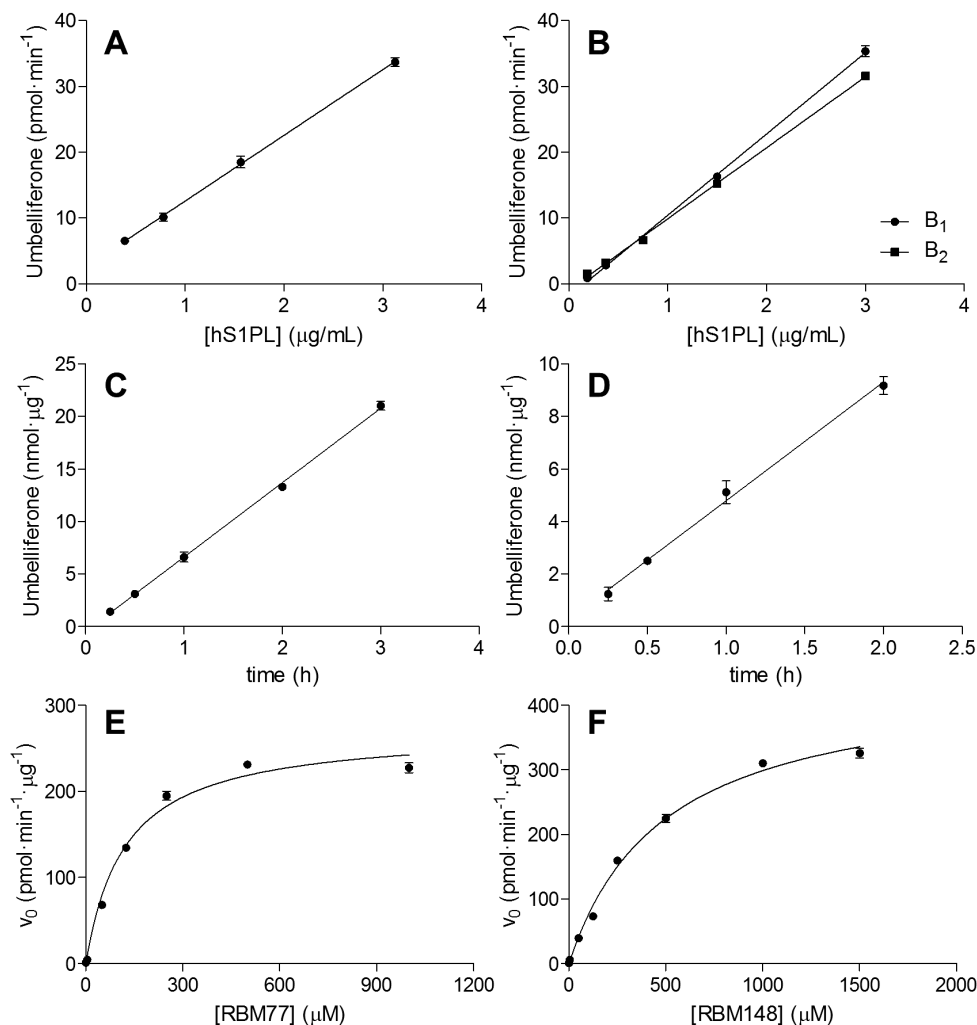


Figure 1. Enzyme concentration (A,B) and time (C,D) dependence of the hS1PL catalyzed reaction using **RBM77** (A,C) and **RBM148** (B,D) as substrates at a final concentration of 125 μ M. A and B: Incubation time was 60 min. C and D: hS1PL concentration was 0.8 μ g/mL. In B, the resulting enzymatic reaction was stopped with MeOH (50 μ L) and treated with 100 μ L of 200 mM glycine/NaOH buffer (pH 10.6) (B_1) or alternatively, treated with 100 mM KOH/EtOH (100 μ L), incubated for 20 min and the pH was further adjusted with the addition of 50 μ L of a 200 mM glycine/NaOH buffer solution (pH 10.6) immediately before reading (B_2). Data are means \pm SD of one representative experiment with triplicates. In E and F, the substrate concentration dependence of the initial velocity (V_0 , expressed as pmol of umbelliferone formed per minute and per μ g of enzyme) of the hS1PL catalyzed reaction is represented. In both cases, hS1PL (0.8 μ g/mL) was incubated for 60 min with **RBM77** (E) or **RBM148** (F) at graded concentrations. Data correspond to the mean \pm SD of one representative experiment out of three performed with triplicates.

We speculated that low base concentrations can be inefficient to completely shift the ionization of umbelliferone towards the highly fluorescent anionic form. Gratifyingly, the successive

treatment of umbelliferone with 100 mM KOH/EtOH, followed by 200 mM glycine/NaOH buffer (pH = 10.6) provided the highest fluorescence signals with an stable intensity maximum at KOH concentrations ≥ 50 mM ((+B) Figure S3C) at incubation times from 20 to 60 min. These conditions led to comparable fluorescence intensities when applied to aldehyde **83** (Figure S3D). Under these conditions, the production of fluorescence increased linearly with the concentration of **83** up to 25 μ M (results not shown). We were not able to optimize the conditions for the release of umbelliferone from the elusive β,γ -unsaturated aldehyde **83b** (Scheme 1), since attempts to synthesize it led to spontaneous decomposition and release of umbelliferone (see Supporting).

Incubation of **RBM77** (125 μ M) with hS1PL at graded enzyme concentrations showed a linear increase in product formation for up to 3 μ g/mL of enzyme (Figure 1A). Product formation also increased linearly for up to 3 h of incubation time (Figure 1C). At 0.8 μ g/mL of hS1PL and 60 min of incubation time, only around 5 % of the substrate was transformed, giving rise to a 30–fold increase of the fluorescence intensity with respect to the blank. Probe **RBM148** was also tested as hS1PL substrate under the above conditions. Formation of umbelliferone increased linearly with the amount of hS1PL (up to 3 μ g/mL, Figure 1B) and up to 2 h of incubation time (Figure 1D). Unlike **RBM77**, a similar fluorescence intensity was obtained with either the glycine/NaOH buffer (pH 10.6) or with the KOH/EtOH solution, in agreement with the expected higher reactivity of the elusive aldehyde **83b** (see above). These results proved the suitability of **RBM148** as hS1PL substrate and allowed to set the optimal incubation time to 1 h.

Table 1. Kinetic parameters for the hS1PL–catalyzed cleavage of **RBM77** and **RBM148**.^a

Substrate	K_M (μ M)	V_{max} ($\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	V_{max}/K_M	IC_{50} 3c (nM)
RBM13 ^b	1994 \pm 121	107 \pm 11	0.05	93.5 \pm 6.0
RBM77	132 \pm 14	263 \pm 13	1.99	91.2 \pm 7.1
RBM148	530 \pm 52	452 \pm 8	0.85	98.3 \pm 6.2

^aData correspond to the mean \pm SD of three independent experiments with triplicates.^b See ref^[12]

Kinetic parameters for **RBM77** and **RBM148** (see Table 1 and Figures 1E and 1F) were better, ie. lower K_M and higher V_{max} values, than those of **RBM13**. In terms of the V_{max}/K_M ratio, **RBM77** behaved as the best substrate, with up to 40 times higher V_{max}/K_M ratio in comparison with **RBM13**. The presence of the natural–like allyl alcohol moiety in **RBM77** can account for the observed results. Finally, the IC_{50} values for the reported hS1PL inhibitor **3c**^[8] (Figure 7) using **RBM77** and **RBM148** as substrates were comparable to those obtained for **RBM13**,^[12] thus confirming the reliability of our novel fluorogenic S1PL substrates (Figure S4).

Docking studies

In order to shed light on the role of the vinylogation of the coumarin moiety and on the position of the double bond in the new probes, substrates **RBM13**, **RBM77** and **RBM148** were modeled in the form of external aldimines **20a–c** (Figure 2A) bound to the hS1PL (PDB 4Q6R) active site. In all cases, the reactive C3–OH group can establish hydrogen bond interactions with the phosphate group of the PLP cofactor and with the ϵ -NH of the imidazole side chain of His242. For **RBM13**, the modeled structure shows that the coumarin unit is placed in a hydrophobic patch formed by residues L173, H174, F290, W382 and Y387 (Figure 2B).

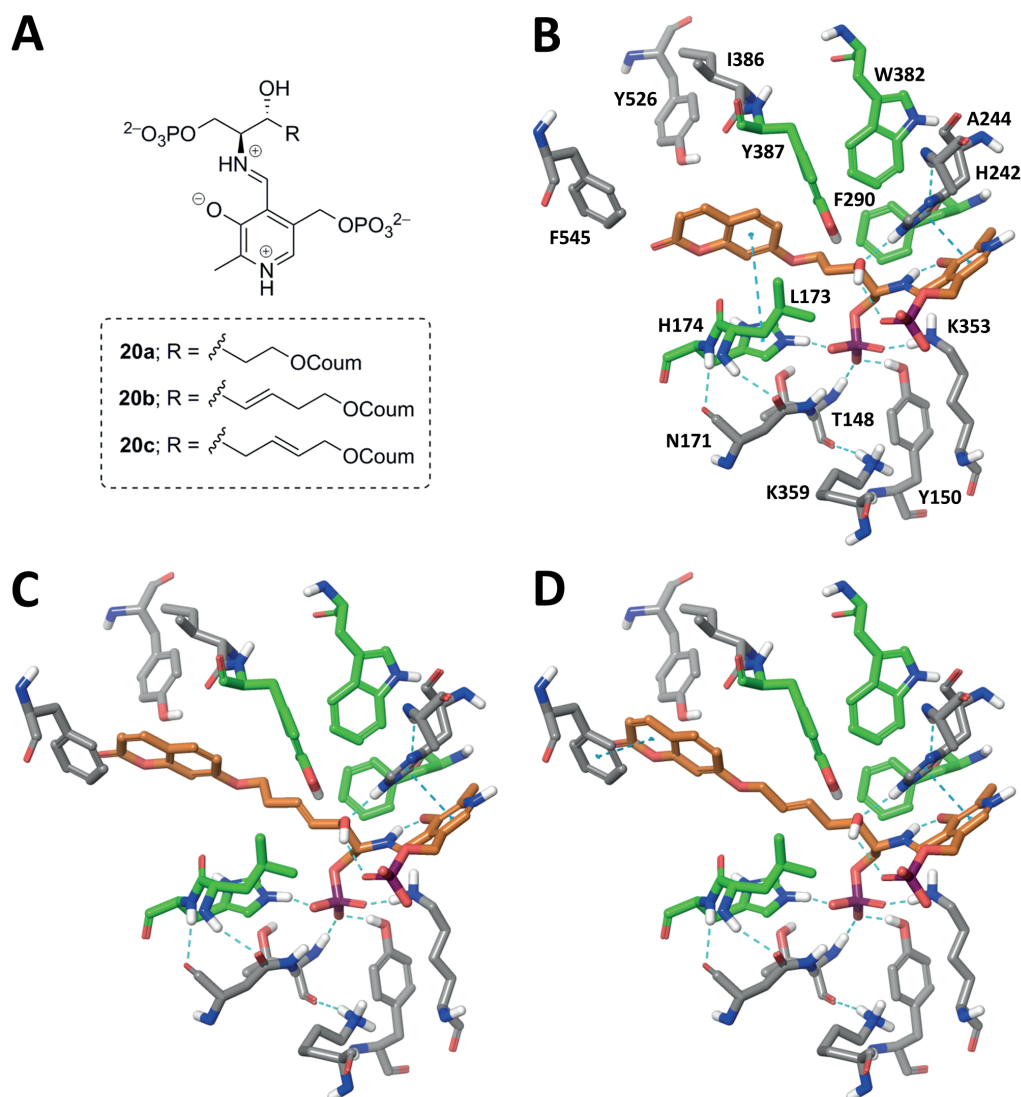


Figure 2. (A) Structures of modelled aldimines **20a–c**. (B–D) Complexes of aldimines **20a–c** (orange) bound into the active site of hS1PL. Residues forming a hydrophobic patch close to the PLP-binding site are highlighted in green.

Similarly, the structures for the enzyme-bound aldimines **20b** and **20c** show the ω -coumarin group placed even further away from the reactive site, interacting not only with some of the residues of the above mentioned hydrophobic patch, but also with some residues that are closer to the entrance to the active site, such as I386, Y526 and F545 (Figures 2C and 2D).

Comparison of the spatial arrangement of aldimines **20b** and **20c** revealed that the position of the double bond does not have a significant influence in the disposition of both the linker and the coumarin group. However, the possibility that the different position of the double bond in **RBM77** and **RBM148**, or its absence in **RBM13**, could affect some steps of the enzymatic cycle, for example by modifying the acidity of the reactive C3–OH group, could not be disregarded. To further assess the plausibility of such structures, the modelled bound aldimines were used as starting point to run molecular dynamics simulations in explicit water (50 ns, 300 K, periodic boundary conditions, NPT ensemble; complete details in Supporting Information). Figure 3 illustrates the results obtained for aldimine **20c**. The simulations showed that the structures were mostly stable after an initial slight rearrangement of the whole protein, with an RMSD around 1.4 Å relative to the starting structure (Figures 3, S1 and S2).

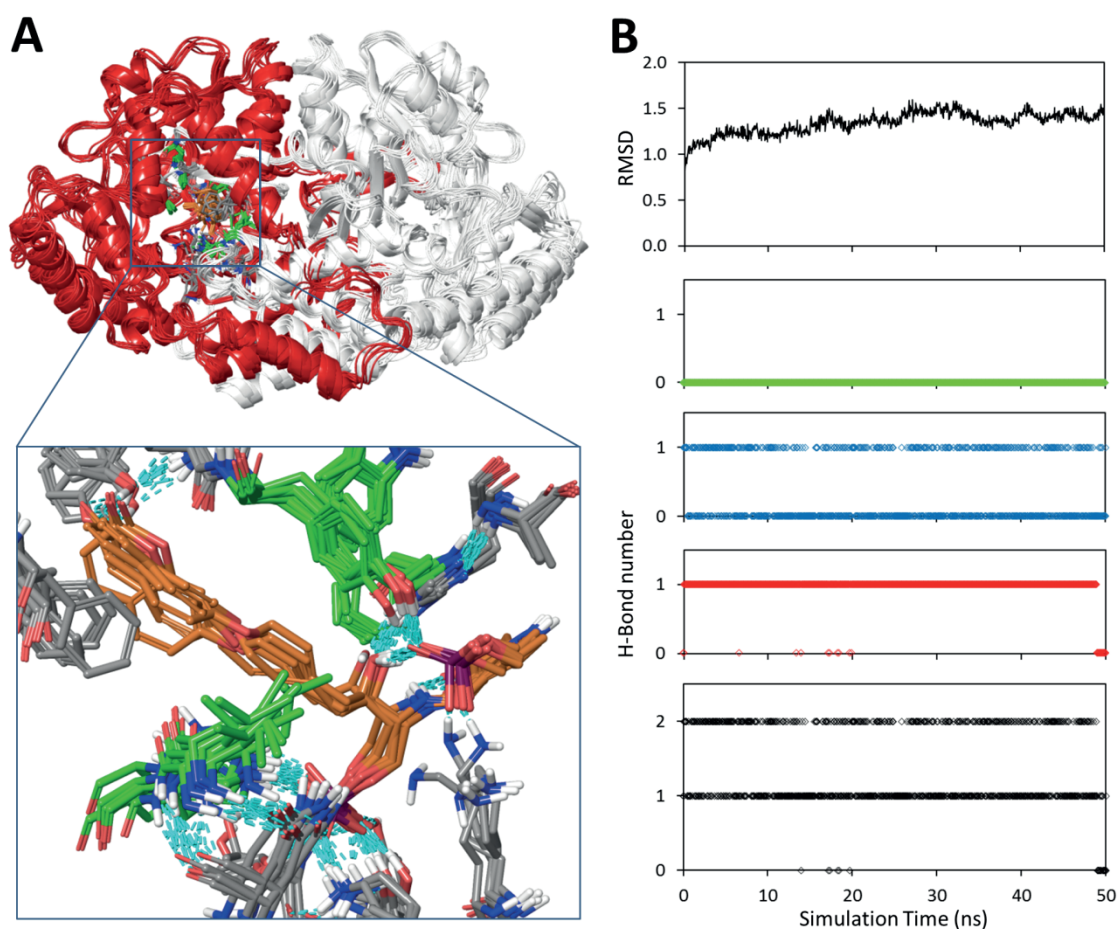


Figure 3. (A) Snapshots from the 50 ns MD simulation of the complex between aldimine **20c** (orange) and hS1PL (gray, residues forming a hydrophobic patch close to the PLP-binding site are highlighted in green). (B) RMSD plot and time dependence of the number of hydrogen bond interactions between the C3–OH of aldimine **20c** and the rest of the protein (black), the PLP phosphate group (red), His242 (blue) or Tyr387 (green).

Analysis of the hydrogen–bond interactions established by aldimine **20c** showed that the hydrogen bond between the C3–OH and the PLP–phosphate was kept for more than 95 % of the simulation time whilst that between the C3–OH and His242 was established only intermittently (Figure 3B). Similar results were obtained with the complexes from aldimines **20a** and **20b**

(Figures S1 and S2), although in those cases an additional intermittent hydrogen bond interaction with Tyr387 was also observed. Thus, these simulations would suggest that the PLP-phosphate group could be the base responsible for the C3–OH deprotonation that is previous to the C–C bond cleavage in the enzymatic cycle. The only other candidate base that apparently is close enough to the reactive C3–OH would be His242. However, this seems less likely, since the crystal structure of hS1PL shows that the δ -N of its imidazole ring accepts a hydrogen bond from the backbone amide of Ala244, thus forcing the ϵ -N-atom to be protonated and becoming unable to act as acceptor of another proton. Instead, as observed in our simulations, the ϵ -NH of the imidazole is suitable to act as a hydrogen-bond donor if an acceptor group is placed appropriately, such as the C3–OH present in aldimines **20a-c**. Therefore, it seems reasonable to propose that the hydrogen-bond interaction between His242 and the C3–OH of the substrate, as well as that formed with Tyr387, could serve to increase the acidity of this reactive OH, thus promoting the cleavage of the C–C bond and the concerted release of the corresponding aldehyde, both essential steps of the catalytic cycle of S1PL.

Validation of the probes as hS1PL substrates in cell lysates

Probes **RBM77** and **RBM148** were tested as S1PL substrates in cell lysates and compared with **RBM13**. HEK293T cells overexpressing mouse S1PL were obtained by transfection with a plasmid harbouring the mouse *Sgpl1* gene. As with recombinant hS1PL, probes **RBM77** and **RBM148** behaved as better substrates than **RBM13** in this cell system, as evidenced by their higher fluorescence signal, relative to the background (cells treated only with the transfection reagent lipofectamine 2000[®] (Figure 4A).

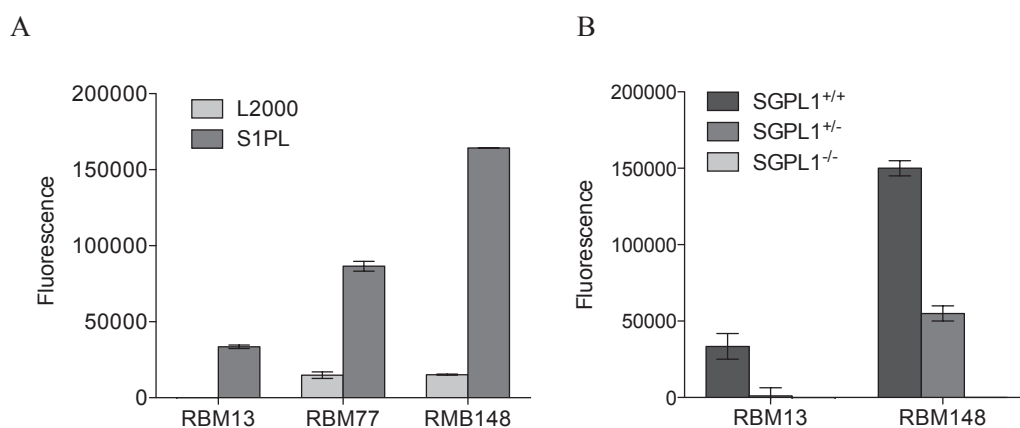


Figure 4. (A) S1PL activity in HEK293T cell lysates. S1PL activity was measured in HEK293T overexpressing S1PL lysates using **RBM13**, **RBM77** and **RBM148** as a fluorogenic substrate at a final concentration of 125 μ M. Data are the average \pm SD of two experiments with triplicates; (B) S1PL activity in cell lysates. S1PL activity was measured in SGPL1^{+/+}, SGPL1^{+/-} and SGPL1^{-/-} MEF lysates using **RBM13**, and **RBM148** as a fluorogenic substrate at a final concentration of 125 μ M. Data are the average \pm SD of two experiments with triplicates.

In terms of sensitivity, **RBM148** proved the best S1PL substrate and the most reliable alternative to **RBM13** for the quantification of the enzyme activity in cell lysates. Despite **RBM77** showed better kinetic parameters in hS1PL (see Table 1), the strongly basic conditions

required for the release of the umbelliferone reporter (see above) led to a noticeable decrease of its fluorescence. These results were corroborated in cell lysates from homozygous ($SGPL1^{-/-}$) and heterozygous ($SGPL1^{+/-}$) *Sgpl1* null and wild type ($SGPL1^{+/+}$) MEF cells. As expected, **RBM148** was superior to **RBM13** as fluorescent reporter in the $SGPL1^{+/+}$ and $SGPL1^{+/-}$ cell lines (Figure 4B).

Liposome formulations for the delivery of RBM probes in intact cells

The polar nature of our RBM probes prevents their proper permeability through the cell membranes and, hence, their applicability as reporters in intact cell studies. In order to circumvent this drawback, we reasoned that their encapsulation into cationic liposomes could be a suitable alternative. Cationic liposomes were formulated as a 1:1 mixture of phosphatidyl choline (PC) and *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethyl ammonium methyl sulfate (DOTAP) (see Supporting for complete characterization).

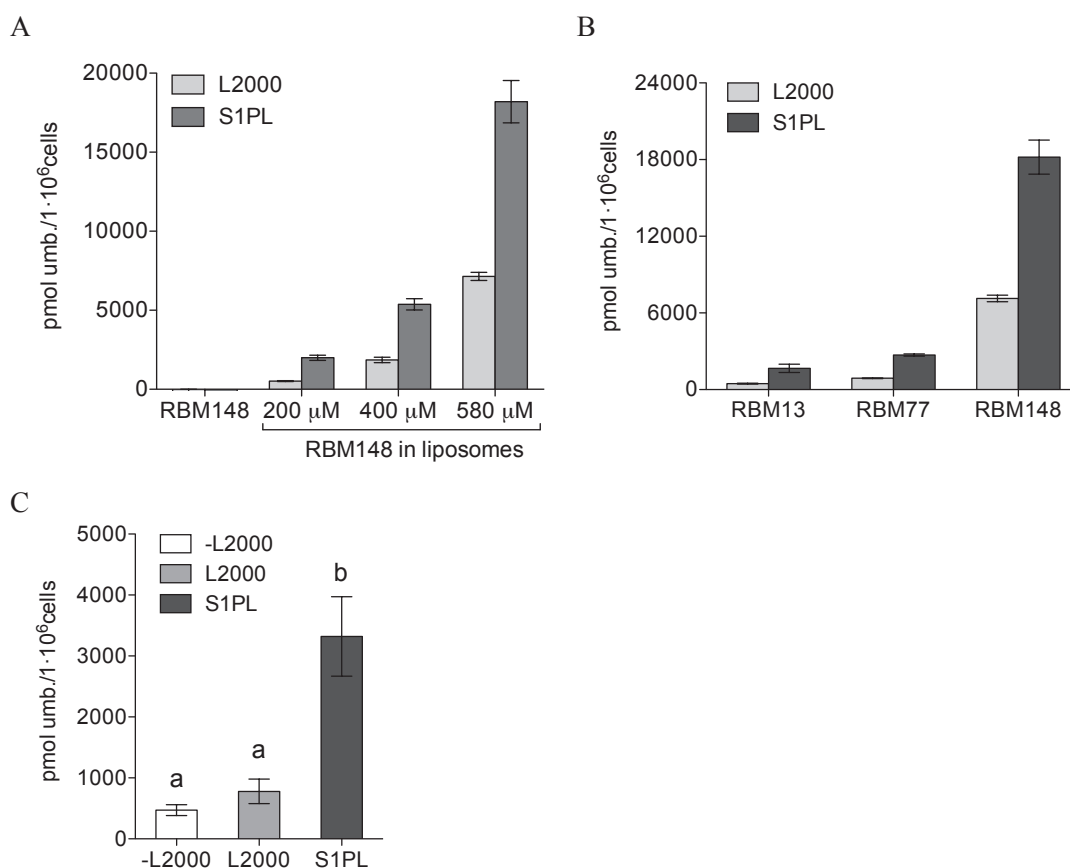


Figure 5. S1PL activity in intact cells using RBM148 encapsulated in liposomes. The amount (pmol) of umbelliferone released from RBM148 was measured after 3 h incubation. (A) HEK293T overexpressing S1PL were incubated with different dilutions of RBM148 liposomes. Non-encapsulated RBM148 at 200 μ M was also tested. (B) Comparison between S1PL probes encapsulated in liposomes at 580 μ M. (C) Amounts of umbelliferone released in non-transfected (L2000) and S1PL overexpressing (SPL) HEK293T cells incubated with 200 μ M RBM148 encapsulated in liposomes. -L2000, cells used as a control without lipofectamine 2000[®]. Data in A are the average \pm SD of three experiments with duplicates. Data in both B and C are the average \pm SD of two experiments with duplicates. Data in C were analyzed by one way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each denote statistical significance ($P < 0.05$).

Mouse S1PL overexpressing HEK293T cells were initially used for preliminary studies with encapsulated **RBM13** in different liposome formulations after a preliminary evaluation of cell viability in the cell lines used in this study (Figure S7). The resulting fluorescence was dependent on the liposome and substrate concentrations and, as expected, it was higher in cells overexpressing S1PL in comparison with cells only treated with the transfection agent lipofectamine 2000[®] (Figure S8). On the other hand, liposome formulations of **RBM77** showed a substantial increase of the released umbelliferone in S1PL overexpressing HEK293T cells in comparison with encapsulated **RBM13** (Figures S8 and S9). However, the need of KOH/ethanol solutions to promote the retro Michael elimination of the expected S1PL aldehyde product **83** (see above), turned out to be a serious drawback for the use of this substrate in intact cells, since the strongly required basic conditions disturbed the cell stability and did not allow an optimum fluorescence readout. Despite the use of the Gly/NaOH buffer allowed the quantification of the released umbelliferone (see Figure S9), the maximum fluorescence could not be achieved. In agreement with the observed higher reactivity of the elusive aldehyde **83b** arising from **RBM148** (see above), the use of Gly/NaOH buffer allowed the release of umbelliferone when encapsulated **RBM148** was used as S1PL activity reporter in S1PL overexpressing HEK293T cells using liposome formulations (Figure 5A). In comparison with **RBM13** and **RBM77**, probe **RBM148** proved superior in terms of sensitivity (Figure 5B). To confirm that the improvement in substrate permeability was not due to the transfection agent Lipofectamine 2000[®] (L2000), a control experiment (-L2000) was compared with a blank experiment using Lipofectamine 2000[®] in non-transfected cells (L2000). In both cases, comparable fluorescence was observed (Figure 5C).

The efficiency of **RBM148** as substrate in non-overexpressing S1PL cells was tested in the above SGPL1^{+/+}, SGPL1^{+/-} and SGPL1^{-/-} MEF intact cells. As shown in Figure 6, the released umbelliferone was higher in the wild types (SGPL1^{+/+}) than in the knockouts, with the heterozygous producing more fluorescence than the homozygous *Sgpl1*-null cells. As expected, S1PL activity was dependent on the substrate encapsulated in liposome concentration and it was higher in SGPL1^{+/+} than in SGPL1^{+/-} cells, with no S1PL activity in SGPL1^{-/-} cells.

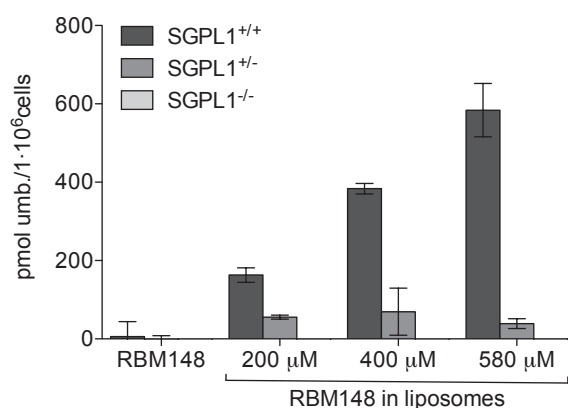


Figure 6. S1PL activity in intact cells using RBM148 encapsulated in liposomes. SGPL1^{+/+}, SGPL1^{+/-} and SGPL1^{-/-} cells were incubated for 3 h with different dilutions of RBM148 liposomes. Non-encapsulated RBM148 at 200 μM was also tested. The amount (pmol) of umbelliferone released from RBM148 was measured. Data are the average ± SD of two experiments with duplicates.

The suitability of liposome formulations of **RBM148** for the evaluation of S1PL inhibitors in intact cells was confirmed in S1PL overexpressing HEK293T cells using the reported inhibitor **3c**^[8] as reference. At 10 μM of **3c**, 580 μM of **RBM148** encapsulated in liposomes gave the best results in terms of sensitivity (Figure 7). Likewise, an IC_{50} of 5.27 μM for the reported hS1PL inhibitor **3c** in SGPL1^{+/+} cells was also determined in this assay (Figure S10).

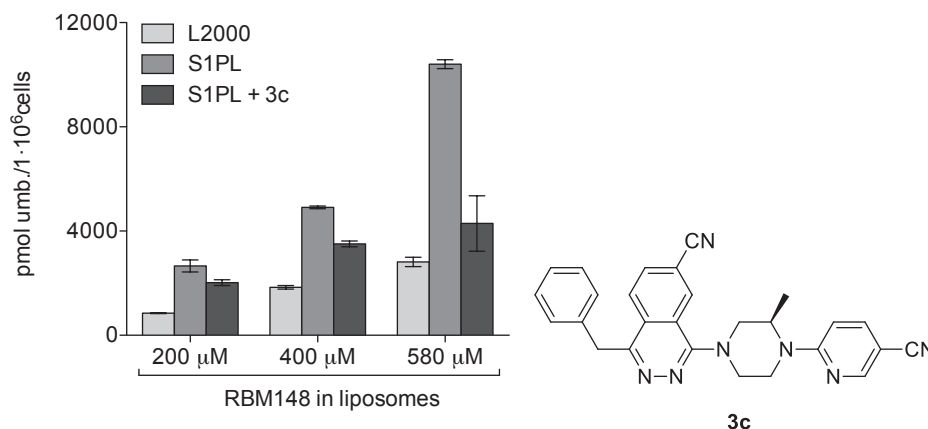


Figure 7. S1PL inhibition by compound **3c** in intact cells using a liposome formulation of **RBM148**. S1PL-overexpressing HEK293T cells were incubated for 15 min with **3c** (10 μM) followed by a 3 h treatment with encapsulated **RBM148** at different concentrations. The amount (pmols/ 10^6 cells) of released umbelliferone was measured. Data are the average \pm SD of two experiment with triplicates.

CONCLUSIONS

In summary, fluorogenic probes **RBM77** and **RBM148** have been developed for the quantification of S1PL activity. Their design has been inspired in the application of the principle of vinylogy from our previously reported probe **RBM13**. The new probes are superior to **RBM13** in terms of kinetic parameters and sensitivity using cell lysates as enzyme source. Interestingly, by encapsulation into cationic liposomes, probe **RBM148** can be used to the determination of S1PL activity in intact cells, which widens the scope of applicability of this new probe.

ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to Prof. Andreas Billich (Novartis) for a generous gift of recombinant hS1PL and inhibitor **3c**. We are also grateful to Prof. Paul Van Veldhoven for providing MEF cells. Partial financial support from the “Ministerio de Ciencia e Innovación”, Spain (Project CTQ2014-54743-R is acknowledged). The authors also want to thank “Fundació La Marató deTV3” for financial support through Projects 20112130 and 20112132.

EXPERIMENTAL

Chemistry

Unless otherwise stated, reactions were carried out under argon atmosphere. Dry solvents were obtained by passing through an activated alumina column on a Solvent Purification System (SPS). Methanol and ethanol were dried over CaH₂ and distilled prior to use. Commercially available reagents and solvents were used with no further purification. All reactions were monitored by TLC analysis using ALUGRAM[®] SIL G/UV₂₅₄ precoated aluminum sheets (Machery–Nagel). UV light was used as the visualizing agent and a 5% (w/v) ethanolic solution of phosphomolybdic acid as the developing agent. Flash column chromatography was carried out with the indicated solvents using flash–grade silica gel (37–70 μm). Yields refer to chromatographically and spectroscopically pure compounds, unless otherwise stated.

NMR spectra were recorded at room temperature on a Varian Mercury 400 instrument. The chemical shifts (δ) are reported in ppm relative to the solvent signal, and coupling constants (*J*) are reported in Hertz (Hz). ³¹P chemical shifts are relative to a 85 % H₃PO₄ external reference (0 ppm). The following abbreviations are used to define the multiplicities in ¹H NMR spectra: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, dd = doublet of doublets, ddd = doublet of doublet of doublets, m = multiplet, br = broad signal and app = apparent. High Resolution Mass Spectrometry analyses were carried out on an Acquity UPLC system coupled to a LCT Premier orthogonal accelerated time–of–flight mass spectrometer (Waters) using electrospray ionization (ESI) technique. Optical rotations were measured at room temperature on a Perkin Elmer 341 polarimeter.

General procedure 1: Ru–catalyzed olefin cross metathesis reactions

To a stirred solution of the starting olefins (1.5 and 6 mmol, respectively) in degassed CH₂Cl₂ (20 mL), Grubbs catalyst 2nd generation (0.03 equiv/mol) was added portionwise at rt. The resulting mixture was refluxed in the dark for 2 h, cooled down to rt and concentrated *in vacuo* to afford a crude, which was purified as indicated for each compound.

General procedure 2: Regioselective phosphorylation of 1,3–diols

A solution of the starting diol (0.5 mmol) in CH₂Cl₂ (15 mL) at 0 °C was treated successively with *N*–methylimidazole (1.5 equiv/mol) and dimethyl chlorophosphate (1.2 equiv/mol). The reaction mixture was stirred at rt for 1 h, cooled down to 0 °C and quenched by the dropwise addition of saturated aqueous NH₄Cl (10 mL). The resulting mixture was extracted with CH₂Cl₂ (3 x 15 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2 x 20 mL), dried over anhydrous MgSO₄ and filtered. Evaporation of the solvent afforded a crude mixture, which was purified as indicated for each compound.

General procedure 3: TMSBr–mediated deprotection of dimethyl phosphates and *N*–Boc amino groups.

To an ice cooled solution of the starting dimethyl phosphate (0.2 mmol) in dry CH₃CN (8 mL), was added dropwise TMSBr (5 equiv/mol). After stirring for 3 h at rt, the reaction mixture was

concentrated under reduced pressure. The residue was then redissolved in MeOH/H₂O (95:5, same reaction volume) and stirred for an additional hour at rt. Evaporation of the solvent afforded a crude mixture, which was purified as indicated for each compound.

General procedure 4: fluoride-mediated deprotection of TBS groups

To a solution of the corresponding TBS-protected alcohol (1 mmol) in THF (10 mL) was added dropwise TBAF (1 M in THF, 2 equiv/mol) at 0 °C. After stirring at the same temperature for 30 min, the reaction was quenched with saturated aqueous NH₄Cl (10 mL) and the resulting mixture was extracted with Et₂O (3 x 15 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 20 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and evaporated to give the crude products. Purification by flash chromatography on silica gel (from 0 to 3 % MeOH in CH₂Cl₂) afforded the required alcohols.

(S)-tert-butyl (1-(tert-butyldimethylsilyloxy)-3-oxopent-4-en-2-yl)carbamate (71)

Vinylmagnesium bromide (82.8 mL, 57.9 mmol, 0.70 M in THF) was added dropwise to a solution of **70** [17] (6.0 g, 16.6 mmol) in THF (50 mL) at 0 °C. After stirring at rt for 1 h, the reaction mixture was added dropwise *via* canula to a 1 M aq. solution of HCl (50 mL) at 0 °C and the resulting mixture was extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layers were combined, washed with brine (2 x 50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered and concentrated *in vacuo* to give the crude product. Flash chromatography (from 0 to 5 % EtOAc in hexane) gave **71** (3.85 g, 71 %) as a colourless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +62.2$ (*c* 1.0, CHCl₃) [lit.^[17] $[\alpha]_{\text{D}}^{24} = +63.3$ (*c* 0.62, CHCl₃)]. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 6.56 (dd, *J* = 17.5, 10.6 Hz, 1H), 6.35 (dd, *J* = 17.4, 1.3 Hz, 1H), 5.83 (d, *J* = 10.6 Hz, 1H), 5.52 (br d, *J* = 7.0 Hz, 1H), 4.60 (dt, *J* = 7.6, 3.9 Hz, 1H), 4.01 (dd, *J* = 10.3, 3.3 Hz, 1H), 3.85 (dd, *J* = 10.3, 4.4 Hz, 1H), 1.45 (s, 9H), 0.84 (s, 9H), 0.01 (s, 3H), 0.00 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 197.0, 155.4, 133.3, 129.5, 79.9, 63.6, 59.7, 28.5, 25.9, 18.3, -5.5, -5.5. HRMS calcd. for C₁₆H₃₁NO₄SiNa ([M + Na]⁺): 352.1920, found: 352.1937.

tert-butyl ((2S,3R)-1-((tert-butyldimethylsilyloxy)-3-hydroxypent-4-en-2-yl) carbamate (72)

A solution of **71** (1.01 g, 3.08 mmol) in ethanol (12 mL) was added dropwise to a suspension of lithium tri-*tert*-butoxyaluminum hydride (1.72 g, 6.78 mmol) in ethanol (30 mL) at -78 °C. After stirring at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was allowed to warm to 0 °C and was quenched with 10 % (w/v) aqueous citric acid (20 mL). The resulting mixture was extracted with EtOAc (3 x 50 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2 x 50 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and concentrated *in vacuo* to give a 98:2 *anti/syn* crude mixture of diastereomers. Flash chromatography of the residue (from 0 to 11 % EtOAc in hexane) gave pure *anti*-**72** (922 mg, 90 %) as a colourless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +28.1$ (*c* 1.0, CHCl₃) [lit.^[17] $[\alpha]_{\text{D}}^{23} = +24.8$ (*c* 1.45, CHCl₃)]. ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 5.93 (ddd, *J* = 17.2, 10.6, 4.9 Hz, 1H), 5.39 (dt, *J* = 17.2, 1.7 Hz, 1H), 5.32 – 5.19 (m, 2H), 4.27 (s, 1H), 3.93 (dd, *J* = 10.4, 2.9 Hz, 1H), 3.76 (dd, *J* = 10.3, 2.6 Hz, 1H), 3.63 (dd, *J* = 7.3, 3.5 Hz, 2H), 3.44 (br s, 1H), 1.45 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.07 (s, 3H), 0.07 (s, 3H). ¹³C NMR

(101 MHz, CDCl₃) δ 156.0, 138.0, 116.0, 79.7, 75.0, 63.6, 54.2, 28.5, 25.9, 18.3, -5.5, -5.5. HRMS calcd. for C₁₆H₃₄NO₄Si ([M + H]⁺): 332.2257, found: 332.2267.

***tert*-butyl ((2*S*,3*R*,*E*)-1-((dimethoxyphosphoryl)oxy)-3-hydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-4-en-2-yl)carbamate (76)**

Compound **76** (colorless oil, 105 mg, 69 %) was obtained from alcohol **79** (120 mg, 0.30 mmol), *N*-methylimidazole (35 μ L, 0.44 mmol) and dimethyl chlorophosphate (38 μ L, 0.36 mmol), according to general procedure 2. The title compound was purified by flash chromatography on silica gel (from 0 to 100 % EtOAc in hexane).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +6.4$ (*c* 0.9, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.87 – 6.77 (m, 2H), 6.24 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.91 – 5.81 (m, 1H), 5.70 (dd, *J* = 15.5, 6.4 Hz, 1H), 5.09 (br d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 4.35 (ddd, *J* = 10.8, 8.2, 4.7 Hz, 1H), 4.20 (t, *J* = 6.3 Hz, 1H), 4.16 – 4.08 (m, 1H), 4.05 (t, *J* = 6.5 Hz, 2H), 3.88 – 3.73 (m, 7H), 2.62 – 2.53 (m, 2H), 1.42 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 162.2, 161.33, 156.0, 155.8, 143.5, 132.0, 128.9, 113.2, 113.0, 112.7, 101.5, 80.0, 72.2, 67.8, 66.7 (d, *J*_{C-P} = 5.7 Hz), 55.0 (br d, *J*_{C-P} = 4.4 Hz), 54.7 (d, *J*_{C-P} = 5.9 Hz), 32.1, 28.5. ³¹P NMR (162 MHz, CDCl₃) δ 2.65. HRMS calcd. for C₂₃H₃₂NO₁₀NaP ([M + Na]⁺): 536.1662, found: 536.1670.

(2*S*,3*R*,*E*)-2-ammonio-3-hydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-4-en-1-yl hydrogen phosphate (RBM77)

Compound **RBM77** (white solid, 49 mg, 85 %) was obtained from dimethyl phosphate **76** (77 mg, 0.15 mmol) and TMSBr (99 μ L, 0.75 mmol), according to general procedure 3. The crude reaction mixture was dissolved in methanol and loaded on an Amberlite[®] XAD4 column (10 g), which had been washed thoroughly with acetone and then equilibrated with water. Elution with a linear gradient from 0 to 50 % CH₃CN in H₂O provided pure **RBM77**.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +14.7$ (*c* 0.7, DMSO). ¹H NMR (400 MHz, CD₃OD) δ 7.88 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.54 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.99 – 6.89 (m, 2H), 6.25 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.06 – 5.93 (m, 1H), 5.68 (dd, *J* = 15.4, 6.6 Hz, 1H), 4.34 (t, *J* = 5.6 Hz, 1H), 4.20 – 4.07 (m, 3H), 4.00 (dt, *J* = 11.8, 7.9 Hz, 1H), 3.43 – 3.36 (m, 1H), 2.67 – 2.58 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, DMSO-*d*₆) δ 161.6, 160.3, 155.4, 144.3, 131.0, 129.5, 128.4, 112.7, 112.4, 112.3, 101.1, 69.0, 67.5, 61.5 (br d, *J*_{C-P} = 2.7 Hz), 56.2 (br d, *J*_{C-P} = 2.7 Hz), 31.3. ³¹P NMR (162 MHz, DMSO-*d*₆) δ 1.84. HRMS calcd. for C₁₆H₂₁NO₈P ([M + H]⁺): 386.1005, found: 386.0997.

***tert*-butyl ((2*S*,3*R*,*E*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-4-en-2-yl)carbamate (78)**

Compound **78** (inseparable 94:6 *E/Z* mixture, colourless oil, 860 mg, 63 %) was obtained from **72** (875 mg, 2.64 mmol), **69**^[15] (2.28 g, 10.6 mmol) and Grubbs catalyst 2nd generation (67 mg, 0.08 mmol), according to general procedure 1. The title compound was purified by flash chromatography on silica gel (from 0 to 1 % CH₃OH in CH₂Cl₂). Early-eluting fractions were collected to give a sample of pure *E*-alkene, from which the following data were acquired.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +11.1$ (*c* 1.0, CHCl₃) ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.85 – 6.76 (m, 2H), 6.25 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.92 – 5.81 (m, 1H), 5.71 (dd, *J* =

15.4, 5.4 Hz, 1H), 5.24 (br d, $J = 8.2$ Hz, 1H), 4.29 – 4.22 (m, 1H), 4.06 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 3.94 (dd, $J = 10.4, 2.9$ Hz, 1H), 3.80 – 3.70 (m, 1H), 3.65 – 3.55 (m, 1H), 2.60 (app q, $J = 6.6$ Hz, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.88 (s, 9H), 0.06 (s, 3H), 0.05 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.2, 161.3, 156.0, 155.9, 143.5, 132.9, 128.9, 127.5, 113.2, 113.0, 112.7, 101.5, 79.7, 74.5, 67.8, 63.5, 54.5, 32.1, 28.5, 25.9, 18.2, –5.5, –5.5. HRMS calcd. for $\text{C}_{27}\text{H}_{41}\text{NO}_7\text{NaSi}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 542.2550, found: 542.2557.

***tert*-butyl ((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-4-en-2-yl) carbamate (79)**

Diol **79** (colorless oil, 345 mg, 95 %) was obtained from **78** (465 mg, 0.90 mmol) and TBAF (1.79 mL, 1.79 mmol), according to general procedure 4.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = -3.6$ (c 1.0, CHCl_3). ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.63 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.36 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.86 – 6.76 (m, 2H), 6.25 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 5.94 – 5.83 (m, 1H), 5.74 (dd, $J = 15.5, 6.0$ Hz, 1H), 5.33 (br d, $J = 7.2$ Hz, 1H), 4.40 – 4.35 (m, 1H), 4.07 (t, $J = 6.4$ Hz, 2H), 3.94 (dd, $J = 11.4, 3.5$ Hz, 1H), 3.73 (dd, $J = 11.4, 3.7$ Hz, 1H), 3.65 (br s, 1H), 2.65 – 2.55 (m, 1H), 1.45 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 162.1, 161.5, 156.4, 155.9, 143.6, 132.6, 128.9, 128.3, 113.1, 113.1, 112.7, 101.5, 80.0, 74.4, 67.8, 62.5, 55.4, 32.1, 28.5. HRMS calcd. for $\text{C}_{21}\text{H}_{27}\text{NO}_7\text{Na}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 428.1685, found: 428.1691.

***tert*-butyl ((2*S*,3*R*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyl)oxy)-3-hydroxyhex-5-en-2-yl) carbamate (135)**

Allylmagnesium chloride (6.9 mL, 13.8 mmol, 2.0 M in THF) was added dropwise to a solution of **70** (2.50 g, 6.90 mmol) in THF (30 mL) at -20 °C. The reaction mixture was allowed to warm to 0 °C over 5 h with stirring and was then quenched with saturated aqueous NH_4Cl (25 mL). The resulting mixture was extracted with EtOAc (3 x 50 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2 x 50 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated under reduced pressure. The resulting residue, containing crude **117**, was dissolved in ethanol (15 mL) and was added dropwise to a suspension of lithium tri-*tert*-butoxyaluminum hydride (3.86 g, 15.2 mmol) in ethanol (60 mL) at -78 °C. After stirring at the same temperature for 30 min, the reaction mixture was allowed to warm to 0 °C and was quenched with 10 % (w/v) aqueous citric acid (40 mL). The resulting mixture was carefully concentrated under reduced pressure and then extracted with EtOAc (3 x 50 mL). The organic layers were combined and were washed with brine (2 x 50 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered, and concentrated *in vacuo* to give a 99:1 *anti/syn* crude mixture of diastereomers. Flash chromatography of the residue (from 0 to 9 % EtOAc in hexane) gave pure *anti*-**135** (1.85 g, 78 %) as a colourless oil.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +32.6$ (c 1.0, CHCl_3) [lit.^[21] $[\alpha]_{\text{D}} = +32.2$ (c 1.32, CHCl_3)]. ^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 5.85 (ddt, $J = 17.2, 10.2, 7.0$ Hz, 1H), 5.23 (br d, $J = 7.9$ Hz, 1H), 5.19 – 5.06 (m, 2H), 3.98 (dd, $J = 10.6, 2.9$ Hz, 1H), 3.84 – 3.76 (m, 1H), 3.76 – 3.67 (m, 1H), 3.60 – 3.48 (m, 1H), 3.02 (br s, 1H), 2.42 – 2.27 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.08 (s, 6H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 155.8, 134.7, 117.9, 79.6, 73.0, 63.4, 53.8, 39.5, 28.5, 26.0, 18.3, –5.5, –5.5. HRMS calcd. for $\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{NO}_4\text{NaSi}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 368.2233, found: 368.2235.

***tert*-butyl ((2*S*,3*R*,*E*)-1-((*tert*-butyldimethylsilyloxy)-3-hydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-5-en-2-yl)carbamate (141)**

Compound **141** (93:7 *E/Z* mixture, colourless oil, 865 mg, 66 %) was obtained from **135** (868 mg, 2.51 mmol), **115**^[16] (2.03 g, 10.1 mmol) and Grubbs catalyst 2nd generation (64 mg, 0.08 mmol), according to general procedure 1. The title compound was purified by flash chromatography on silica gel (from 0 to 27 % EtOAc in hexane). Pure *E*-alkene was obtained after purification of the diastereomeric mixture by flash chromatography using the same gradient.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +16.5$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.62 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.87 – 6.78 (m, 2H), 6.24 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.00 – 5.90 (m, 1H), 5.80 (dt, *J* = 15.5, 5.8 Hz, 1H), 5.22 (br d, *J* = 8.3 Hz, 1H), 4.55 (d, *J* = 5.8 Hz, 2H), 3.97 (dd, *J* = 10.6, 2.9 Hz, 1H), 3.85 – 3.69 (m, 2H), 3.60 – 3.49 (m, 2H), 3.14 (br s, 1H), 2.46 – 2.32 (m, 2H), 1.45 (s, 9H), 0.90 (s, 9H), 0.08 (s, 6H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.9, 161.3, 155.9, 155.8, 143.5, 132.1, 128.9, 126.9, 113.2, 113.1, 112.7, 101.8, 79.7, 73.1, 69.1, 63.4, 53.9, 37.9, 28.5, 25.9, 18.3, –5.5, –5.5. HRMS calcd. for C₂₇H₄₁NO₇NaSi ([M + Na]⁺): 542.2550, found: 542.2556.

***tert*-butyl ((2*S*,3*R*,*E*)-1,3-dihydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-5-en-2-yl)carbamate (143)**

Diol **143** (colorless oil, 427 mg, 88 %) was obtained from **141** (620 mg, 1.19 mmol) and TBAF (2.39 mL, 2.39 mmol), according to general procedure 4.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.5$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.37 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.87 – 6.78 (m, 2H), 6.25 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.99 – 5.88 (m, 1H), 5.83 (dt, *J* = 15.5, 5.5 Hz, 1H), 5.31 (br d, *J* = 10.4 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 5.6 Hz, 2H), 4.01 (dd, *J* = 11.4, 3.4 Hz, 1H), 3.92 – 3.83 (m, 1H), 3.77 (dd, *J* = 11.4, 3.4 Hz, 1H), 3.61 – 3.50 (m, 1H), 2.46 – 2.33 (m, 3H), 1.45 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.9, 161.5, 156.2, 155.8, 143.7, 131.7, 128.9, 127.4, 113.3, 113.1, 112.7, 101.8, 80.0, 72.9, 69.0, 62.5, 54.8, 37.5, 28.5. HRMS calcd. for C₂₁H₂₇NO₇Na ([M + Na]⁺): 428.1685, found: 428.1682.

***tert*-butyl ((2*S*,3*R*,*E*)-1-((dimethoxyphosphoryl)oxy)-3-hydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-5-en-2-yl)carbamate (144)**

Compound **144** (colorless oil, 232 mg, 78 %) was obtained from alcohol **143** (236 mg, 0.58 mmol), *N*-methylimidazole (70 μL, 0.87 mmol) and dimethyl chlorophosphate (75 μL, 0.70 mmol), according to general procedure 2. The title compound was purified by flash chromatography on silica gel (from 0 to 100 % EtOAc in hexane).

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +14.1$ (*c* 1.0, CHCl₃). ¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.63 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.87 – 6.78 (m, 2H), 6.24 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 6.02 – 5.91 (m, 1H), 5.82 (dt, *J* = 15.5, 5.8 Hz, 1H), 5.05 (br d, *J* = 8.1 Hz, 1H), 4.56 (d, *J* = 5.7 Hz, 2H), 4.50 – 4.41 (m, 1H), 4.15 – 4.05 (m, 1H), 3.81 (d, *J* = 3.4 Hz, 3H), 3.78 (d, *J* = 3.4 Hz, 3H), 3.71 (br s, 2H), 3.34 (br s, 1H), 2.53 – 2.40 (m, 1H), 2.31 (dt, *J* = 14.1, 6.9 Hz, 1H), 1.44 (s, 9H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 161.9, 161.3, 155.9, 155.6, 143.6, 131.9, 128.9, 127.3, 113.2, 113.2, 112.7, 101.8, 80.1, 70.1, 69.1, 67.0 (d, *J*_{C-P} = 5.7 Hz), 54.8 (d, *J*_{C-P} = 6.0 Hz), 54.8 (d, *J*_{C-P} = 6.0 Hz), 54.7 (br

d, $J_{C-P} = 5.4$ Hz), 36.8, 28.5. ^{31}P NMR (162 MHz, CDCl_3) δ 2.96. HRMS calcd. for $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{NO}_{10}\text{NaP}$ ($[\text{M} + \text{Na}]^+$): 536.1662, found: 536.1660.

(2*S*,3*R*,*E*)-2-ammonio-3-hydroxy-7-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)hept-5-en-1-yl hydrogen phosphate (RBM148)

Compound **RBM148** (white solid, 45 mg, 82 %) was obtained from dimethyl phosphate **144** (73 mg, 0.14 mmol) and TMSBr (94 μL , 0.71 mmol), according to general procedure 3. The title compound was purified as described above for **RBM77**.

$[\alpha]_{\text{D}}^{20} = +4.2$ (c 1.0, DMSO). ^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ 7.89 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 7.54 (d, $J = 8.5$ Hz, 1H), 6.98 – 6.90 (m, 2H), 6.25 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 6.01 – 5.84 (m, 2H), 4.65 (d, $J = 4.9$ Hz, 2H), 4.18 (ddd, $J = 10.8, 6.9, 3.7$ Hz, 1H), 4.08 (dt, $J = 11.5, 7.9$ Hz, 1H), 3.88 (dt, $J = 9.4, 4.8$ Hz, 1H), 3.39 (dt, $J = 8.2, 3.9$ Hz, 1H), 2.45 – 2.29 (m, 2H). ^{13}C NMR (101 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 161.4, 160.3, 155.3, 144.3, 131.7, 129.5, 126.6, 112.8, 112.4, 112.3, 101.4, 68.8, 68.1, 61.4 (d, $J_{C-P} = 5.7$ Hz), 55.8 (d, $J_{C-P} = 3.4$ Hz), 35.6. ^{31}P NMR (162 MHz, $\text{DMSO}-d_6$) δ 2.08. HRMS calcd. for $\text{C}_{16}\text{H}_{21}\text{NO}_8\text{P}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 386.1005, found: 386.0994.

***In vitro* assays using recombinant hS1PL**

hS1PL (50 μL from stock solutions in a 100 mM HEPES buffer pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100, 0.01 % Pluronic F127 (Biotium), and 100 μM PLP, final concentration: 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to a mixture of **RBM77** (final concentration: 125 μM) and putative inhibitors (at the indicated concentrations) in the same buffer solution (final volume: 100 μL). The mixture was incubated at 37 °C for 1 h and the enzymatic reaction was stopped by the addition of 100 μL of KOH/EtOH (100 mM). After incubation at 37 °C for 20 min, the resulting mixture was treated with 50 μL of a 200 mM glycine-NaOH buffer, pH 10.6, and the amount of umbelliferone formed was determined on either a SpectraMax M5 (Molecular Devices) or Synergy 2 (BioTek) microplate readers ($\lambda_{\text{ex/em}} = 355/460$ nm), using a calibration curve. Using the **RBM148** as a substrate hS1PL (50 μL from stock solutions in a 100 mM HEPES buffer pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100, 0.01 % Pluronic F127 (Biotium), and 100 μM PLP, final concentration: 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) was added to a mixture of **RBM148** (final concentration: 125 μM) and putative inhibitors (at the indicated concentrations) in the same buffer solution (final volume: 100 μL). The mixture was incubated at 37 °C for 1 h and the enzymatic reaction was stopped by the addition of 50 μL of MeOH. Finally, 100 μL of a 200 mM glycine-NaOH buffer, pH 10.6, were added to the resulting solution and the mixture was incubated for 20 additional min at 37 °C in order to complete the β -elimination reaction. The amount of umbelliferone formed was determined as described for **RBM77** (see above).

V_{max} and K_{M} values were determined by measuring initial velocities at different substrate concentrations and fitting the data to the Michaelis-Menten equation in Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla). IC_{50} values were determined by plotting percent activity versus \log $[\text{I}]$ and fitting the data to the $\log(\text{inhibitor})$ vs. response equation in Prism 5 (GraphPad Software, La Jolla). In both cases, settings for curve adjustments were kept with their default values.

Cell assays

Dulbecco's modified Eagle's medium, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin solution, Hank's balanced salt solution were from Sigma. Opti-MEM and Lipofectamine 2000[®] were from Invitrogen. *N*-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-*N,N,N*-trimethylammonium methyl sulfate (DOTAP) and Lipoid S-100, whose main component (>94%) is soybean phosphatidylcholine, were from Lipoid GmbH. pCMV6 vector harboring the mouse *Sgpl1* gene was from OriGene.

Human embryonic kidney cells HEK293T and mouse embryo fibroblasts MEF were cultured at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 ng/mL each of penicillin and streptomycin.

Overexpression of *Sgpl1*

24 h before transfection, HEK29T cells were plated in 12-well plates (3x10⁵ cells per well). Then cells were transfected with 1 µg/well of pCMV6 vector harbouring the mouse *Sgpl1* gene using opti-MEM and Lipofectamine 2000[®], following the manufacturer's instructions. Test compounds were added 48 h after transfection.

Cell lysates

Cell pellets were resuspended in the appropriate volume of a 25 µM Na₃VO₄ solution in 0.2 M phosphate buffer (pH 7.4). The suspension was submitted to three cycles of a 5 s sonication (probe) at 10 watts/5 s resting on ice. The cell lysate was centrifuged at 600 g for 5 min. The supernatant was collected and protein concentration was determined as specified below.

Protein concentration determination

Protein concentrations were determined with BSA as a standard using a BCA protein determination kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

Liposome preparations

Cationic liposomes were formulated as a 1:1 mixture of phosphatidylcholine and DOTAP at 3.5 mM total lipid concentration. The lipids were dissolved and mixed in chloroform. Once the lipids were mixed in the organic solvent, the solvent was removed by rotary evaporation yielding a thin lipid film on the sides of a round bottom flask. The lipid film was thoroughly dried to remove residual organic solvent by placing the flask on a vacuum pump overnight. The film was hydrated with 1 or 2 mM HBSS solutions of the probes. Three dilutions of liposomes were made in each case to give final total lipid concentrations of 350 µM, 700 µM and 1000 µM, containing probe concentrations of 100 µM, 200 µM and 290 µM, respectively (from the initial 1 mM probe solution), and 200 µM, 400 µM and 580 µM, respectively (from the initial 2 mM probe solution). The lipid suspension was then placed on a rotatory evaporation system without vacuum and kept turning in warm water with gentle agitation. The product of hydration is a dispersion of large vesicles but with cycles of 5 min sonication smaller liposomes were obtained.

Cell viability

Cell viability was determined by cell counting. MEF *Sgpl1*^{+/+} cells were seeded in 12-well plates at a density of 2×10^5 cells per well and HEK293T cells were used after 48 h of *Sgpl1* transfection. Cells were exposed to different empty liposomes dilutions for 3h. At the end of the treatment, cells were washed with 200 μ L PBS and harvested with 200 μ L Trypsin-EDTA and 300 μ L of medium. Cells were counted using a Neubauer chamber (see Figure S7)

Measurement of liposomes size distribution

The average size and size distribution of liposomes were measured by dynamic light scattering (DLS) using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments). The measurements by DLS were performed at room temperature (see Figure S5).

Determination of encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency (EE) of liposomes was determined referring to the following equation $EE (\%) = (T-F) \times 100/T$, where T is the total probe and F is the free probe amount. Separation of liposome-incorporated and free probe was accomplished by centrifugal ultrafiltration. Liposomal suspension containing encapsulated probes as well as free probes were loaded into Amicon 3K (Millipore) centrifuge ultrafiltration units and centrifuged at 21°C for 30 min at 4500 g. An aliquot from total preparation before centrifugation and from the filtrate (after centrifugation) were collected and analyzed by UPLC-MS and the amount of RBM148 and its dephosphorylated derivate was quantified (see Figure S6)

S1PL activity

S1PL activity determination in cell lysates was done in 96-well plates at a final volume of 100 μ L/well. The reaction mixture contained per well 100 μ g of cell lysate, 125 μ M of substrate (5 μ L/well from 2.5 mM stock solution), 250 μ M of PLP (5 μ L/well from 5 mM stock solution) and up to 100 μ L of phosphate buffer. The reaction mixture was incubated at 37°C for 1 h. The enzymatic reaction was stopped with 50 μ L/well of methanol and then 100 μ L of 200 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.6) were added. After incubation at 37°C for 20 min in the dark, fluorescence was measured spectrophotometrically on a SpectraMax M5 (Molecular Devices) at excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively. The same reaction mixture without cell lysate was used as blank. Using the RBM77 as a substrate, the reaction was stopped with 100 μ L/well of 100 mM KOH-MeOH solution and the plate was incubated at 37°C for 30 min in the dark. Then 50 μ L of 200 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.6) were added and the fluorescence were measured at the same wavelenghts.

To determine S1PL activity in intact cells, $2-3 \times 10^5$ cells per well were seeded in a 12-well plate. MEF cells were incubated for 24 h at 37°C and 5% CO₂. HEK293T cells were transfected with the *Sgpl1* encoded plasmid as mentioned above. Medium was replaced by 300 μ L of HBSS to which the required volume of a 3.5 mM stock solution of the probe liposomes had been added to obtain the desired probe concentration. The plate was incubated for 3 h at 37°C and 5% CO₂. The reaction was stopped with 250 μ L/well of methanol and then 500 μ L of 200 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.6) were added. After incubation at 37°C for 30 min in the dark,

fluorescence was measured spectrophotometrically on a SpectraMax M5 (Molecular Devices) at excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively. The same reaction mixture without cells was used as blank.

REFERENCES

- [1] P. Bandhuvula, J. D. Saba, *Trends Mol. Med.* **2007**, *13*, 210–217.
- [2] J. Newton, S. Lima, M. Maceyka, S. Spiegel, *Exp. Cell Res.* **2015**, *333*, 195–200.
- [3] P. Sanllehí, J. L. Abad, J. Casas, A. Delgado, *Chem. Phys. Lipids* **2016**, *197*, 69–81.
- [4] J. T. Bagdanoff, M. S. Donoviel, A. Nouraldeen, J. Tarver, Q. Fu, M. Carlsen, T. C. Jessop, H. Zhang, J. Hazelwood, H. Nguyen, et al., *J Med Chem* **2009**, *52*, 3941–3953.
- [5] A. Billich, C. Beerli, R. Bergmann, C. Bruns, E. Loetscher, *Anal Biochem* **2013**, *434*, 247–253.
- [6] E. Loetscher, K. Schneider, C. Beerli, A. Billich, *Biochem Biophys Res Commun* **2013**, *433*, 345–348.
- [7] M. A. Argiriadi, D. Banach, E. Radziejewska, S. Marchie, J. DiMauro, J. Dinges, E. Dominguez, C. Hutchins, R. A. Judge, K. Queeney, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.02.084.
- [8] S. Weiler, N. Braendlin, C. Beerli, C. Bergsdorf, A. Schubart, H. Srinivas, B. Oberhauser, A. Billich, *J. Med. Chem.* **2014**, *57*, 5074–5084.
- [9] J. Dinges, C. M. Harris, G. A. Wallace, M. A. Argiriadi, K. L. Queeney, D. C. Perron, E. Dominguez, T. Kebede, K. E. Desino, H. Patel, et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2016**, *26*, 2297–2302.
- [10] I. Nieves, P. Sanllehí, J.-L. L. Abad, G. Fabriàs, J. Casas, A. Delgado, in *Bioact. Sphingolipids Cancer Biol. Ther.* (Eds.: Y. Hannun, C. Luberto, L. Obeid, C. Mao), Springer International Publishing, Cham, **2015**, pp. 437–469.
- [11] C. Bedia, L. Camacho, J. Casas, J. L. Abad, A. Delgado, P. R. Van Veldhoven, G. Fabrias, *ChemBioChem* **2009**, *10*, 820–822.
- [12] P. Sanllehí, J.-L. Abad, J. Casas, J. Bujons, A. Delgado, *Bioorg. Med. Chem.* **2016**, *24*, 4381–4389.
- [13] E. Reina, L. Camacho, J. Casas, P. P. Van Veldhoven, G. Fabrias, *Chem. Phys. Lipids* **2012**, *165*, 225–231.
- [14] S. Krishnamurthy, *J. Chem. Educ.* **1982**, *59*, 543–547.
- [15] J. Magolan, M. J. Coster, *J. Org. Chem.* **2009**, *74*, 5083–5086.
- [16] D. Wahler, F. Badalassi, P. Crotti, J. L. Reymond, *Angew Chem Int Ed Engl* **2001**, *40*, 4457–4460.
- [17] T. Yamamoto, H. Hasegawa, T. Hakogi, S. Katsumura, *Org Lett* **2006**, *8*, 5569–5572.
- [18] R. V Hoffman, N. Maslouh, F. Cervantes-Lee, *J. Org. Chem.* **2002**, *67*, 1045–1056.
- [19] W. Huang, J.-Y. Ma, M. Yuan, L.-F. Xu, B.-G. Wei, *Tetrahedron* **2011**, *67*, 7829–7837.
- [20] J. M. Seco, E. Quinoa, R. Riguera, *Chem Rev* **2012**, *112*, 4603–4641.
- [21] R. Fransson, A. N. Mccracken, B. Chen, R. J. Memonigle, A. L. Edinger, S. Hanessian, *ACS Med. Chem. Lett.* **2013**, *4*, 969–973.

SUPPORTING INFORMATION FOR

**Improved fluorogenic sensors for the *in vivo* quantification of
sphingosine-1-phosphate lyase activity**

Pol Sanllehí,^{1,2} Mireia Casasampere,^{1,2} José Luís Abad,¹ Gemma Fabriàs,¹ Olga López,³ Jordi Bujons,⁴
Josefina Casas,^{*1} and Antonio Delgado^{*1,2}

(1) Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), Department of Biomedical Chemistry, Jordi Girona 18-26; 08034-Barcelona, Spain

(2) University of Barcelona (UB), Faculty of Pharmacy, Department of Pharmacology, Toxicology and Medicinal Chemistry, Unit of Pharmaceutical Chemistry (Associated Unit to CSIC), Avda. Joan XXIII s/n, 08028-Barcelona, Spain.

(3) Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Group of Biophysics of Lipids and Interfaces (BLI), Department of Chemical and Surfactants Technology, Jordi Girona 18 26; 08034 Barcelona, Spain

(4) Spanish National Research Council (CSIC), Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Department of Biological Chemistry and Molecular Modelling, Jordi Girona 18-26; 08034-Barcelona, Spain.

TABLE OF CONTENTS

Synthesis of aldehyde **83**

Scheme S1

(*E*)-7-((5-hydroxypent-3-en-1-yl)oxy)-2*H*-chromen-2-one (81)

(*E*)-5-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)pent-2-enal (83)

Configurational assignment of **72** and **135**

Scheme S2

Synthesis of MPA esters.

(*R*)-(-)-MPA ester of alcohol **72** (73-*R*)

(*S*)-(+)-MPA ester of alcohol **72** (73-*S*)

(*R*)-(-)-MPA ester of alcohol **135** (137-*R*)

(*S*)-(+)-MPA ester of alcohol **135** (137-*S*)

Attempts to synthesize aldehyde **83b**

Scheme S3

Compound 116

Compound 118

Compound 134

Computational Methods

General data

Figure S1: Complex between aldimine **20a** and hS1PL

Figure S2: Complex between aldimine **20b** and hS1PL

Figure S3. Base-mediated release of umbelliferone.

Figure S4. Activity of hS1PL using **3c** and **RBM77** (A) or **RBM148**

Figure S5. Particle size distribution curves

Figure S6. **RBM148** in liposomes

Figure S7. Effect of liposomes on cell viability.

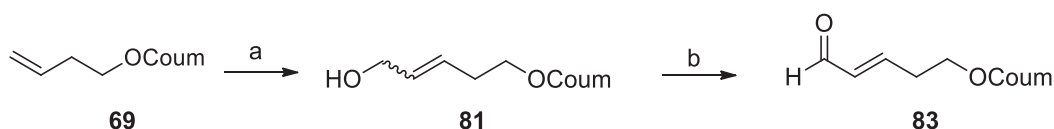
Figure S8. S1PL activity in intact cells with **RBM13** in liposomes

Figure S9. S1PL activity in intact cells with **RBM77** in liposomes

Figure S10. S1PL inhibition in intact cells with encapsulated **RBM148**

References

Synthesis of aldehyde 83



Scheme S1. Reagents and conditions: (a) allyl alcohol, Grubbs cat. 2nd gen., CH₂Cl₂, reflux (33 %, dr = 85:15 *E/Z*). (b) DMP, CH₂Cl₂, 0 °C to rt (64 %).

(*E*)-7-((5-hydroxypent-3-en-1-yl)oxy)-2*H*-chromen-2-one (81)

Compound **81** (inseparable 85:15 *E/Z* mixture, brownish oil, 114 mg, 33 %) was obtained from **69**¹ (300 mg, 1.39 mmol), allyl alcohol (377 μL, 5.55 mmol) and Grubbs catalyst 2nd generation (35 mg, 42.0 μmol), according to general procedure 1 (see main text). The title compound was obtained in 33% yield after flash chromatography (from 0 to 1.5 % MeOH in CH₂Cl₂).

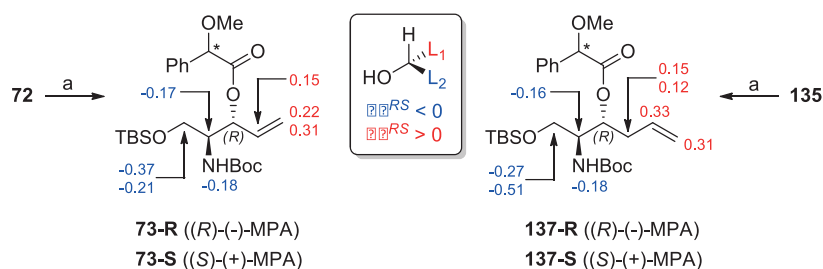
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 7.63 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.6 Hz, 1H), 6.86 – 6.76 (m, 2H), 6.24 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.87 – 5.74 (m, 2H), 4.15 (br s, 2H), 4.06 (t, *J* = 6.6 Hz, 2H), 2.66 – 2.52 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 162.2, 161.4, 156.0, 143.6, 132.2, 128.9, 127.6, 113.2, 113.1, 112.7, 101.5, 68.0, 63.5, 32.0. HRMS calcd. for C₁₄H₁₅O₄ ([M + H]⁺): 247.0970, found: 247.0961.

(*E*)-5-((2-oxo-2*H*-chromen-7-yl)oxy)pent-2-enal (83)

Dess–Martin periodinane (530 mg, 1.25 mmol) was added to a solution of allylic alcohol **81** (205 mg, 0.83 mmol) in CH₂Cl₂ (4 mL) at 0 °C. After stirring for 2 h at rt, the reaction mixture was filtered through a plug of Celite and the filtrate was evaporated to dryness. The residue was purified by flash chromatography (from 0 to 50 % EtOAc in hexane) to afford aldehyde **83** (130 mg, 64 %) as a white solid. Late-eluting fractions were independently collected to give a 95:5 *E:Z* mixture of **83**, from which the following data were acquired.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 9.57 (d, *J* = 7.8 Hz, 1H), 7.64 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.39 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.93 (dt, *J* = 15.7, 6.7 Hz, 1H), 6.88 – 6.78 (m, 2H), 6.31 – 6.21 (m, 2H), 4.20 (t, *J* = 6.1 Hz, 2H), 2.91 – 2.83 (m, 2H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 193.7, 161.7, 161.2, 156.0, 153.0, 143.4, 134.9, 129.0, 113.6, 113.0, 101.5, 66.2, 32.3. HRMS calcd. for C₁₄H₁₃O₄ ([M + H]⁺): 245.0814, found: 245.0810.

Configurational assignment of 72 and 135 through the MPA esters 73 and 137



Scheme S2. Reagents and conditions: (a) (*R*)-(-)- or (*S*)-(+)-MPA, EDC, DMAP, CH₂Cl₂, 0 °C to rt. (64 % for **73-R**; 82 % for **73-S**; 36 % for **137-R**; 68 % for **137-S**).

Synthesis of MPA esters.

DMAP (1.1 equiv/mol) was added portionwise at 0 °C to a solution of the starting alcohol (0.2 mmol) in CH₂Cl₂ (2 mL) containing (*R*)-(–)- or (*S*)-(+)-MPA (1.6 equiv/mol) and EDC (1.5 equiv/mol). After stirring for 6 h at rt, the reaction mixture was washed with saturated aq. NaHCO₃ (2 x 2 mL) and the organic phase was separated, dried over anhydrous MgSO₄, filtered and evaporated to dryness. The resulting residue was flash chromatographed on silica gel (from 0 to 8 % EtOAc in hexane) to give the corresponding MPA esters

(*R*)-(–)-MPA ester of alcohol 72 (73–R)

Compound **73–R** (colorless oil, 52 mg, 64 %) was obtained from **72** (56 mg, 0.17 mmol), (*R*)-(–)-MPA (45 mg, 0.27 mmol), EDC (49 mg, 0.25 mmol) and DMAP (23 mg, 0.19 mmol), according to the above procedure.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.46 – 7.40 (m, 2H), 7.40 – 7.29 (m, 3H), 5.82 (ddd, *J* = 17.3, 10.5, 6.8 Hz, 1H), 5.37 – 5.21 (m, 3H), 4.75 (s, 1H), 4.49 (br d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.78 – 3.69 (m, 1H), 3.43 – 3.36 (m, 4H), 3.19 (dd, *J* = 10.3, 3.5 Hz, 1H), 1.40 (s, 9H), 0.81 (s, 9H), –0.10 (s, 3H), –0.13 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.4, 155.4, 136.4, 133.3, 128.9, 128.8, 127.3, 119.3, 82.6, 79.6, 74.2, 61.2, 57.5, 53.9, 28.5, 25.9, 18.3, –5.5, –5.6. HRMS calcd. for C₂₅H₄₂NO₆Si ([M + H]⁺): 480.2781, found: 480.2782.

(*S*)-(+)-MPA ester of alcohol 72 (73–S)

Compound **73–S** (colorless oil, 72 mg, 82 %) was obtained from **72** (61 mg, 0.184 mmol), (*S*)-(+)-MPA (49 mg, 0.29 mmol), EDC (53 mg, 0.28 mmol) and DMAP (25 mg, 0.20 mmol), according to the above procedure.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.39 (m, 2H), 7.38 – 7.29 (m, 3H), 5.68 (ddd, *J* = 17.1, 10.7, 6.3 Hz, 1H), 5.39 (t, *J* = 6.5 Hz, 1H), 5.07 (d, *J* = 10.7 Hz, 1H), 4.95 (d, *J* = 17.2 Hz, 1H), 4.77 (s, 1H), 4.67 (br d, *J* = 9.4 Hz, 1H), 3.95 – 3.84 (m, 1H), 3.62 (dd, *J* = 10.3, 3.5 Hz, 1H), 3.55 (dd, *J* = 10.3, 4.6 Hz, 1H), 3.43 (s, 3H), 1.43 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.00 (s, 3H), –0.01 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.4, 155.5, 136.3, 132.5, 128.8, 128.7, 127.3, 118.9, 82.7, 79.6, 74.1, 61.8, 57.6, 53.7, 28.5, 25.9, 18.3, –5.4, –5.5. HRMS calcd. for C₂₅H₄₂NO₆Si ([M + H]⁺): 480.2781, found: 480.2762.

(*R*)-(–)-MPA ester of alcohol 135 (137–R)

Compound **137–R** (yellow oil, 38 mg, 36 %) was obtained from **135** (75 mg, 0.22 mmol), (*R*)-(–)-MPA (58 mg, 0.35 mmol), EDC (62 mg, 0.33 mmol) and DMAP (29 mg, 0.24 mmol), according to the above procedure.

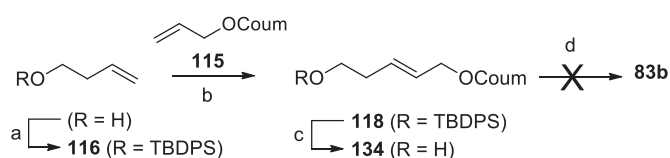
¹H NMR (400 MHz, CDCl₃) δ 7.45 – 7.38 (m, 2H), 7.38 – 7.28 (m, 3H), 5.83 – 5.69 (m, 1H), 5.09 – 4.98 (m, 3H), 4.70 (s, 1H), 4.53 (br d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 3.73 – 3.63 (m, 1H), 3.40 (s, 3H), 3.31 (dd, *J* = 10.3, 3.7 Hz, 1H), 3.06 (dd, *J* = 10.4, 3.5 Hz, 1H), 2.55 – 2.45 (m, 1H), 2.38 – 2.28 (m, 1H), 1.41 (s, 9H), 0.81 (s, 9H), –0.12 (s, 3H), –0.15 (s, 3H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃) δ 169.7, 155.5, 136.5, 133.6, 128.9, 128.8, 127.3, 118.1, 82.6, 79.6, 72.5, 61.3, 57.5, 53.5, 36.0, 28.5, 25.9, 18.3, –5.5, –5.6. HRMS calcd. for C₂₆H₄₄NO₆Si ([M + H]⁺): 494.2938, found: 494.2926.

(S)-(+)-MPA ester of alcohol **135** (**137-S**)

Compound **137-S** (yellow oil, 73 mg, 68 %) was obtained from **135** (75 mg, 0.22 mmol), (S)-(+)-MPA (58 mg, 0.35 mmol), EDC (62 mg, 0.33 mmol) and DMAP (29 mg, 0.24 mmol), according to the above procedure.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.45 – 7.37 (m, 2H), 7.37 – 7.28 (m, 3H), 5.43 (ddt, $J = 17.0, 10.2, 7.2$ Hz, 1H), 5.01 (td, $J = 7.5, 4.0$ Hz, 1H), 4.81 – 4.65 (m, 4H), 3.89 – 3.79 (m, 1H), 3.57 (d, $J = 3.6$ Hz, 2H), 3.42 (s, 3H), 2.40 – 2.31 (m, 1H), 2.26 – 2.16 (m, 1H), 1.44 (s, 9H), 0.87 (s, 9H), 0.01 (s, 3H), –0.01 (s, 3H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 170.0, 155.5, 136.4, 132.9, 128.8, 128.6, 127.4, 118.0, 82.8, 79.7, 73.1, 61.8, 57.6, 53.2, 35.4, 28.5, 26.0, 18.3, –5.4, –5.5. HRMS calcd. for $\text{C}_{26}\text{H}_{44}\text{NO}_6\text{Si}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 494.2938, found: 494.2933.

Attempts to synthesize aldehyde **83b**



Scheme S3. Reagents and conditions: (a) TBDPSCl, imidazole, DMF, rt (quant. yield). (b) **115**, Grubbs cat. 2nd gen., CH_2Cl_2 , reflux (58 %, dr = 91:9 *E/Z*). (c) TBAF, THF, 0 °C to rt (96 %). (d) DMP, CH_2Cl_2 , 0 °C to rt.

(But-3-en-1-yloxy)(tert-butyl)diphenylsilane (**116**)

A solution of 3-buten-1-ol (500 mg, 6.93 mmol) in DMF (10 mL) was treated successively with imidazole (1.04 g, 15.3 mmol) and TBDPSCl (1.98 mL, 7.63 mmol). The resulting mixture was stirred overnight at rt, diluted with Et_2O (10 mL) and poured into 1 M aqueous HCl (10 mL). The mixture was extracted with Et_2O (3 x 10 mL) and the combined organic layers were washed with brine (2 x 15 mL), dried over anhydrous MgSO_4 , filtered and evaporated *in vacuo*. Flash chromatography of the residue (from 0 to 1 % EtOAc in hexane) gave **116** (2.17 g, quant. yield) as a colorless oil.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3) δ 7.72 – 7.64 (m, 4H), 7.46 – 7.33 (m, 6H), 5.83 (ddt, $J = 17.1, 10.2, 6.9$ Hz, 1H), 5.09 – 4.99 (m, 2H), 3.71 (t, $J = 6.7$ Hz, 2H), 2.32 (qt, $J = 6.8, 1.3$ Hz, 2H), 1.05 (s, 9H). ^{13}C NMR (101 MHz, CDCl_3) δ 135.7, 135.6, 134.1, 129.7, 127.7, 116.5, 63.7, 37.4, 27.0, 19.4. HRMS calcd. for $\text{C}_{20}\text{H}_{27}\text{OSi}$ ($[\text{M} + \text{H}]^+$): 311.1831, found: 311.1834.

(E)-7-((5-((tert-butyl)diphenylsilyloxy)pent-2-en-1-yl)oxy)-2H-chromen-2-one (**118**)

Compound **118** (inseparable 91:9 *E/Z* mixture, colourless oil, 347 mg, 58 %) was obtained from **115** (250 mg, 1.24 mmol), **116** (1.54 g, 4.95 mmol) and Grubbs catalyst 2nd generation (32 mg, 0.04 mmol), according to general procedure 1 (see main text). The title compound was purified by flash chromatography on silica gel (from 0 to 16 % EtOAc in hexane). Late-eluting fractions were independently collected to give a 94:6 *E/Z* mixture of **118**, from which the following data were acquired.

^1H NMR (400 MHz, CDCl_3 , major isomer) δ 7.69 – 7.60 (m, 4H), 7.46 – 7.32 (m, 6H), 6.86 – 6.76 (m, 2H), 6.25 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H), 5.93 – 5.82 (m, 1H), 5.73 (dt, $J = 15.5, 5.9$ Hz, 1H), 4.51 (d, $J = 5.8$ Hz, 2H), 3.74 (t, $J = 6.5$ Hz, 2H), 2.42 – 2.31 (m, 2H), 1.04 (s, 9H). ^{13}C NMR (101

MHz, CDCl₃, major isomer) δ 162.0, 161.4, 156.0, 143.5, 135.7, 134.0, 133.1, 129.8, 128.9, 127.8, 125.8, 113.2, 112.7, 101.8, 69.3, 63.3, 35.8, 27.0, 19.4. HRMS calcd. for C₃₀H₃₂O₄NaSi ([M + Na]⁺): 507.1968, found: 507.1972.

(E)-7-((5-hydroxypent-2-en-1-yl)oxy)-2H-chromen-2-one (134)

To an ice cooled solution of **118** (175 mg, 0.36 mmol) in THF (3.5 mL) was added dropwise TBAF (1 M in THF, 722 μ L, 0.72 mmol). After completion of addition the ice bath was removed and the mixture was stirred for 2 h at rt. The reaction was then quenched with saturated aqueous NH₄Cl (5 mL) and the resulting mixture was extracted with Et₂O (3 x 10 mL). The combined organic layers were washed with brine (2 x 15 mL), dried over anhydrous MgSO₄, filtered, and evaporated to give the crude product. Purification by flash chromatography on silica gel (from 0 to 70 % EtOAc in hexane) afforded homoallylic alcohol **134** (85 mg, 96 %) as a colourless oil. Late-eluting fractions were independently collected to give a 98:2 *E:Z* mixture of **134**, from which the following data were acquired.

¹H NMR (400 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 7.63 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 7.36 (d, *J* = 8.5 Hz, 1H), 6.88 – 6.78 (m, 2H), 6.24 (d, *J* = 9.5 Hz, 1H), 5.95 – 5.86 (m, 1H), 5.81 (dt, *J* = 15.5, 5.6 Hz, 1H), 4.55 (dd, *J* = 5.5, 0.7 Hz, 2H), 3.72 (t, *J* = 6.3 Hz, 2H), 2.46 – 2.35 (m, 2H), 1.61 (s, 1H). ¹³C NMR (101 MHz, CDCl₃, major isomer) δ 161.9, 161.4, 155.8, 143.6, 132.4, 128.9, 126.5, 113.2, 113.0, 112.6, 101.7, 69.1, 61.7, 35.7. HRMS calcd. for C₁₄H₁₄O₄Na ([M + Na]⁺): 269.0790, found: 269.0785.

Computational Methods

General data

All the molecular modelling was carried out with the package Schrödinger Suite 2016,³ through its graphical interface Maestro.⁴ The program Macromodel⁵ with the OPLS3 force-field,⁶ a modified version of the OPLS-AA force-field,^{7,8} and GB/SA water solvation conditions⁹ were used for energy minimization. Molecular dynamics simulations were performed with the program Desmond¹⁰⁻¹³ using the OPLS3 force-field.

Coordinates of hS1PL (PDB code 4Q6R)² were obtained from the Protein Data Bank¹⁴ at Brookhaven National Laboratory. The protein X-ray structure was prepared using the Protein Preparation Wizard^{15,16} included in Maestro to remove solvent molecules, ligands and ions, adding hydrogens, setting protonation states¹⁷ and minimizing the energies. To model the aldimines, the imine bond between the essential Lys353 and the PLP cofactor was cleaved and structures **20a–c** were manually built on the resulting PLP moiety. The structures were then minimized considering the 3-hydroxypyridine and imino groups of the aldimine-bound PLP prosthetic group in their ionized state. From these, simulation systems for molecular dynamics were built using the System Builder of the Maestro-Desmond interface,¹⁸ which automatically assigns parameters to all atom. Each protein-aldimine complex was immersed in a 120 x 120 x 120 Å cubic box of TIP3P water with enough Cl⁻ anions to achieve neutrality (~52000 water molecules, ~170000 atoms in total). Systems were relaxed by minimization (initial steepest descent followed by LBFGS minimization), first with the solute restrained and then without

restrains, until a gradient threshold of $0.1 \text{ kcal mol}^{-1} \text{ \AA}^{-1}$ was reached. Then, they were heated stepwise up to 300 K with short MD runs under periodic boundary conditions (PBC) (25 ps at 0.1, 10, 100 and 300 K), and equilibrated for 2 ns at the same temperature and 1.0 bar, in the NPT ensemble.

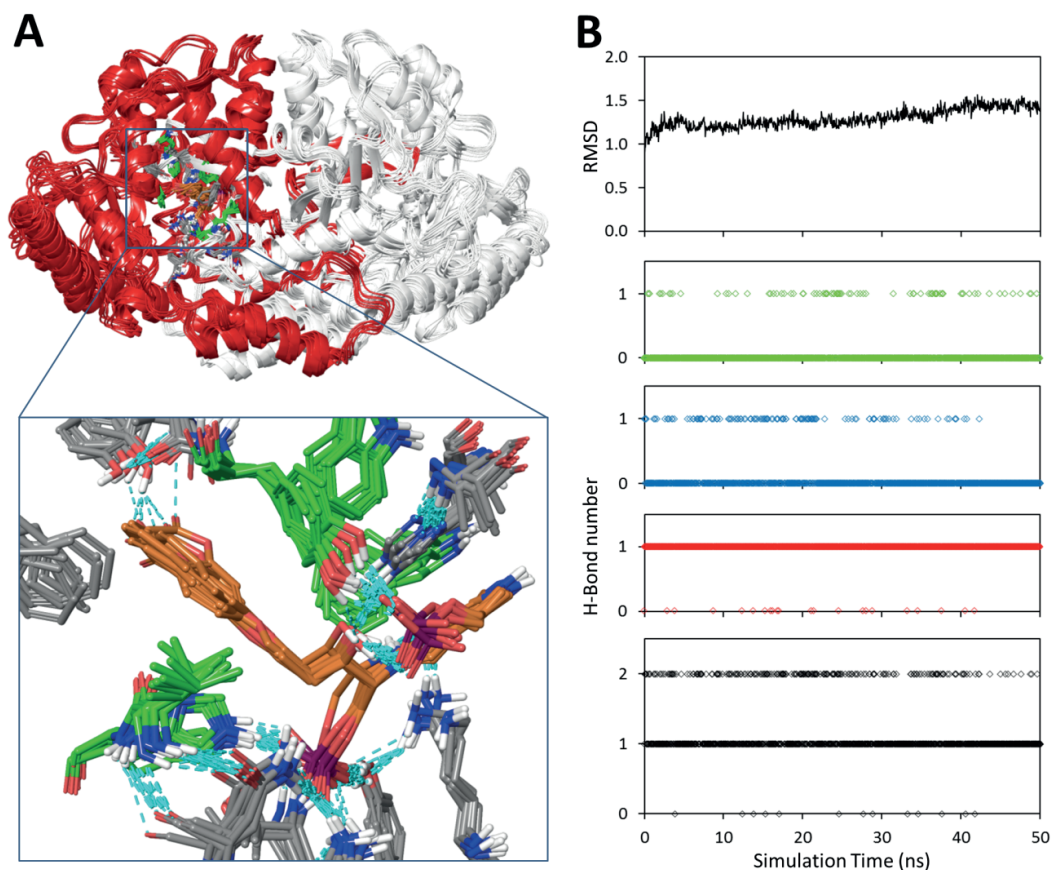


Figure S1: (A) Snapshots from the 50 ns MD simulation of the complex between aldimine **20a** (orange) and hS1PL (gray, residues forming a hydrophobic patch close to the PLP-binding site are highlighted in green). (B) RMSD plot and time dependence of the number of hydrogen bond interactions between the C3-OH of aldimine **20a** and the rest of the protein (black), the PLP phosphate group (red), His242 (blue) or Tyr387 (green).

Production MD simulations (50 ns, 2 fs timestep) were performed under the same conditions (PBC, NPT ensemble, 300 K and 1.0 bar) using the Nose-Hoover thermostat method^{19,20} with a relaxation time of 1.0 ps and the Martyna-Tobias-Klein barostat method²¹ with isotropic coupling and a relaxation time of 2 ps. Integration was carried out with the RESPA integrator²⁰ using time steps of 2.0, 2.0, and 6.0 fs for the bonded, short range and long range interactions, respectively. A cut-off of 9.0 Å was applied to van der Waals and short-range electrostatic interactions, while long-range electrostatic interactions were computed using the smooth particle mesh Ewald method with an Ewald tolerance of 10^{-9} .^{22,23} Bond lengths to hydrogen atoms were constrained using the Shake algorithm.²⁴ Coordinates were saved every 50 ps, hence 1000 snapshots were obtained from each MD run. The Simulation Event Analysis application included in the Desmond-Maestro interface was used to analyze the trajectories.

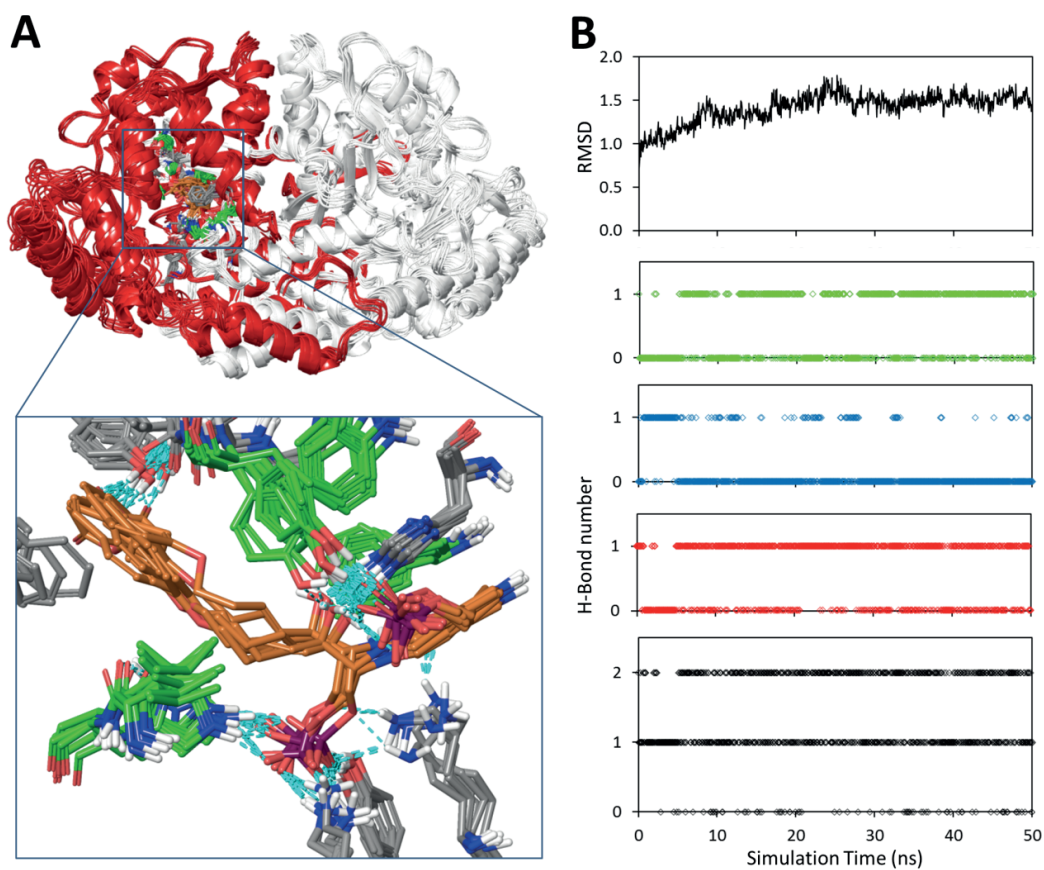


Figure S2: (A) Snapshots from the 50 ns MD simulation of the complex between aldimine **20b** (orange) and hS1PL (gray, residues forming a hydrophobic patch close to the PLP-binding site are highlighted in green). (B) RMSD plot and time dependence of the number of hydrogen bond interactions between the C3-OH of aldimine **20b** and the rest of the protein (black), the PLP phosphate group (red), His242 (blue) or Tyr387 (green).

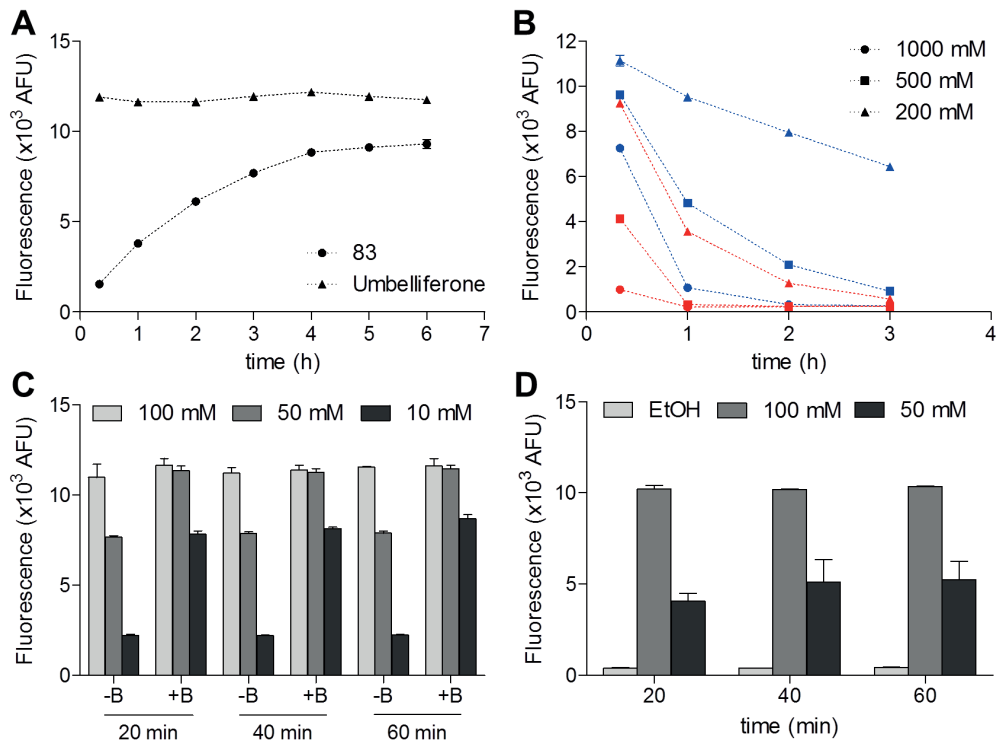


Figure S3. Optimization of the conditions for the base-mediated release of umbelliferone. A 5 μM solution of either **83** or umbelliferone in a 100 mM HEPES buffer, pH 7.4, containing 0.1 mM EDTA, 0.05 % Triton X-100, 0.01 % Pluronic F127 (Biotium), and 100 μM PLP (final volume: 100 μL) were successively treated with the corresponding basic solution (at the indicated concentrations) and/or solvent and incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for the indicated times before fluorescence reading ($\lambda_{\text{ex/em}} = 355/460 \text{ nm}$). In all cases, umbelliferone and **83** were added from 100 μM stock solutions in DMSO (5 μL). (A) Umbelliferone and **83** were treated with 50 μL of MeOH and 100 μL of a 200 mM glycine/NaOH buffer solution (pH 10.6). (B) Umbelliferone was treated with 50 μL of MeOH and 100 μL of KOH in EtOH (blue) or aq. NaOH (red) at the indicated concentrations. (C) Umbelliferone was treated with 50 μL of MeOH and 100 μL of KOH in EtOH, at the indicated concentrations, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ and read (-B) or treated with 100 μL of KOH in EtOH, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ and further treated with 50 μL of a 200 mM glycine/NaOH buffer solution immediately before reading (+B). (D) Aldehyde **83** was treated with 100 μL of KOH in EtOH at the indicated concentrations, incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for the indicated times and further treated with 50 μL of a 200 mM glycine/NaOH buffer solution immediately before reading. Data are means \pm SD of one representative experiment with triplicates.

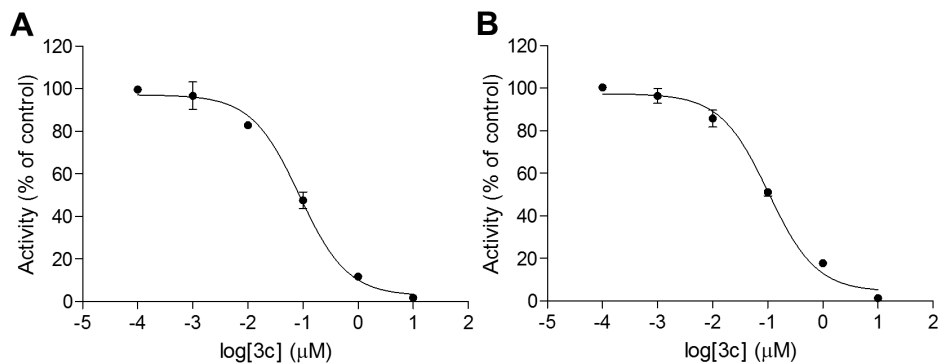


Figure S4. Activity (% of control) of hS1PL (final concentration: 0.8 $\mu\text{g}/\text{mL}$) at graded concentrations of 3c^2 using **RBM77** (A) or **RBM148** (B) as substrate (final concentration: 125 μM). Data correspond to the mean \pm SD of one representative experiment out of three performed with triplicates.

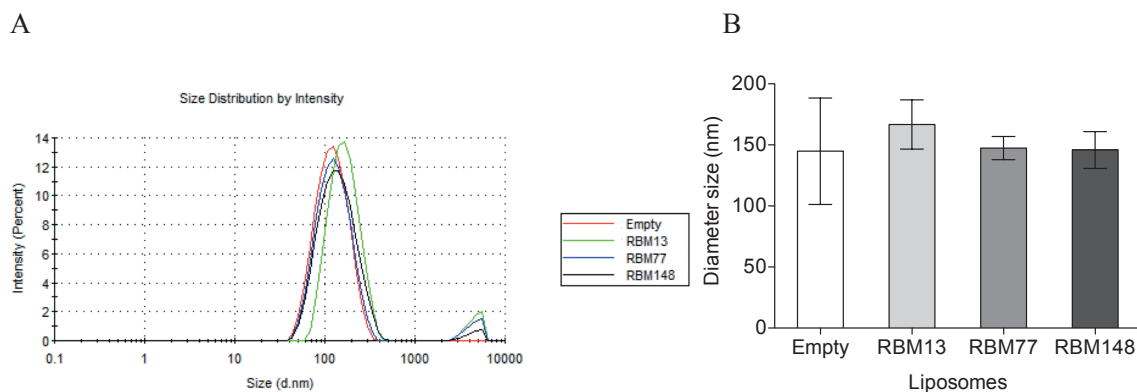


Figure S5. Particle size distribution curves of liposome suspension analysed by intensity. (A) Size distribution curves of different liposome formulation (empty and encapsulating RBM13, RBM77 and RBM148 probes) were measured using a Zetasizer Nano ZS instrument. Curves correspond to one representative measurement. (B) Average diameters of liposomes. Data are the mean \pm SD of three experiments with triplicates. There is no statistical difference in diameters between liposome preparations: empty (145 \pm 40 nm), **RBM13** (167 \pm 20 nm), **RBM77** (147 \pm 9 nm) and **RBM148** (146 \pm 15 nm).

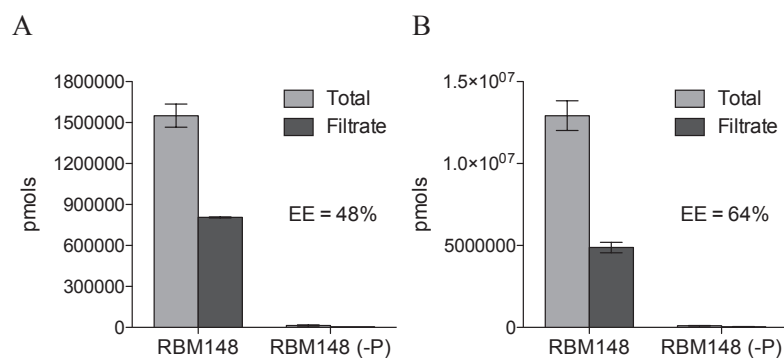


Figure S6. Entrapment efficiency analysis of **RBM148** encapsulated liposomes. Encapsulation efficiency of two different **RBM148** liposomes composition was calculated. 3.5 mM (A) or 7 mM (B) of lipid both containing 2 mM of **RBM148**. Each preparation was analyzed by UPLC-MS. Data are the mean \pm SD of three experiments with duplicates.

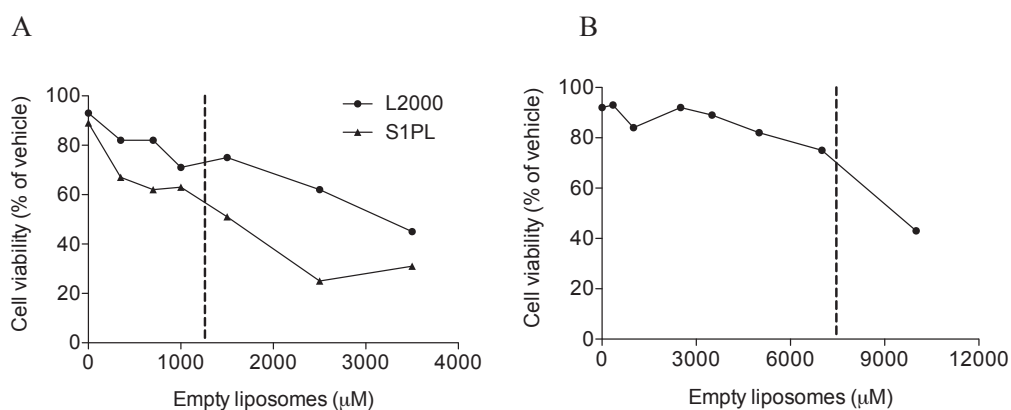


Figure S7. Effect of liposomes on cell viability. HEK293T cells overexpressing S1PL (A) and MEF SGPL1^{+/+} cells (B) were incubated with empty liposomes for 3 h and cell viability was determined by cell counting. Dotted line showed the maximum allowable liposome concentration (based on toxicity assay) for each cell line; L2000: lipofectamine 2000[®].

Due to the transfection agent (lipofectamine 2000®), HEK293T cells were more sensitive to liposomes, reaching higher cytotoxicity levels. On the other hand, on MEF SGPL1^{+/+} cells, cell viability was not affected up to a liposome concentration of 7 mM. This result was extrapolated to other MEF cells used in this work (SGPL1^{+/-} and SGPL1^{-/-}).

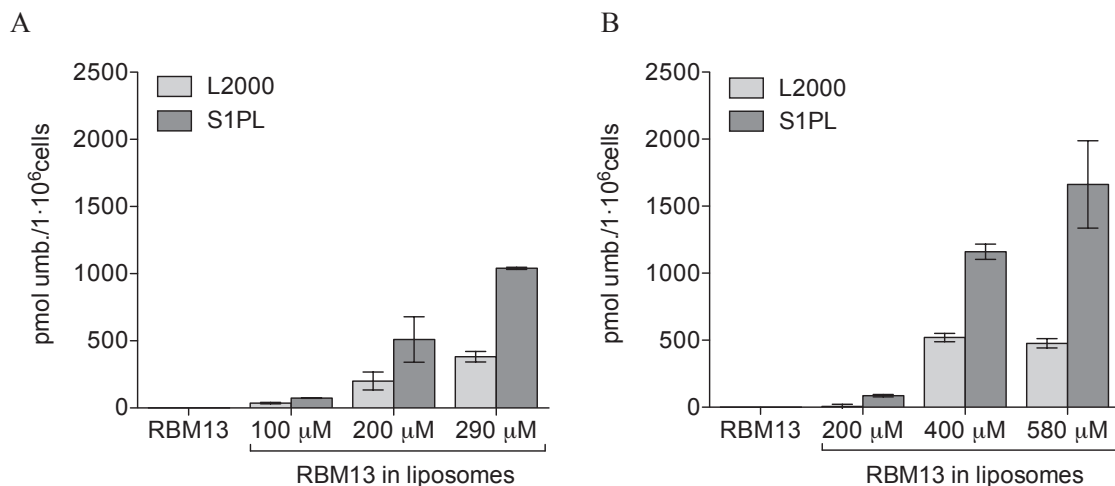


Figure S8. S1PL activity in intact cells using **RBM13** encapsulated liposomes. S1PL-overexpressing HEK293T cells were incubated for 3h with different dilutions of liposomes obtained from 1 mM (A) or 2 mM (B) **RBM13** solution and the amount (pmol) of released umbelliferone from **RBM13** was measured. Non-encapsulated **RBM13** at 200 μM was also tested. Data are the average ± SD of three experiments with duplicates.

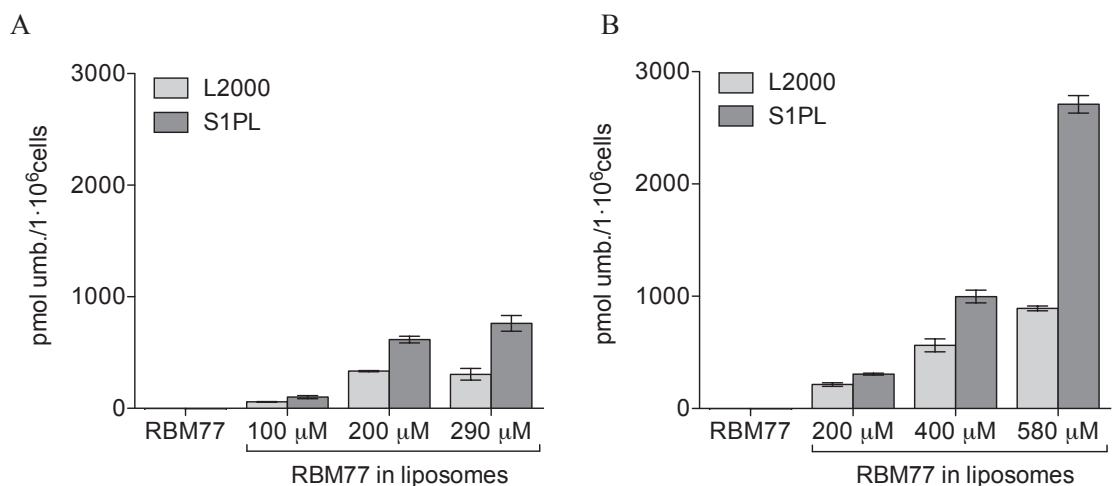


Figure S9. S1PL activity in intact cells using **RBM77** encapsulated in liposomes. S1PL-overexpressing HEK293T cells were incubated 48 h after transfection with different dilution of encapsulated liposomes obtained from 1 mM (A) or 2 mM (B) **RBM77** solution for 3 h and the amount (pmol) of released umbelliferone from **RBM77** was measured. Non-encapsulated **RBM77** at 200 μM was also tested. Data are the average ± SD of three experiments with duplicates.

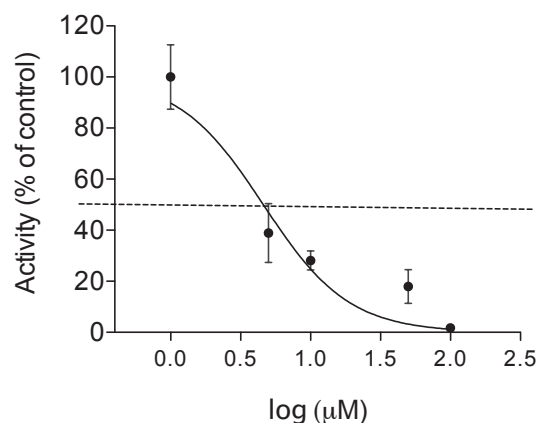


Figure S10. S1PL inhibition by 3c in intact cells using encapsulated **RBM148**. S1PL-overexpressing HEK293T cells were preincubated, 48 h after transfection, with graded concentrations of S1PL inhibitor **3c** for 1 h. Next, cells were incubated with encapsulated **RBM148** at 580 µM for additional 3 h more and the amount (pmol) of released umbelliferone from **RBM148** was measured. Data are the average \pm SD of two experiments with duplicates.

REFERENCES

- (1) Magolan, J.; Coster, M. J. Total Synthesis of (+)-Angelmanin. *J. Org. Chem.* **2009**, *74* (14), 5083–5086.
- (2) Weiler, S.; Braendlin, N.; Beerli, C.; Bergsdorf, C.; Schubart, A.; Srinivas, H.; Oberhauser, B.; Billich, A. Orally Active 7-Substituted (4-Benzyl-Phthalazin-1-Yl)-2-Methyl-Piperazin-1-Yl]-Nicotinonitriles as Active-Site Inhibitors of Sphingosine-1-Phosphate Lyase for the Treatment of Multiple Sclerosis. *J. Med. Chem.* **2014**, *57* (12), 5074–5084.
- (3) Schrödinger. Release 2016-1. Schrödinger, LLC: New York, NY 2016.
- (4) Schrödinger. Release 2016-1: Maestro. Schrödinger, LLC: New York, NY 2016.
- (5) Schrödinger. Release 2016-1: MacroModel. Schrödinger, LLC: New York, NY 2016.
- (6) Harder, E.; Damm, W.; Maple, J.; Wu, C.; Reboul, M.; Xiang, J. Y.; Wang, L.; Lupyan, D.; Dahlgren, M. K.; Knight, J. L.; Kaus, J. W.; Cerutti, D. S.; Krilov, G.; Jorgensen, W. L.; Abel, R.; Friesner, R. A. OPLS3: A Force Field Providing Broad Coverage of Drug-like Small Molecules and Proteins. *J Chem Theory Comput* **2016**, *12* (1), 281–296.
- (7) Jorgensen, W. L.; Maxwell, D. S.; TiradoRives, J. Development and Testing of the OPLS All-Atom Force Field on Conformational Energetics and Properties of Organic Liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118* (45), 11225–11236.
- (8) Kaminski, G. A.; Friesner, R. A.; Tirado-Rives, J.; Jorgensen, W. L. Evaluation and Reparametrization of the OPLS-AA Force Field for Proteins via Comparison with Accurate Quantum Chemical Calculations on Peptides. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 6474–6487.
- (9) Still, W. C.; Tempczyk, A.; Hawley, R. C.; Hendrickson, T. Semianalytical Treatment of Solvation for Molecular Mechanics and Dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112* (16), 6127–6129.
- (10) Schrödinger. Release 2016-1: Desmond Molecular Dynamics System. D. E. Shaw Research: New York, NY 2016.
- (11) Bowers, K. J.; Chow, E.; Xu, H.; Dror, R. O.; Eastwood, M. P.; Gregersen, B. A.; Klepeis, J. L.; Kolossváry, I.; Moraes, M. A.; Sacerdoti, F. D.; Salmon, J. K.; Shan, Y.; Shaw, D. E. Scalable Algorithms for Molecular Dynamics Simulations on Commodity Clusters. In *Proceedings of the*

- ACM/IEEE Conference on Supercomputing (SC06)*; Tampa, Florida, 2006.
- (12) Guo, Z.; Mohanty, U.; Noehre, J.; Sawyer, T. K.; Sherman, W.; Krilov, G. Probing the Alpha-Helical Structural Stability of Stapled p53 Peptides: Molecular Dynamics Simulations and Analysis. *Chem Biol Drug Des* **2010**, *75* (4), 348–359.
 - (13) Shivakumar, D.; Williams, J.; Wu, Y.; Damm, W.; Shelley, J.; Sherman, W. Prediction of Absolute Solvation Free Energies Using Molecular Dynamics Free Energy Perturbation and the OPLS Force Field. *J Chem Theory Comput* **2010**, *6* (5), 1509–1519.
 - (14) Berman, H. M.; Westbrook, J.; Feng, Z.; Gilliland, G.; Bhat, T. N.; Weissig, H.; Shindyalov, I. N.; Bourne, P. E. The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Res* **2000**, *28* (1), 235–242.
 - (15) Schrödinger. Release 2016-1: Schrödinger Suite 2016-1 Protein Preparation Wizard; Epik, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Impact, Schrödinger, LLC, New York, NY, 2016; Prime. Schrödinger, LLC: New York, NY 2016.
 - (16) Sastry, G. M.; Adzhigirey, M.; Day, T.; Annabhimoju, R.; Sherman, W. Protein and Ligand Preparation: Parameters, Protocols, and Influence on Virtual Screening Enrichments. *J. Comput. Aided. Mol. Des.* **2013**, *27* (3), 221–234.
 - (17) Olsson, M. H. M.; Søndergaard, C. R.; Rostkowski, M.; H., J. J.; Søndergaard, C. R.; Rostkowski, M.; Jensen, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J. Chem. Theor. Comput.* **2011**, *7* (2), 525–537.
 - (18) Schrödinger. Release 2016-1: Maestro-Desmond Interoperability Tools. D. E. Shaw Research: New York, NY 2016.
 - (19) Evans, D. J.; Holian, B. L. The Nose–Hoover Thermostat. *J. Chem. Phys.* **1985**, *83* (8), 4069–4074.
 - (20) Martyna, G. J.; Klein, M. L.; Tuckerman, M. Nosé–Hoover Chains: The Canonical Ensemble via Continuous Dynamics. *J. Chem. Phys.* **1992**, *97* (4), 2635–2643.
 - (21) Martyna, G. J.; Tobias, D. J.; Klein, M. L. Constant Pressure Molecular Dynamics Algorithms. *J. Chem. Phys.* **1994**, *101* (5), 4177–4189.
 - (22) Darden, T.; York, D.; Pedersen, L. Particle Mesh Ewald: An N·log(N) Method for Ewald Sums in Large Systems. *J. Chem. Phys.* **1993**, *98* (12), 10089–10092.
 - (23) Essmann, U.; Perera, L.; Berkowitz, M. L.; Darden, T.; Lee, H.; Pedersen, L. G. A Smooth Particle Mesh Ewald Method. *J. Chem. Phys.* **1995**, *103* (19), 8577–8593.
 - (24) Kräutler, V.; van Gunsteren, W. F.; Hünenberger, P. H. A Fast SHAKE Algorithm to Solve Distance Constraint Equations for Small Molecules in Molecular Dynamics Simulations. *J. Comput. Chem.* **2001**, *22* (5), 501–508.

RESULTATS ADDICIONALS CAPÍTOL 2

Elecció del model cel·lular per l'estudi

Introducció

La S1PL és un enzim que s'expressa de manera ubiqua en diferents línies cel·lulars però que en condicions normals es troba poc expressada. Tenint en compte que l'objectiu del capítol 2 recau en la quantificació de l'activitat de la S1PL, va sorgir la necessitat de trobar un model cel·lular on l'enzim es trobés expressat en nivells adequats pel posterior anàlisi. Es va decidir sobreexpressar la S1PL en diferents models cel·lulars i escollir la línia cel·lular on la transfecció fos més exitosa. Es va treballar amb la línia embrionària HEK293T, la de glioma T98G i les cèl·lules de càncer de cèrvix HeLa.

Mètodes

Materials:

Juntament amb els materials descrits en l'article presentat en el capítol 2, es va emprar el plàsmid pCMV6 que codifica per la S1PL de ratolí (MC202842) adquirit a OriGene (figura 27).

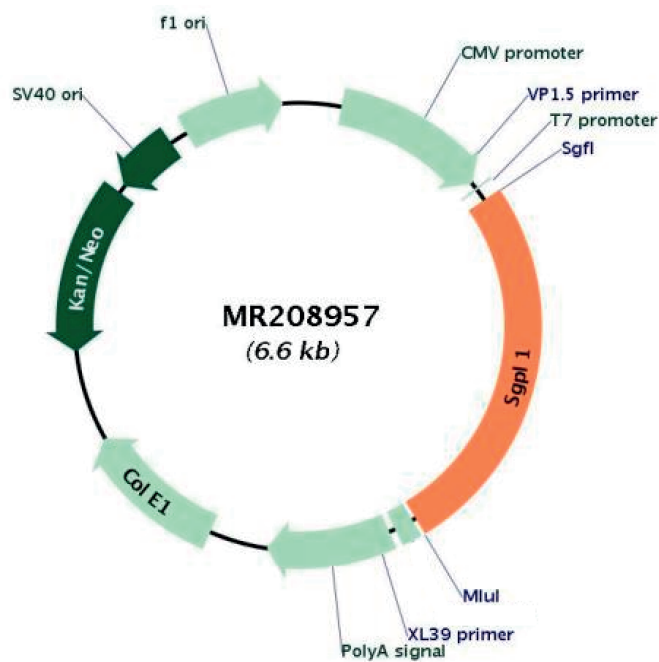


Figura 27: Plàsmid pCMV6 que codifica per la S1PL (representada en el plàsmid com Sgpl 1)

Cultiu cel·lular:

Les línies cel·lulars HEK293T, T98G i HeLa es van cultivar a 37°C, 5% de CO₂ en medi de cultiu DMEM amb un alt percentatge de glucosa i suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví i un 1% de penicil·lina i estreptomicina.

Sobreexpressió de la S1PL:

La transfecció amb el plàsmid pCMV6 que codifica per la S1PL de ratolí (figura 27) en les línies cel·lulars HEK293T, T98G i HeLa es va realitzar seguint la metodologia descrita en l'article presentat en el capítol 2.

Determinació de l'activitat S1PL per UPLC-TOF:

L'anàlisi de l'activitat S1PL per cromatografia líquida d'ultra alta resolució acoblada a un espectròmetre de masses tipus temps de vol (UPLC-TOF) es va realitzar en cèl·lules intactes transfectades per sobreexpressar l'enzim S1PL (metodologia descrita en l'article del capítol 2). Després de 48 h del moment de la transfecció es va afegir en cada pou, on es trobaven les cèl·lules sembrades a una confluència del 80%, So 2 μM i es van incubar 30 min a 37°C, 5% de CO₂. Es va aspirar el medi de cultiu i es va fer un rentat amb 400 μl de PBS. Es va aspirar el PBS i es va afegir 400 μl de Tripsina-EDTA que es van neutralitzar més tard amb 600 μl de medi de cultiu. La suspensió cel·lular es recollí i es va comptar el número de cèl·lules amb un comptador automàtic Countess. Es va centrifugar la suspensió a 9300 g 3 min, es va rentar el pellet amb 400 μl de PBS i es va torna a centrifugar a 9300 g 3 min. A continuació es va ressuspensar el pellet amb 100 μl de PBS 5% BSA i es va realitzar l'extracció lipídica en 700 μl d'una barreja ACN:MeOH:CHCl₃ en una proporció 4:3:3. Per tal que l'anàlisi fos quantitatiu, es va afegir un estàndard intern de SaPC17 (10 μl d'una solució mare 20 μM). La mescla es va sonicar i centrifugar a 16000 g durant 5 min i es va recollir el sobrenedant. Finalment es va evaporar el sobrenedant, ressuspensar el pellet en 150 μl de MeOH i analitzar la quantitat de S1P de l'extracte per UPLC-TOF, seguint la metodologia descrita per Billich i col·laboradors²⁴⁸.

Determinació de l'activitat S1PL en llistats cel·lulars:

La determinació de l'activitat S1PL en llistats cel·lulars de HEK293T, T98G i HeLa es va realitzar seguint la metodologia descrita en l'article del capítol 2.

Resultats

Les cèl·lules HEK293T sobreexpressen la S1PL:

Per comprovar l'efectivitat de la transfecció, es va analitzar l'activitat S1PL de manera indirecta, quantificant la S1P formada en cèl·lules a partir de So. Es va intentar sobreexpressar la S1PL de manera transitòria en tres línies cel·lulars humanes, les HEK293T, T98G i HeLa utilitzant la Lipofectamina 2000[®] com agent de transfecció. Tenint en compte els resultats presentats en la figura 28, només la línia cel·lular HEK293T va ser transfectada amb èxit en les condicions utilitzades, ja que els nivells de S1P en les cèl·lules incubades amb el plàsmid (S1PL) són més baixos que en el control (L2000).

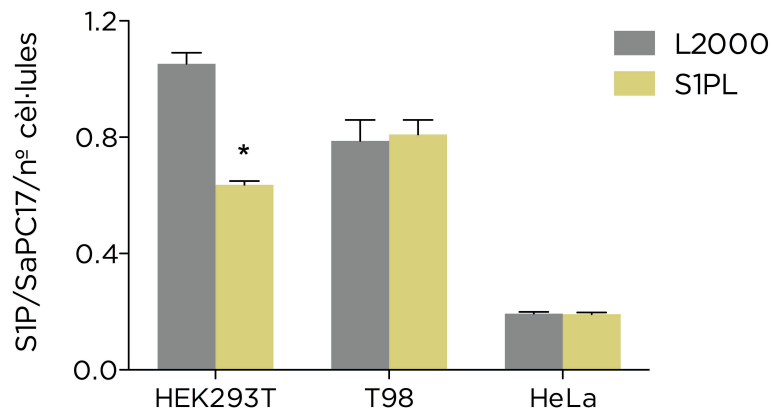


Figura 28: Determinació de l'activitat S1PL. Les cèl·lules HEK293T, T98 i HeLa es van transfectar amb un plàsmid que codifica per la S1PL de ratolí utilitzant Lipofectamina 2000[®]. Després de 48 h de la transfecció, les cèl·lules es van incubar amb So 2 μ M durant 30 min. Una vegada feta l'extracció lipídica, es quantifiquen els nivells de S1P per UPLC-TOF. Les dades corresponen a les mitjanes \pm SD de dos experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa entre les mostres control (L2000) i les cèl·lules que sobreexpressen la S1PL (S1PL) (* P <0.01, prova t de Student de dues cues per dades independents)

Es van confirmar els resultats mesurant l'activitat S1PL utilitzant RBM13 com a substrat fluorogènic (figura 29). Com s'esperava, les cèl·lules HEK293T transfectades amb el plàsmid que conté la S1PL de ratolí, van presentar més fluorescència que les cèl·lules on no s'ha sobreexpressat l'enzim. Tot i que les tres línies cel·lulars estudiades van presentar més fluorescència, i per tant més activitat S1PL, que els seus respectius controls, va ser amb les HEK293T on es van obtenir uns valors de fluorescència més elevats. Corroborant així els resultats obtinguts amb la determinació de l'activitat S1PL per UPLC-TOF.

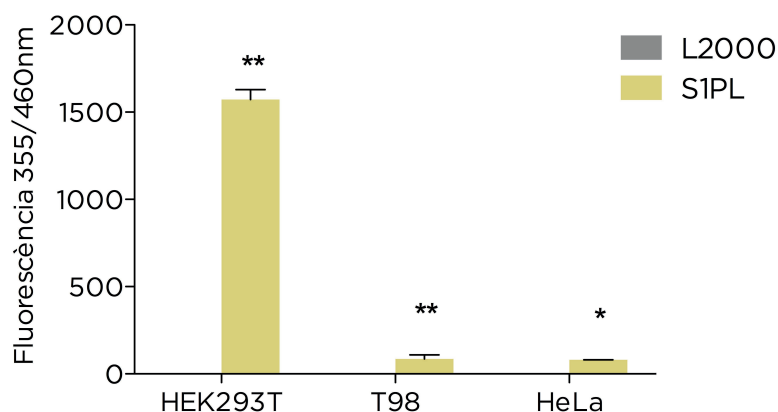


Figura 29: Determinació de l'activitat S1PL. Les cèl·lules HEK293T, T98 i HeLa es van transfectar amb un plàsmid que codifica per la S1PL de ratolí utilitzant Lipofectamina 2000[®]. Després de 48 h de la transfecció, es mesura l'activitat S1PL en llisats cel·lulars utilitzant el RBM13 com a substrat fluorogènic. Les dades corresponen a les mitjanes \pm SD de tres experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa entre les mostres control (L2000) i les cèl·lules que sobreexpressen la S1PL (* P <0.05, ** P <0.01, prova t de Student de dues cues per dades independents)

RESULTATS ADDICIONALS CAPÍTOL 2

Validació dels liposomes RBM148 en la recerca d'inhibidors de la S1PL

Introducció

La naturalesa polar dels compostos RBM13, RBM77 i RBM148 impedeix que puguin travessar la membrana plasmàtica cel·lular i, per tant, no és possible la seva aplicació com a substrats fluorogènics de la S1PL en cèl·lules intactes. Per evitar-ho, tal com es mostra en l'article presentat en el capítol 2, es va decidir encapsular els compostos en liposomes. Per comprovar la millora en la permeabilitat cel·lular es va analitzar per UPLC-TOF els nivells del RBM148 a dins i fora de la cèl·lula després d'una incubació amb els liposomes RBM148. L'objectiu principal dels substrats fluorogènics encapsulats en liposomes presentats en aquest capítol 2, era poder determinar l'activitat S1PL en cèl·lules intactes, però també presentar una nova metodologia que permeti el descobriment de nous inhibidors selectius. Per tal d'obtenir resultats addicionals per a la validació del nou procediment, es van provar dos nous compostos (figura 30), el 89 i el 87, dissenyats com a possibles inhibidors de la S1PL.

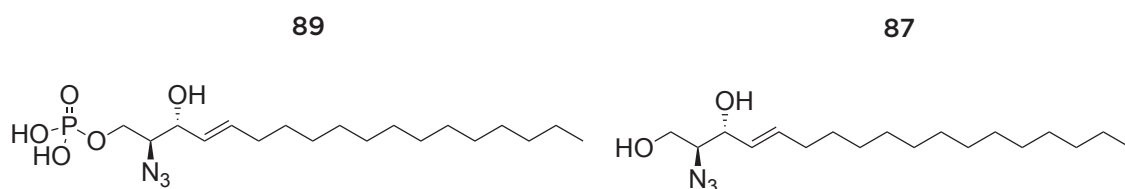


Figura 30: Estructures químiques dels possibles inhibidors de la S1PL 89 i 87

Materials i mètodes

Materials:

Es van emprar els materials descrits en l'article presentat en el capítol 2.

Cultiu cel·lular:

Les línies cel·lulars HEK293T i MEF SGPL1^{+/+} i SGPL1^{-/-} es van cultivar a 37°C, 5% de CO₂ en medi de cultiu DMEM amb un alt percentatge de glucosa i suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví i un 1% de penicil·lina i estreptomina.

Sobreexpressió de la S1PL:

La transfecció amb el plàsmid pCMV6 (figura 27) en la línia cel·lular HEK293T es va realitzar seguint la metodologia descrita en l'article presentat en el capítol 2.

Preparació del substrat RBM148 encapsulat en liposomes catiónics:

La preparació dels liposomes que encapsulen el substrat RBM148 es va realitzar seguint la metodologia descrita en l'article presentat en el capítol 2.

Determinació de l'activitat S1PL en cèl·lules intactes:

La determinació de l'activitat S1PL en cèl·lules intactes es va realitzar seguint la metodologia descrita en l'article presentat en el capítol 2. Els possibles inhibidors de la S1PL 89 i 87 s'addicionen juntament amb el RBM148 encapsulat en liposomes.

Determinació de la permeabilitat cel·lular al RBM148:

La quantificació dels nivells del compost RBM148 es va realitzar per UPLC-TOF en cèl·lules HEK293T, prèviament transfectades per sobreexpressar l'enzim S1PL, i en els fibroblast de ratolí SGPL1^{+/+} i SGPL1^{-/-}. Les cèl·lules sembrades en plaques de 12 pous a una confluència del 80% es van incubar amb el RBM148 encapsulat en liposomes a una concentració final de 580 μM durant 3 h a 37°C amb 5% de CO₂. Passat aquest temps es van recollir 200 μL del medi de cultiu en un eppendorf, es van afegir 800 μL de acetona freda i es va incubar tota la nit a 4°C. Es va centrifugar la mescla a 9300 g 3 min, i el sobrenedant es va evaporar amb corrent de N₂. En el moment de l'anàlisi es van afegir 150 μL de MeOH i es van passar a un vial de UPLC-TOF. Les cèl·lules es van rentar amb 400 μl de PBS. Es va aspirar el PBS i es va afegir 400 μl de Tripsina-EDTA que es van neutralitzar més tard amb 600 μl de medi de cultiu. La suspensió cel·lular es va recollir i es va comptar el número de cèl·lules amb un comptador automàtic Countess. Es va centrifugar la suspensió cel·lular a 9300 g 3 min, es va rentar el pellet dues vegades amb 200 μl de PBS i es va torna a centrifugar a 9300 g 3 min. A continuació es va ressuspensar el pellet amb 500 μl de MeOH i es va incubar tota la nit a 48°C. Seguidament es va evaporar el solvent amb corrent de N₂. Es van afegir 150 μL de MeOH i es va centrifugar a 9300 g 3 min. En el moment de l'anàlisi es van afegir 150 μL de MeOH i es van passar a un vial de UPLC-TOF. Les mostres de medi i cèl·lules es van analitzar per separat per UPLC-TOF.

Resultats

Els compostos 89 i 87 inhibeix la S1PL:

Els valors de IC₅₀ dels inhibidors 89 i 87 es va determinar ajustant la corba dosi resposta a una equació sigmoïdal de pendent variable (figura 31). El valor IC₅₀ i el seu interval de confiança del 95% del compost 89 és 95.39 μM (76.29 a 119.3). En el cas del inhibidor 87, té una IC₅₀ de 183.30 μM (110.6 a 303.7).

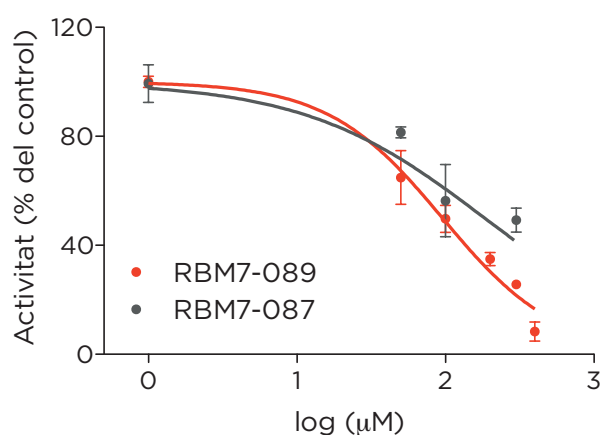


Figura 31: Determinació de la inhibició de la S1PL en cèl·lules intactes utilitzant el RBM148 encapsulat en liposomes. Les cèl·lules SGPL1^{+/+} es van incubar amb un banc de dilucions dels compostos 89 i 87 juntament amb el substrat RBM148 encapsulat en liposomes a una concentració final de 580 μM durant 3 h. Es van mesurar els pmols d'umbel·liferona alliberats en la hidròlisi del substrat RBM148 per acció de la S1PL. Les dades corresponen a les mitjanes \pm SD de tres experiments amb duplicats. L'ajustament de les corbes dosi resposta a una equació sigmoïdal de pendent variable va permetre calcular els valors IC₅₀.

El RBM148 encapsulat en liposomes travessa la membrana cel·lular:

Amb l'objectiu d'investigar la permeabilitat de la membrana cel·lular als liposomes RBM148, es va dur a terme la detecció del substrat per UPLC-TOF (figura 32). Els fibroblasts SGPL1^{+/+} i SGPL1^{-/-} i les cèl·lules HEK293T, després de ser transfectades per sobreexpressar la S1PL, es van incubar amb els liposomes RBM148 durant 3 h. Després de l'extracció lipídica, es van quantificar els pmols de RBM148, la seva forma desfosforilada RBM148 (-P) i la umbel·liferona. El medi (figura 32A) i les cèl·lules (figura 32B) de la mateixa mostra es van analitzar per separat. Paral·lelament es va analitzar també una suspensió de liposomes RBM148 en HBSS (figura 32C). El substrat encapsulat en els liposomes en HBSS va resultar ser estable, però en la incubació amb les cèl·lules, la major part del substrat es desfosforilava. Dins les cèl·lules es va detectar el compost RBM148, demostrant que la permeabilització havia tingut lloc. És interessant destacar que els nivells d'umbel·liferona detectats en les mostres de medi van coincidir amb els resultats esperats. Els nivells més alts d'umbel·liferona corresponien a les cèl·lules HEK293T que sobreexpressaven la S1PL. A més amb les incubacions en les cèl·lules SGPL1^{+/+} es va detectar umbel·liferona, mentre que en les incubacions amb les cèl·lules SGPL1^{-/-} no se'n detectà.

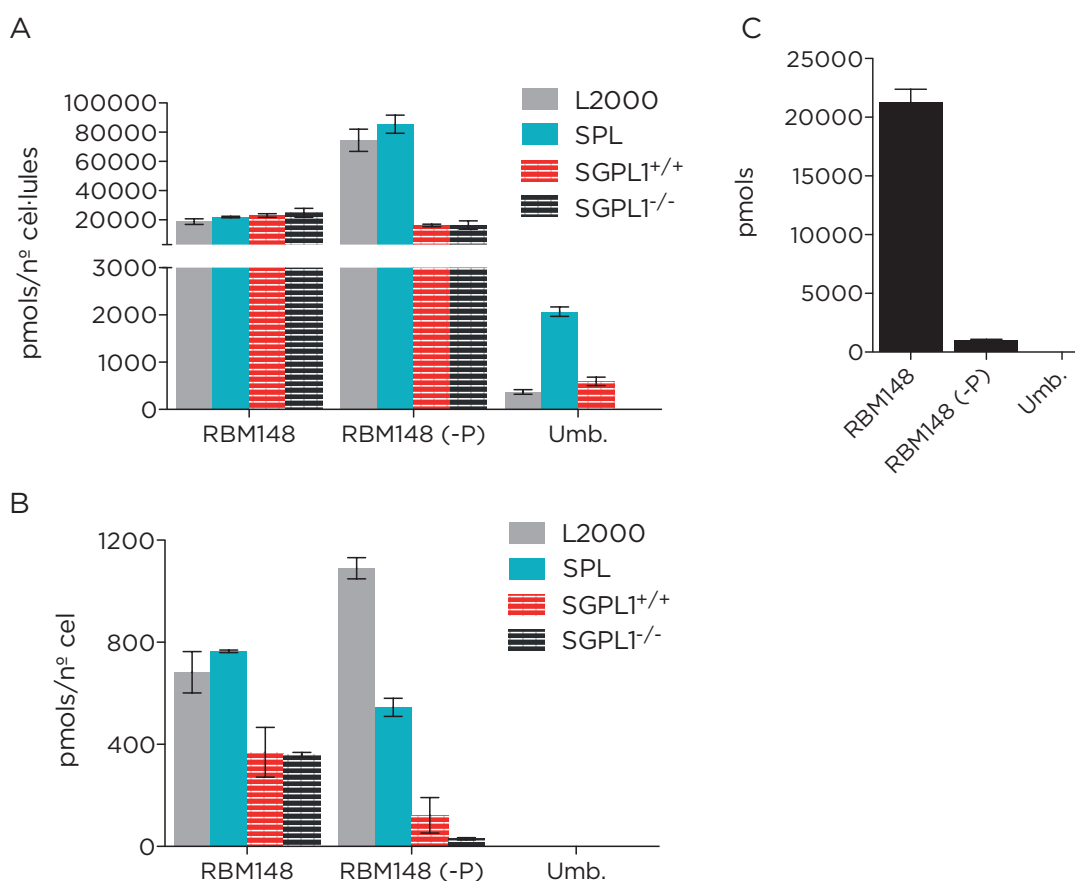


Figura 32: Anàlisi de la permeabilitat cel·lular als liposomes RBM148 per UPLC-TOF. Les cèl·lules HEK293T que sobreexpressen la S1PL i els fibroblasts SGPL1^{+/+} i SGPL1^{-/-} es van incubar amb els liposomes RBM148 1mM durant 3 h. Després d'una extracció lipídica de les mostres, es va analitzar els nivells de RBM148, RBM148 (-P) i umbel·liferona en les mostres de medi (A) i cèl·lules (B) per separat. C. Anàlisi de l'estabilitat dels liposomes RBM148 en HBSS per UPLC-TOF. Les dades corresponen a les mitjanes ±SD de dos experiments amb triplicats.

CAPÍTOL 3

Validació del paper de les dihidroceramides en la inducció d'autofàgia i la seva repercussió en el destí cel·lular

ARTICLES

“Inhibitors of dihydroceramide desaturase 1: therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology”

“Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms”

“Chemometric evaluation of glioma cell lipidoma in response to proautophagic compounds”

RESULTATS ADDICIONALS

Elecció del model cel·lular per l'estudi

Anàlisi de l'efecte de ROS en T98G i U87MG

ARTICLE 3

Inhibitors of dihydroceramide desaturase 1: therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology

Mireia Casasampere, Yadira F. Ordóñez, Ana Pou i Josefina Casas

Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), 08034 Barcelona, Spain

Chemistry and Physics of Lipids. **2016**; 197: 33-44

Factor d'impacte: 2.9

La contribució de Mireia Casasampere a aquest treball presentat com a part del capítol 3 d'aquesta tesi, correspon a la recerca bibliogràfica i redacció del punt 4.1 d'aquesta revisió.

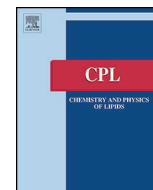
Josefina Casas Brugulat
Directora de tesi

RESUM

Inhibidors de la dihidroceramida dessaturasa 1: agents terapèutics i eines farmacològiques per desxifrar el paper de les dihidroceramides en la biologia cel·lular

L'enzim Des1 és l'últim enzim de la via de biosíntesi *de novo* de la Cer. Catalitza la inserció d'un doble enllaç en la dhCer per convertir-la a Cer, sent ambdues metabolitzades a continuació cap a (dihidro)esfingolípid més complexos. Durant molts anys les dhCer no han estat en el focus d'atenció científica, principalment a causa de la seva suposada falta d'activitat biològica. No va ser fins fa uns deu anys que va sorgir per primera vegada la idea que les dhCer podrien tenir un paper regulador en les vies de senyalització cel·lular. Des de llavors, diverses publicacions han demostrat que les dhCer estan implicades en un ampli espectre de processos biològics, i la informació d'aquestes funcions fisiològiques i fisiopatològiques per part de les dhCer han estat recopilades recentment en diverses revisions. Concretament, aquesta revisió està centrada en les característiques bioquímiques de Des1 i sobre la seva inhibició per diferents compostos que presumptament actuen per diferents mecanismes.

La disponibilitat dels inhibidors de Des1 i el seu ús com a eines farmacològiques ha ajudat a refutar la innocuïtat biològica de les dhCer. La major part de les evidències provenen d'estudis on la inhibició de Des1 provoca una acumulació de dhCer. S'han dissenyat de manera racional diversos inhibidors dirigits específicament a Des1, com el XM462 o el GT11. No obstant, altres fàrmacs o productes naturals han demostrat també tenir un efecte inhibidor sobre l'activitat de Des1. Entre tots ells, en aquesta revisió es comenta l'efecte de la 4-HPR, RV, CCX, THC, γ -T, γ -TE, curcumina i SKI-II. El resultat d'aquesta inhibició varia en funció de la línia cel·lular, el grau d'inhibició (i per tant les quantitats resultants de dhCer acumulada) i per últim el context experimental.



Inhibitors of dihydroceramide desaturase 1: Therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology



Mireia Casasampere, Yadira F. Ordoñez, Ana Pou, Josefina Casas*

Research Unit on BioActive Molecules, Department of Biomedical Chemistry, Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18-26, E-08034 Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 15 June 2015
Received in revised form 29 July 2015
Accepted 31 July 2015
Available online 3 August 2015

Keywords:

Ceramides
Autophagy
Resveratrol
Fenretinide

ABSTRACT

Dihydroceramide desaturase (Des1) is the last enzyme in the *de novo* synthesis of ceramides (Cer). It catalyzes the insertion of a double bond into dihydroceramides (dhCer) to convert them to Cer, both of which are further metabolized to more complex (dihydro) sphingolipids. For many years dhCer have received poor attention, mainly due to their supposed lack of biological activity. It was not until about ten years ago that the concept that dhCer might have regulatory roles in biology emerged for the first time. Since then, multiple publications have established that dhCer are implicated in a wide spectrum of biological processes. Physiological and pathophysiological functions of dhCer have been recently reviewed. In this review we will focus on the biochemical features of Des1 and on its inhibition by different compounds with presumably different modes of action.

© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Sphingolipids (SLs) are the second largest class of membrane lipids and thousands of distinct species have been identified (Merrill, 2011). They have a diverse range of functions related to cell survival, membrane integrity, metabolic regulation, and general adaptations to cellular stressors (Siddique et al., 2015). Biosynthesis of SLs consists of a highly conserved sequence of enzymatic reactions that take place in different intracellular compartments (Morad and Cabot, 2013). The biosynthesis *de novo* occurs in the endoplasmic reticulum (ER) and starts with the condensation of L-serine with palmitoyl-CoA to give 3-ketodihydro-sphingosine in a reaction catalyzed by serine palmitoyl transferase. By the action of a reductase, 3-ketodihydro-sphingosine is reduced to dihydro-sphingosine (dhSo), which is *N*-acylated to dihydroceramides (dhCer) by specific ceramide synthases of

different chain length specificities. The oxidation of dhCer to ceramide (Cer) by dihydroceramide desaturase 1 (Des1) is the last step of this biosynthetic pathway. Cer, and, to a lesser extent, dhCer are further metabolized to complex SLs, such as (dihydro) sphingomyelins and (dihydro) glycosphingolipids (Fig. 1) (Morad and Cabot, 2013).

The search for the term dihydroceramide in the PubMed database retrieves 541 papers, 56% of them being published in the last 10 years (Fig. 2). Among the above papers, 44 are reviews, although only 3 of them are devoted to dhCer (Fabrias et al., 2012; Rodríguez-Cuenca et al., 2014; Siddique et al., 2015). The growing interest on dhCer is indubitable as shown by the fact that the last two reviews have been published in 2015. Our previous review (Fabrias et al., 2012) dealt with Des1 biochemistry and mode of action and the biological functions of dihydro-sphingolipids. In their review, Rodríguez-Cuenca and coworkers describe the function of Des1 and its dysregulation by factors such as oxidative stress, hypoxia and inflammation, and present pathological scenarios characterized by specific increases in dhCer (Rodríguez-Cuenca et al., 2014). On the other hand, the uncovered roles of dhCer in autophagy, hypoxia, and cellular proliferation and its implication in the etiology, treatment, or diagnosis of diabetes, cancer, ischemia/reperfusion injury, and neurodegenerative diseases have been summarized by Siddique et al. 2015. Given that the description of the physiological and pathological roles of dhCer has been extensively discussed the last two outstanding reviews, the

Abbreviations: Cer, ceramide(s); 4-HPR, N-(4-hydroxyphenyl)retinamide or fenretinide; A β , amyloid β peptides; DEGS1, drosophila degenerative spermatocyte 1; DEGS2, drosophila degenerative spermatocyte 2; Des1, dihydroceramide desaturase 1; Des2, dihydroceramide desaturase 2; dhCer, dihydroceramide(s); dhSo, dihydro-sphingosine; ER, endoplasmic reticulum; HIV-1, human immunodeficiency virus 1; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; ROS, reactive oxygen species; S1P, sphingosine 1-phosphate; SLs, sphingolipids; THC, Δ 9-tetrahydrocannabinol; TRB3, *tribbles*-related protein 3.

* Corresponding author.

E-mail address: finas.casas@iqac.csic.es (J. Casas).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.025>

0009-3084/© 2015 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

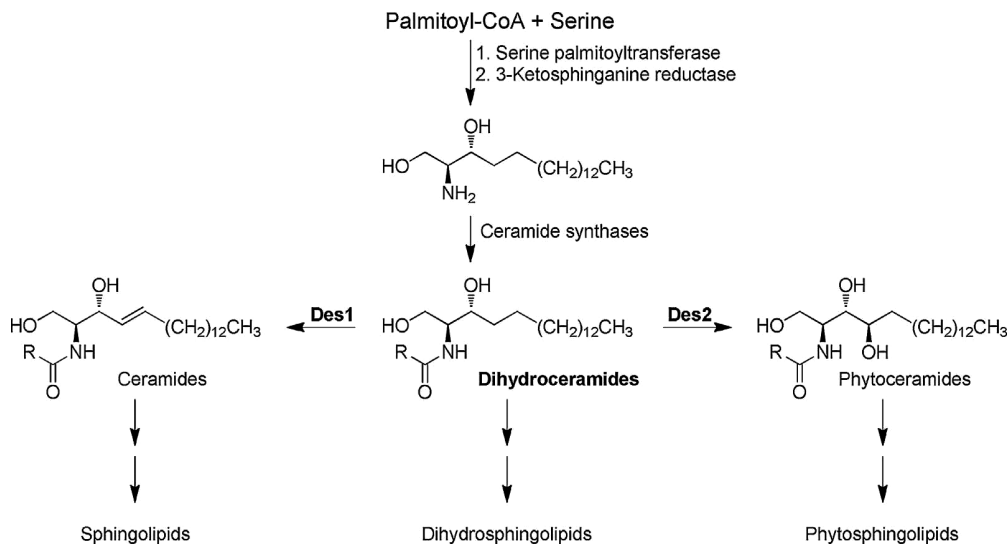


Fig.1. Biosynthesis *de novo* of sphingolipids.

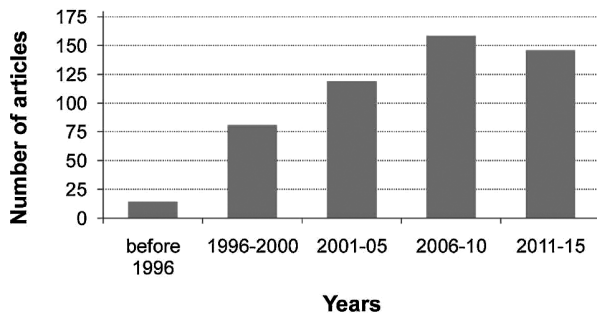


Fig. 2. Number of articles retrieved from PubMed by searching for the term dihydroceramide.

present one will mainly focus on Des 1 inhibitors and the biological consequences of blocking Des1 activity.

2. Dihydroceramide desaturases

The gene encoding for Des1 was first cloned in 1996 from *Drosophila melanogaster*, and it was given the name “drosophila degenerative spermatocyte 1” or DEGS1 (Endo et al., 1996). One year later, Cadena et al. 1997 demonstrated that the DEGS1 gene product was a membrane bound desaturase and found that its overexpression inhibited epidermal growth factor receptor biosynthesis. Despite the importance of this receptor in several malignancies, this finding has not been further investigated. Currently, the dihydroceramide desaturase gene is known as either DES1 or DEGS1. Ternes et al. 2002 identified a Des1 homologue, namely Des2, as a bifunctional enzyme with dihydroceramide C4-desaturase and C-4-hydroxylase activities. This enzyme is responsible for the biosynthesis of glycosphingolipids containing 4-hydroxysphinganine in the small intestine (Omae et al., 2004).

Thus, while Des1 exhibits high dihydroceramide C4-desaturase and very low C-4 hydroxylase activities, Des2, the product of the gene DEGS2 or DES2, exhibits bifunctional sphingolipid C-4 hydroxylase and C4-desaturase activities (Ternes et al., 2002). The tissue distribution profile of both enzymes is considerably different. Des1 is ubiquitously distributed, whereas Des2 is preferentially expressed in small intestine, skin and kidney (Fabrias et al., 2012), where the production of phytoceramides is essential.

A few lines of evidence demonstrate that Des1 is regulated by fatty acids. Thus, Rioux and co-workers (Rioux et al., 2011) showed that myristoylation of Des1 increases the enzyme activity (Beauchamp et al., 2007; Ezanno et al., 2012) and alters its subcellular localization, targeting the enzyme from the ER to the mitochondrial outer membrane, wherein causes an increase in Cer levels that in turn leads to apoptosis (Beauchamp et al., 2009). The recombinant non myristoylable mutant form of Des1, on the contrary, is almost completely absent in mitochondrion (Beauchamp et al., 2009). Another fatty acid, palmitic acid, increases mRNA encoding DES1 leading to increased Cer synthesis *de novo*. In contrast, co-treatment with oleate prevented the increase in ceramide, and this occurred through attenuation of the increase in message and activity of Des1. These findings provide insight into the mechanisms of oleate-mediated protection against metabolic disease and provide novel evidence for fatty acid-mediated regulation of Des1 (Hu et al., 2011). From the biochemical point of view, studies carried out in the late 90s demonstrated that Des1 requires NADPH (Geeraert et al., 1997) or NADH (Michel et al., 1997) as electron donor and oxygen as electron acceptor. The electron provided by NAD(P)H is sequentially transported from the cofactor to NADH-cytochrome b5 reductase, cytochrome b5, and the terminal desaturase, which reduces oxygen to water and oxidizes dhCer to Cer (Fig. 3). A similar mechanism was proposed by Enomoto et al. 2006 for the hydroxylation reaction catalyzed by Des2. Oxygen-dependence explains that both Des1 and Des2 are

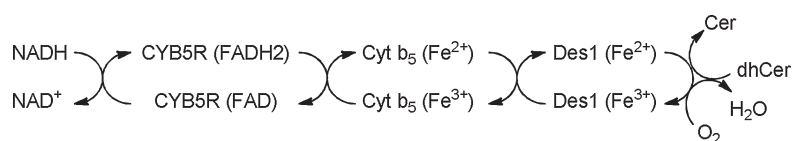


Fig. 3. Dihydroceramide desaturase enzymatic complex.

up-regulated under hypoxia to cope with the decreased enzyme activity and the consequent raise in dhCer production (Devlin et al., 2011).

Both enzymes, Des 1 and Des2, are active over a broad pH range (6.5–9), being optimal at around pH 8.5 (Geeraert et al., 1997). Regarding to the substrate stereochemistry, desaturation of the D-erythro-isomer by Des1 is much faster than that of the L or D-threo-isomers. Other factors that influence the enzymatic activity are the length of the alkyl chains of the amide-linked fatty acid (Fabrias et al., 2012). Mechanistically, the desaturation reaction catalyzed by Des1 is presumably initiated by an enzyme-bound iron-oxo species (Buist, 2004) that abstracts specifically the C-4 pro (R)-hydrogen atom from the substrate (Beckmann et al., 2003; Savile et al., 2001). This is a highly energetically demanding C–H cleavage associated with a large kinetic isotope effect. This first oxidation is followed by the fast, isotopically insensitive elimination of the pro-(S) hydrogen atom at C-5 (Beckmann et al., 2003; Savile et al., 2001) to give the final Cer.

3. Biological activities of dihydroceramides

As compared to Cer, sphingomyelins or glycosylceramides, the absence of the double bond in dhCer, dihydro sphingomyelins or glycosyldihydroceramides markedly alters the biophysical properties of the molecules, modifying their elastic properties and packing behavior (Brockman et al., 2004). Many articles published over the years claimed that dhCer were inactive or ineffective lipid mediators in a wide range of biological responses such as platelet aggregation, cell growth, DNA damage, regulation of ion channels, and inhibition of insulin signaling and glucose uptake. As a result of these observations, the dogma emerged that dhCer are the biologically inactive counterparts of Cer. In 2006 this dogma started to be questioned. Thus, Stiban et al. showed the capacity of dhCer to inhibit channel formation induced by Cer in mitochondria thus inhibiting the release of apoptogenic molecules and the apoptotic cell death. Their results led the authors to suggest that dhCer might mitigate the apoptotic effect of Cer (Stiban et al., 2006). At the same time, the development of liquid chromatography coupled to mass spectrometry techniques allowing to differentiate between Cer and dhCer aided to reveal biological activities of dhCers. In a seminal work, Merrill's group profiled the SL of DU145 human prostate cancer cells treated with fenretinide (4-HPR) (see below) (Zheng et al., 2006). In this study, the authors showed that 4-HPR caused a buildup of dhCer instead of an accumulation of Cer, as previously reported. In the following years, the number of publications dealing with the implication of dhCer in a multitude of physiological or pathological events has been continuously growing. The biological roles of dhCer have been recently examined in two excellent reviews (Rodriguez-Cuenca et al., 2014; Siddique et al., 2015).

A recent novel activity for Des1 has been recently reported by Kaylor et al. 2013. These authors performed a high-throughput expression screen using an abundance-normalized cDNA library from chicken neural retinas in order to identify a second retinol isomerase activity present in cone-dominant retinas from chickens (Mata et al., 2005). They screened the different clones for isomerase-2 activity and found out that Des1 also catalyzed the equilibrium isomerization of retinol. Addition of all-trans-retinol to homogenates of primary cultured chicken Müller cells, which express Des 1, to Des 1-expressing 293T cell homogenates or to purified Des1 expressed in *Escherichia coli* resulted in the formation of (cis)-11-retinol, (cis,cis)-9,13-retinol, (cis)-9-retinol and (cis)-13-retinol at ratios similar to those seen after iodine-catalyzed retinoid equilibration. The rate of Des1-catalyzed retinol equilibration was very high. Moreover, the Des1 isomerase activity was shown to be inhibited by known inhibitors of Des1, like

GT11 or 4-HPR (see below). Within the neural retina, Des1 is expressed in Müller cells, the site of the proposed alternative visual cycle. Des1 is also expressed in the retinal pigment epithelium, where it may augment synthesis of cis-11-retinol. As mentioned above, Des1 is expressed in multiple tissues that contain large amounts of sphingolipids and Des1 may function primarily as a lipid desaturase. However, cis-9-retinoic acid is also present in multiple tissues, where it binds with high affinity to both retinoic-acid and retinoid-X receptors. By producing (cis)-9-retinol, which can be readily converted to (cis)-9-retinoic acid, Des1 is the only known source of 9-cis-retinoids in vertebrates. The authors suggest that Des1, by means of its isomerase-2 activity, may play a role in nonvisual processes such as cell growth, differentiation, apoptosis and malignant transformation by contributing to the synthesis of (cis)-9-retinoic acid (Kaylor et al., 2013).

Studies carried out in DES1 knockout mice have clearly illustrated that the removal of the single double bond on the sphingosine backbone of SLs has enormous consequences on cell function. Although the homozygous DES1-null mice were viable, they failed to thrive and had numerous health abnormalities, dying within the first 8-weeks of age (Holland et al., 2007). In contrast, the heterozygous mice were viable with normal Mendelian birth rates. Lipid analysis revealed that DES1 heterozygous mice showed higher dhCer/Cer ratios in multiple organs. Importantly, these mice are protected from glucocorticoid-, saturated fat- and obesity-induced insulin resistance (Holland et al., 2007), as well as from diet-induced hypertension (Zhang et al., 2012). Moreover, cells from DES1 null mice were resistant to apoptosis, and, although they exhibited a remarkably strong activation of protein kinase B, they showed high levels of autophagy. The latter resulted from activation of AMP-activated protein kinase. Therefore, ablation of DES1 simultaneously stimulates anabolic and catabolic signaling through activation of protein kinase B and AMP-activated protein kinase pathways, respectively (Siddique et al., 2013). Activation of pro-survival and anabolic signaling intermediates provided protection from apoptosis caused by etoposide (Siddique et al., 2012).

On the other hand, heterozygous deletion of DES1 prevented vascular dysfunction and hypertension in mice after high-fat feeding. These findings were recapitulated in isolated arteries *in vitro*, confirming that Cer impairs endothelium-dependent vasorelaxation in a tissue-autonomous manner. Mechanistic studies showed the involvement of protein phosphatase 2A-mediated disruption of the endothelial nitric oxide synthase/protein kinase B/heat shock protein 90 signaling complex. These results provide important insight into a pathway that represents a novel target for reversing obesity-related vascular dysfunction (Zhang et al., 2012).

Collectively, the above studies, together with those compiled in recent reviews (Rodriguez-Cuenca et al., 2014; Siddique et al., 2015), underscore the importance of dihydro sphingolipids in cell biology. Continued research on the biological function of these molecules may uncover novel therapeutic opportunities by modulating the Des1 enzyme. Upregulation of Des1 has been reported to occur by saturated fatty acids and anoxia (see above), while decreasing Des1 activity can be achieved with specific site directed inhibitors and certain drugs and natural compounds with Des1 inhibitory activity (see below).

4. Inhibitors of Des 1

The availability of Des1 inhibitors and their use as pharmacological tools has helped to refute the biological innocuousness of dhCer. Most of the evidences come from studies where inhibition of Des1 causes an accumulation of dhCer. Several rationally designed active site directed inhibitors of Des1 have been described, including GT11 or XM462 (see below). Apart from

these, a series of drugs and natural products also show inhibitory effect on Des1 activity. The outcome of this inhibition is varied, depending on the cell line, the degree of inhibition (and thus the resulting amounts of accumulated dhCer) and the experimental context.

4.1. Phenolic compounds and other non-sphingolipid analogs

4.1.1. Fenretinide (4-HPR)

4-HPR is a synthetic derivate of all-*trans*-retinoic acid, a vitamin A analogue, which has been widely investigated for the prevention and treatment of cancer (Mody and Mcilroy, 2014). For example, 4-HPR has been reported to induce apoptotic cell death and to repress cell proliferation, thereby being useful to halt tumor growth (Erdreich-Epstein et al., 2002; Hail et al., 2006). Recent findings have discovered additional beneficial properties of 4-HPR in the prevention of high-fat diet-induced obesity and insulin resistance (Mcilroy et al., 2013; Preitner et al., 2009).

4-HPR was the first chemotherapeutic drug found to inhibit Des1. The phenolic group, which is absent in all-*trans*-retinoic acid, is probably involved in Des1 inhibition, since all-*trans*-retinoic acid is not inhibitory. Since its first synthesis in 1960s, several articles have been published trying to elucidate the molecular mechanisms associated with 4-HPR effects (Mody and Mcilroy, 2014). It had been thought that 4-HPR would elevate Cer by activation of serine palmitoyl transferase and Cer synthase (Maurer et al., 2000; Morales et al., 2007). However, it was later established that dhCer rather than Cer was the actual accumulating lipid, whose buildup was caused by 4-HPR inhibition of Des1 (Li et al., 2013; Wang et al.,

2008). It is known that 4-HPR cytotoxicity depends on its effects mediating redox status dysfunction and increasing reactive oxygen species (ROS) levels (Oridate et al., 1997; Sun et al., 1999). Since Des1 activity is inhibited by oxidative stress (Idkowiak-Baldys et al., 2010), 4-HPR inhibition of Des1 might occur indirectly through increased oxidative species. However, Rahmaniyan et al. 2011 reported that Des1 is a direct *in vitro* target for 4-HPR, which provokes an irreversible inhibition upon long incubation times.

Regardless of the type of inhibition, 4-HPR-promoted increase in dhCer seems to be partly responsible for the drug activities. Regarding the effect of 4-HPR on cell fate, while high concentrations of 4-HPR (>5 μM) have been reported to induce apoptosis (Wang et al., 2001), lower doses induce cell cycle arrest at G0/G1 (Kravcka et al., 2007). On the other hand, Mao et al. 2010 demonstrated that dhSo is the cytotoxic mediator of 4-HPR cytotoxicity in a human oral squamous cell carcinoma cell line. dhSo levels are generated by alkaline ceramidase 2 upregulation, which is activated by 4-HPR. Nevertheless, Apraiz et al. 2012 showed that, in leukemia cells, 4-HPR-driven cell death occurs even in the absence of dhCer accumulation.

Apart from that, Merrill and co-workers identified a role for 4-HPR in the induction of autophagy (Zheng et al., 2006). They described that either 4-HPR or dhCer (resulting from 4-HPR blockade of Des1 activity) were responsible for autophagosome formation. In this pioneering work, autophagy was one of the first biological responses assigned to dhCer. 4-HPR has been widely studied because of its chemotherapeutic properties and it is in several clinical trials for treatment of cancer or metabolic syndromes like glucose intolerance (Johansson et al., 2008). Thus,

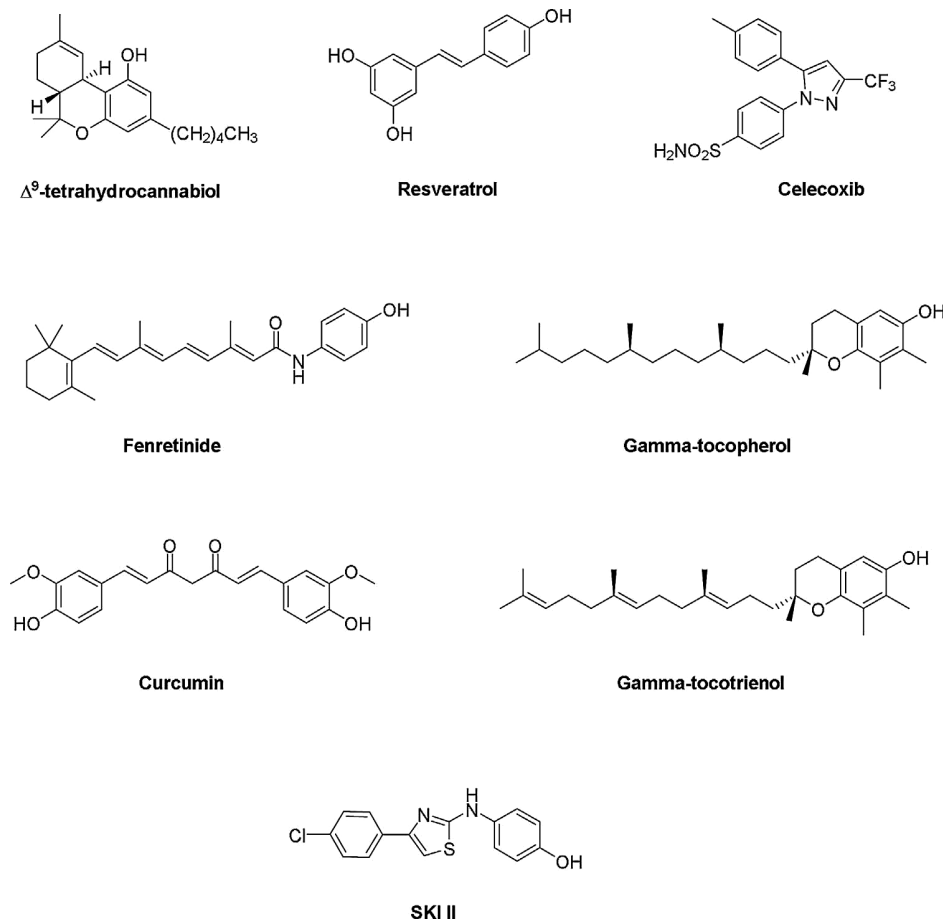


Fig.4. Chemical structure of non-sphingolipid analogs reported as Des1 inhibitors.

4-HPR improves insulin sensitivity, at least in part, by inhibiting Des1, suggesting that therapeutics targeting this enzyme may be a viable therapeutic means for normalizing glucose homeostasis in the overweight and diabetic (Bikman et al., 2012). In addition to that, 4-HPR could perturb retinoid metabolism. Kaylor et al. 2013 reported that 4-HPR was a competitive inhibitor of the Des 1 isomerase-2 function found in neural retina, with a K_i value of 8.5 μ M, using all-*trans*-retinol as a substrate. Moreover, 4-HPR modulates the expression of some retinoid homeostasis genes in adipose, liver and hypothalamus (McIlroy et al., 2013). Whether this effect is a response to inhibition of Des1 has not been examined.

4.1.2. Resveratrol

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene) (Fig. 4), is a dietary polyphenol with well recognized antioxidant and health beneficial properties (Pervaiz and Holme, 2009). In addition to thousands of research papers related to resveratrol, approximately 300 review articles have been published. Amongst other actions, resveratrol has been reported to exhibit anti-inflammatory and antifibrotic effects (Conte et al., 2015), antitumor activities (Han et al., 2015; Signorelli and Ghidoni, 2005), protection in renal disease (Albertoni and Schor, 2015) and neurodegeneration (Tellone et al., 2015), activity against obesity (De Ligt et al., 2015), diabetes (Szkudelski and Szkudelska, 2015), stroke (Nabavi et al., 2014), hepatic steatosis (Aguirre et al., 2014) and cardiovascular diseases (Tang et al., 2014).

In relation to sphingolipids, it has been reported that resveratrol might kill chronic myelogenous leukemia cells (Kartal et al., 2011) and promyelocytic leukemia cells (Cakir et al., 2011) through increasing intracellular generation and accumulation of apoptotic Cer. In most of the cancer cell lines tested, resveratrol arrests cell cycle in G1/S phase, blocks proliferation (Dolfini et al., 2007) and under prolonged treatment, induces apoptotic cell death by Cer accumulation (Cakir et al., 2011; Scarlatti et al., 2008). Inhibition of sphingosine kinase 1, a key regulator of sphingolipid metabolism whose alterations have been linked to many hyperproliferative diseases, may be partly involved in the cytotoxicity of resveratrol (Lim et al., 2012).

Besides inhibiting SKI, resveratrol has been reported to inhibit Des1. In gastric cancer SNU-1 cells, resveratrol mildly inhibited Des1 activity compared to the specific inhibitor GT-11 or to 4-HPR; however, resveratrol alone exhibited a typical cell cycle arrest pattern, which GT-11 did not alter, indicating that inhibition of Des1 is not essential to the cytotoxicity induced by the combination of resveratrol and sphingolipid metabolites (Shin et al., 2012). In contrast, inhibition of Des1 by resveratrol and the resulting increase in intracellular dhCer has been reported to be involved in autophagy induction in gastric cancer HGC27 cells (Signorelli et al., 2009). In this cell line, we have shown that resveratrol inhibits Des1 both in intact cells and *in vitro* and it induces autophagy after an increase in dhCer (Signorelli et al., 2009). These experiments support that resveratrol-induced autophagy occurs, at least in part, as a result of Des1 inhibition in some cell models. As a phenolic compound, resveratrol may inhibit Des1 in an indirect manner by altering the redox status of cells (Hsieh and Wu, 2010).

4.1.3. Celecoxib

Celecoxib (4-[5-(4-methylphenyl)-3-(trifluoromethyl) pyrazol-1-yl]benzenesulfonamide) (Fig. 4) is a highly selective cyclooxygenase 2 inhibitor with potent cyclooxygenase 2-independent anti-tumor activities in a wide variety of human epithelial tumors (Jendrosseck, 2013; Patel et al., 2005). Celecoxib has been reported to inhibit Des1 in intact cells with an IC_{50} of about 80 μ M (Schiffmann et al., 2009). Treatment of several cancer cell lines with celecoxib induces significant increase in dhCer while

depleting levels of Cer in a time and concentration manner. However, the dhCer conversion to the apoptotic Cer results in cell death (Schiffmann et al., 2010). Des1 inhibition by celecoxib seems to contribute to its anti-proliferative effects (Schiffmann et al., 2009) because treatment with myriocin, a serine palmitoyltransferase inhibitor, diminished the antiproliferative potency of celecoxib. Its effects on cell viability include cell cycle arrest in G1/G0 phase, and apoptosis and autophagy induction (Huang and Sinicrope, 2010). Liu et al. demonstrated that celecoxib induces apoptosis and autophagy in gastric cancer cells through the phosphatidylinositol 3-kinase B signaling pathway (Liu et al., 2014).

4.1.4. THC

Δ^9 -tetrahydrocannabinol (THC) ((6aR,10aR)-6,6,9-trimethyl-3-pentyl-6a,7,8,10a-tetrahydro-6 *H*-benzo[*c*]chromen-1-ol) is one of the major bioactive components of *Cannabis sativa* (Pertwee, 2008) (Fig. 4). THC and other cannabinoid-based drugs such as cannabidiol, HU-211, and ajulemic acid have been tested and found moderately effective in clinical trials of multiple sclerosis, traumatic brain injury, arthritis, and neuropathic pain (Klein and Newton, 2007). Furthermore, preclinical data with cannabinoid-based drugs suggest efficacy in other inflammatory diseases such as inflammatory bowel disease, Alzheimer's disease, atherosclerosis, and osteoporosis (Klein and Newton, 2007). Furthermore, several lines of evidence support an antitumorigenic effect of cannabinoids, which have been reported to possess anti-proliferative and pro-apoptotic effects and they are known to interfere with tumour neovascularization, cancer cell migration, adhesion, invasion and metastasization (Massi et al., 2013; Velasco et al., 2007). However, the clinical use of THC and additional cannabinoid agonists is often limited by their unwanted psychoactive side effects, and for this reason interest in non-psychoactive cannabinoid compounds with structural affinity for THC.

The excellent studies carried out by the group of Velasco and Guzman have helped to clarify the molecular mechanisms involved in THC antitumoral action (Armstrong et al., 2015; Blázquez et al., 2008; Carracedo et al., 2006a, 2006b; Gómez del Pulgar et al., 2002; Lorente et al., 2011a; Salazar et al., 2013, 2009a, 2009b; Vara et al., 2011; Velasco et al., 2007). Briefly, THC exerts its effect via the *de novo* synthesis of the sphingolipid Cer (Gómez del Pulgar et al., 2002), leading to the activation of the stress-regulated protein p8 and further ER stress with induction of *tribbles*-related protein 3 (TRB3) (Carracedo et al., 2006a, 2006b). The role of TRB3 in linking ER stress to autophagy followed by apoptosis in cannabinoid anti-tumoral action was later disclosed in different cell models (Salazar et al., 2013, 2009a; Vara et al., 2011). In glioma and pancreatic cancer cells, this occurs by TRB3-dependent inhibition of protein kinase B/mammalian target of rapamycin complex 1 signaling (Carracedo et al., 2006b; Salazar et al., 2009b), while noncanonical autophagy is involved in melanoma cells (Armstrong et al., 2015). Finally, the growth factor midkine Mdk was identified as a pivotal factor involved in the resistance of glioma cells to THC pro-autophagic and antitumoral action. Mdk protective effect is mediated via the anaplastic lymphoma kinase receptor and final interference with autophagic cell death (Lorente et al., 2011a,b).

THC inhibits Des1 in rat liver microsomes with an IC_{50} of 23 μ M (Muñoz Olaya et al., unpublished). Whether dhCer is involved in THC antitumor activity is being currently investigated.

4.1.5. γ -Tocopherol and γ -tocotrienol

γ -Tocopherol ((2 *R*)-2,7,8-trimethyl-2-[(4 *R*,8 *R*)-4,8,12-trimethyltridecyl]-6-chromanol) and γ -tocotrienol (*R*)- γ -tocotrienol, [*R*-(*E,E*)]-3,4-dihydro-2,7,8-trimethyl-2-(4,8,12-trimethyl-3,7,11-tridecatrienyl)-2 *H*-1-benzopyran-6-ol) (Fig. 4) are natural

components of vitamin E. Apart from the well known antioxidant properties of, there is increasing evidence supporting their additional function in lowering of blood cholesterol levels, and anticancer and neuroprotective action, especially in the case of tocotrienols (Jiang, 2014). Briefly, γ -tocopherol and γ -tocotrienol have been reported to have a role in disease prevention and therapy (Jiang, 2014), with γ -tocotrienol exhibiting the best properties. Thus, tocotrienols have been successfully employed in cancer therapy. For instance, different studies have recently reported that tocotrienols at 40 μ M have cytotoxic effects in human breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231, which is associated with autophagy induction and ER stress-mediated apoptosis (Jiang et al., 2012; Tiwari et al., 2015). Furthermore, tocotrienols have been successfully used as anticancer agents in combination therapies (Abdul Rahman et al., 2014; Kani et al., 2013; Malaviya and Sylvester, 2013; Rezaei et al., 2014; Sylvester et al., 2011; Tiwari et al., 2015; Tuerdi et al., 2013; Yusof et al., 2015), as agents against cardiovascular diseases (Prasad, 2011) and as radioprotectors in patients undergoing radiotherapy (Kulkarni et al., 2010; Singh et al., 2013).

A few articles link the anticancer properties of γ -tocopherol and γ -tocotrienol to sphingolipid metabolism. Thus, it has been described that both γ -tocopherol (Gopalan et al., 2012; Jiang et al., 2004a) and γ -tocotrienol (Gopalan et al., 2012; Jiang et al., 2012) induce apoptosis and autophagy in prostate cancer cells (Jiang et al., 2012). These effects are preceded by a pronounced dhCer and dhSo accumulation and the administration of myriocin or fumonisin B1, specific inhibitors of serine palmitoyltransferase and dihydroceramide synthase, respectively, in the *de novo* synthesis of sphingolipids, significantly protected cells from γ -tocopherol-induced cell death (Jiang et al., 2004b). γ -Tocopherol is a moderate inhibitor of Des 1, since its incubation at 100 μ M with LNCaP cells for 36 h elicited a 60% reduction in Des1 activity (Zheng et al., 2006). γ -Tocotrienol is a better Des1 inhibitor than γ -tocopherol (Ordoñez et al., unpublished).

Wang et al. 2015a showed that γ tocotrienol inhibits cytokine-triggered activation of nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NF- κ B) and its upstream regulator tumor growth factor- β -activated kinase-1 in murine RAW 264.7 macrophages and primary bone marrow-derived macrophages. In these cells, γ tocotrienol induced upregulation of A20, an inhibitor of NF- κ B. In search of the reason for A20 upregulation, the authors found that γ -tocotrienol treatment increased the phosphorylation of nuclear factors indicative of induction of endoplasmic reticulum stress. These effects occurred with enhancement of intracellular dhCer and chemical inhibition of *de novo* sphingolipid synthesis partially reversed γ -tocotrienol's induction of A20 and the anti-NF- κ B effect. The importance of dhCer increase in this model is further supported by the observation that *N*-octanoylsphingosine mimicked γ -tocotrienol in upregulating A20, enhancing endoplasmic reticulum stress, and attenuating tumor necrosis factor-triggered NF- κ B activation. This study identifies a novel anti-NF- κ B mechanism where A20 is induced by stress-induced adaptive response as a result of modulation of SLs, and it demonstrates an immunomodulatory role of dhCer.

4.1.6. Curcumin

Curcumin ((1*E*,6*E*)-1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) is a natural bioactive component isolated from turmeric (*Curcuma longa*) (Fig. 4). Research for more than two decades has revealed the pleiotropic nature of the biological effects of this molecule. More than 7000 published articles have shed light on the various aspects of curcumin, including its antioxidant, hypoglycemic, anti-inflammatory and anti-cancer activities (Ghosh et al., 2015). Apart from these well-known actions, this natural compound also exerts its beneficial effects by modulating

different signalling molecules including transcription factors, tumour suppressor genes, chemokines, cytokines, etc. By modulating these molecules curcumin has been shown to be beneficial to treat conditions such as diabetes (Meng et al., 2013), cancer (Devassy et al., 2015), Alzheimer's disease (Chin et al., 2013; Hamaguchi et al., 2010), cardiovascular diseases (Wongcharoen and Phrommintikul, 2009), liver fibrogenesis (Tang, 2015), inflammatory bowel disease (Vecchi Brumatti et al., 2014) and chronic kidney disease (Ghosh et al., 2014).

Although ROS generation and c-Jun *N*-terminal kinase activation is the main axis leading to curcumin proapoptotic action in colon cancer cell lines, endogenous Cer generation by curcumin also contributes to cytotoxicity. A study describes a novel signaling pathway by which curcumin induces ROS-dependent, prostate apoptosis response-4 activation and Cer generation, leading to autophagic cell death in human malignant glioma cells (Thayyulathil et al., 2014). In another study, curcumin is reported to suppress the growth of human leukemic cells via ROS-independent reduced glutathione depletion, which leads to caspase activation, inhibition of sphingomyelin synthase activity, and induction of Cer generation. These findings are consistent with reduced glutathione regulating caspase-dependent inhibition of sphingomyelin synthase activity, Cer generation, and apoptosis in human leukemic cells (Kizhakkayil et al., 2012). Cer accumulation appears to be also responsible for curcumin-induced cytotoxicity in prostate cancer PC3 cells. Cer build up then damages the mitochondria resulting in apoptosis, which is mediated by the apoptosis-inducing factor and other caspase-independent processes (Hilchie et al., 2010). Also in fibroblasts, curcumin-induced apoptosis is caspase-independent and relies on the mitochondrial formation of ROS and the subsequent nuclear translocation of the apoptosis-inducing factor, which is released from the mitochondrial pores through the concerted action of Bax, the voltage-dependent anion-selective channel and possibly Cer (Scharstuhl et al., 2009). On the other hand, curcumin's apoptosis-inducing effects in colon cancer cell lines are accompanied by robust Cer generation through *de novo* synthesis and curcumin-induced cell death is partly reversed by myriocin (Moussavi et al., 2006).

Recently, it has been reported that in human leukemia HL60 cells and their HL60/VCR multidrug-resistant counterparts, curcumin induced apoptosis by provoking an early generation of Cer by activation of neutral sphingomyelinase 2 followed by later enhancement of Cer levels via inhibition of sphingomyelin synthase (Shakor et al., 2014).

Recent published studies indicate that agents that enhance intracellular Cer levels would enhance curcumin-induced tumor cell cytotoxicity and apoptosis. This is the case of inhibitors of glucosylceramide synthase (Yu et al., 2012) and sphingosine kinase (Yang et al., 2012). Furthermore, *N*-hexanoylsphingosine potentiates curcumin-induced cell death and apoptosis in melanoma cell lines *in vitro* (Yu et al., 2010).

We found that curcumin caused a 28% inhibition of Des 1 activity in human gastric adenocarcinoma HGC27 cell lysates at 10 μ M (Fabrias et al., 2012) and, as a phenolic compound, we speculate that inhibition occurs indirectly at either the electron transport chain level or by altering the redox status of the cell. Although no actions of curcumin have been linked to increases in dhCer, besides the article by Kizhakkayil et al. (Kizhakkayil et al., 2012) mentioned above, other articles report that curcumin induces autophagy, mostly in cancer models. For instance, in U87-MG and U373-MG malignant glioma cells curcumin induced G2/M cell cycle arrest and autophagy but not apoptosis, by inhibition of the protein kinase B/mammalian target of rapamycin/70-kDa ribosomal protein S6 kinase axis and activation of the extracellular regulated kinase pathway. This drug also inhibited tumor growth significantly and induced autophagy in a

subcutaneous xenograft model of U87-MG cells (Aoki et al., 2007). On the other hand, curcumin induces autophagy in ACC-MESO-1 cells (Yamauchi et al., 2012), promotes autophagic survival of a subset of colon cancer stem cells (Kantara et al., 2014), it induces autophagy via activating the AMP-activated protein kinase signaling pathway in A549 human lung adenocarcinoma cells (Xiao et al., 2013) and decreases survival of oral cancer cells by inducing ROS-mediated autophagy (Kim et al., 2012). Moreover, curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells (Mosieniak et al., 2012) and promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy (Zhuang et al., 2012). In non-cancerous models, curcumin induces autophagy in human umbilical vein endothelial cells and protects them from oxidative stress damage. This effect occurs through a new protective mechanism involving forkhead box protein O1 and may arise as a therapeutic target for the treatment of oxidative stress-related cardiovascular diseases (Han et al., 2012). Finally, curcumin induces of autophagy by downregulating phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin signaling pathway in neurons from Alzheimer's disease animal models, which results in inhibition of A β generation and a neuroprotective effect (Wang et al., 2014).

Although curcumin inhibits Des1 and dhCer appear to be involved in induction of autophagy, whether dhCer is implicated in curcumin-induced autophagy in selected models and experimental setups is still unexplored.

The application of curcumin is extremely limited because of its low bioavailability related to its insolubility in water as well as its poor absorption and rapid metabolism. This limitation has boosted the search for formulations for efficient curcumin administration. Chen and coworkers have demonstrated that borneol, which had been shown to be a very effective penetration enhancer and to improve bioavailability of drugs, effectively synergized with curcumin to enhance its antiproliferative proapoptotic activity in A375 human melanoma cells (Chen et al., 2014), whereas in HepG2 cells, the mixture induced reactive oxygen species (ROS) generation and cell cycle arrest in G2/M phase (Chen et al., 2015). Liposomes have also been tested as curcumin delivery systems. In this regard, Dhule and coworkers reported that liposomes containing curcumin in combination with *N*-hexanoylsphingosine showed 1.5 times enhanced cytotoxicity in osteosarcoma cell lines than curcumin-containing liposomes alone. Importantly, *N*-hexanoylsphingosine/curcumin liposomes were found to be less toxic on untransformed primary human cells (human mesenchymal stem cells) than in osteosarcoma cell lines (Dhule et al., 2014).

4.1.7. SKI II

Recently we have reported that the dual sphingosine kinase 1-2 inhibitor SKI II (4-[[4-(4-chlorophenyl)-2-thiazolyl]amino]phenol) (Fig. 4) is also a noncompetitive inhibitor ($K_i = 0.3 \mu\text{M}$) of Des1 activity (Cingolani et al., 2014). Molecular modeling studies supported that the SKI II-induced decrease in Des1 activity could result from inhibition of NADH-cytochrome b5 reductase. Treatment of HGC 27 cells with SKI II resulted in decreased S1P levels and increased amounts of dhCer. Levels of Cer also augmented, probably from acylation of sphingosine, which did not accumulate despite sphingosine kinase inhibition. Finally, SKI II, but not the SK1-specific inhibitor PF-543, reduced cell proliferation with accumulation of cells in the G0/G1 phase. Also, SKI II, but not PF543, induced autophagy. Hence, the effects of SKI II on the cell cycle (longer duration/arrest of the G0/G1 phase) and autophagy observed by us and other groups are probably a consequence of Des1 rather than SK inhibition.

4.2. Sphingolipid analogs

4.2.1. GT11

The first reported synthesized inhibitor of Des1 was compound GT11 (also named C8-cyclopropenylceramide) (Fig. 5) (Triola et al., 2001). This cyclopropene-containing sphingolipid carries out a competitive inhibition against the substrate with a K_i of $6 \mu\text{M}$ (Triola et al., 2003) and it is active both *in vitro* and in intact cells (Kravcka et al., 2007; Triola et al., 2004). Structure-activity relationship studies showed that the natural 2*S*,3*R* stereochemistry, the presence of a free hydroxyl function at C1 and the cyclopropene ring in place of the Cer double bond in the molecule are essential for the desaturase inhibition (Triola et al., 2003). Furthermore, urea, thiourea and α -ketoamide analogs keep the inhibitory activity of GT11, although with lower potency, while loss of inhibition occurs with *N*-methyl substitution or replacement of the amide by a carbamate function (Bedia et al., 2005). In primary cultured cerebellar neurons, Des1 was efficiently inhibited by GT11 with an IC_{50} of 23 nM. However, at higher concentrations ($\geq 5 \mu\text{M}$), GT11 provoked an accumulation of long chain base phosphates, suggesting a decreased activity of sphingosine 1-phosphate lyase. The accumulated sphingoid base phosphates, in turn, down-regulate serine palmitoyltransferase activity, thus decreasing sphingolipid biosynthesis *de novo* (Triola et al., 2004). A derivative of GT11 was used to assess the interest of Des1 as a therapeutic target against HIV-1 infection (Vieira et al., 2010). We described that incubation of Tzm-bl cells with a GT11 derivative produced an increase of dihydrospingomyelins in lipid rafts, which results in the rigidification of these microdomains and an

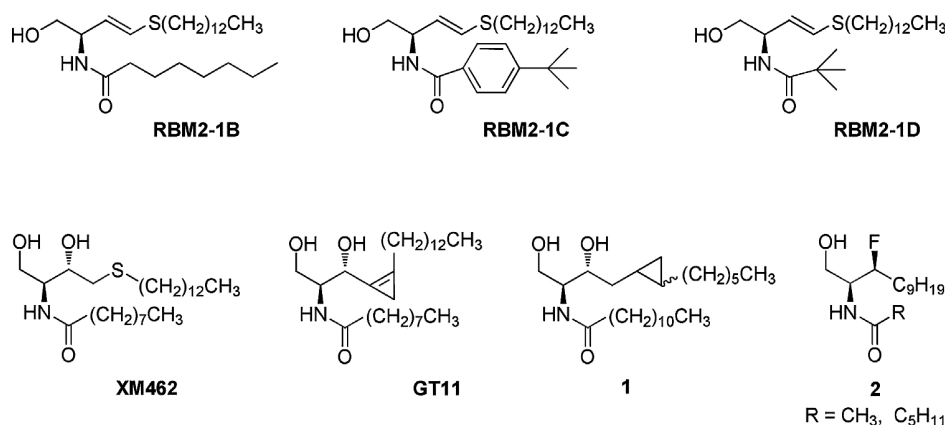


Fig. 5. Chemical structure of sphingolipid analogs reported as Des1 inhibitors.

increased resistance to the insertion of the viral gp41 fusion peptide, thus inhibiting fusion of the viral and cellular membranes and impairing viral entry. These results identified Des1 as a potential therapeutic target for combating HIV-1 infection (Vieira et al., 2010). Moreover, Kaylor et al. (Kaylor et al., 2013) reported that the Des1 isomerase-2 activity found in neural retina was dose-dependently inhibited by GT11. This compound elicited a 45% inhibition at 10 μM , using all-*trans*-retinol as a substrate.

4.2.2. XM462

A 5-thiadihydroceramide named XM462 was designed in our group, based on the mechanism of Des1 desaturation (Fig. 5) (Munoz-Olaya et al., 2008). This molecule possesses a sulfur atom instead of the C5 methylene group of the enzyme substrate. XM462 inhibits Des1 both *in vitro* (IC_{50} =8.2 μM in rat liver microsomes) and in intact cells (IC_{50} =0.43 μM in human leukemia Jurkat A3 cells) (Munoz-Olaya et al., 2008). A few analogs of the Des1 inhibitor XM462 have also been synthesized and tested (Fig. 5) (Camacho et al., 2012). These compounds inhibit both Des1 and acid ceramidase *in vitro* and in intact cells, but with different potencies depending on the *N*-acyl moiety. Although their IC_{50} values were in the μM range, none of them was more potent than XM462. XM462 has been used as a pharmacological tool to show the role of dhCer as inducer of autophagy in human gastric cancer cell line HGC27. We demonstrated that XM462, at concentrations that did not modify cell viability, produced an accumulation of dhCer, and this accumulation was associated with cyclin D1 expression modulation, delayed G1/S transition of cell cycle via activation of ER stress and autophagy induction (Gagliostro et al., 2012; Signorelli et al., 2009).

4.2.3. Other analogs

A C12-dihydroceramide analogue with a cyclopropane ring at C-5 and C-6 has been described (1, Fig. 5) and shown to inhibit Des1 activity, although to a much lesser extent than GT11, in cultured keratinocytes (Brodesser and Kolter, 2011; Brodesser et al., 2003). On the other hand, two dhCer analogs with an allylic fluoride replacing 3-hydroxyl group have been reported (2, Fig. 5) (Jonghe et al., 2000). These compounds have been evaluated as potential inhibitors of Des1 by an *in vitro* assay using rat liver microsomes (Michel et al., 1997) showing a slight inhibition of the desaturase activity (9% when equimolar concentrations of the substrate and inhibitors were used).

5. Concluding remarks

The biological relevance of dhCer is currently well recognized and constitutes a field of active research. Besides the Des1 inhibitors mentioned above, other compounds the structure of which suggests that they might be endowed with Des1 inhibitory activity include rottlerin, genistein, quercetin, epi-gallocatechin gallate epicatechin gallate and emodin (Fig. 6), all of which have been reported to induce autophagy (Hasima and Ozpolat, 2014; Wang et al., 2015b). Whether Des1 inhibition and dhCer accumulation contribute to autophagy induction by these compounds is worth investigating.

Identification of other Des1 inhibitors as pharmacological hits would benefit from the availability of a Des1 activity high throughput screening assay, which should boost library screening. Chemists are encouraged to develop such an assay, as it should reveal novel Des1 inhibitors as hits for further medicinal chemistry studies. Medical conditions for which treatment with Des1 inhibitors may be beneficial include lipid raft dependent processes (i.e. viral infection and Alzheimer's disease) and conditions in which autophagy is defective and its induction would be beneficial. Besides cancer, the latter include some neurodegenerative diseases. Moreover, the recent identification of Des1 as a retinol isomerase whose activity can be inhibited by GT11 suggests that Des1 may contribute to processes such as cell growth, differentiation, apoptosis and malignant transformation by increasing the synthesis of 9-*cis*-retinoic acid (Kaylor et al., 2013), reinforcing the interest of Des1 inhibitors against cancer.

The potential therapeutic interest of Des2 inhibitors is still obscure, although a relationship between Des2 and disease has been recently reported, specifically in psychiatric disorders. Using a large RNA sequencing database from postmortem dorsolateral prefrontal cortex of psychiatric patients and control subjects, Ohi et al. (Ohi et al., 2015) investigated the developmental expression pattern of a DEGS2 full-length transcript in and the association of specific single-nucleotide polymorphism around DEGS2 with DEGS2 expression. The authors demonstrate that a DEGS2 polymorphism associated with cognition in schizophrenia is associated with DEGS2 expression in dorsolateral prefrontal cortex, which may have a role in the cognitive impairments noted in psychiatric disorders. Future studies will likely reveal other implications of Des2 in disease and, as occurred for the Des1 homologue, will probably validate Des2 as a therapeutic target.

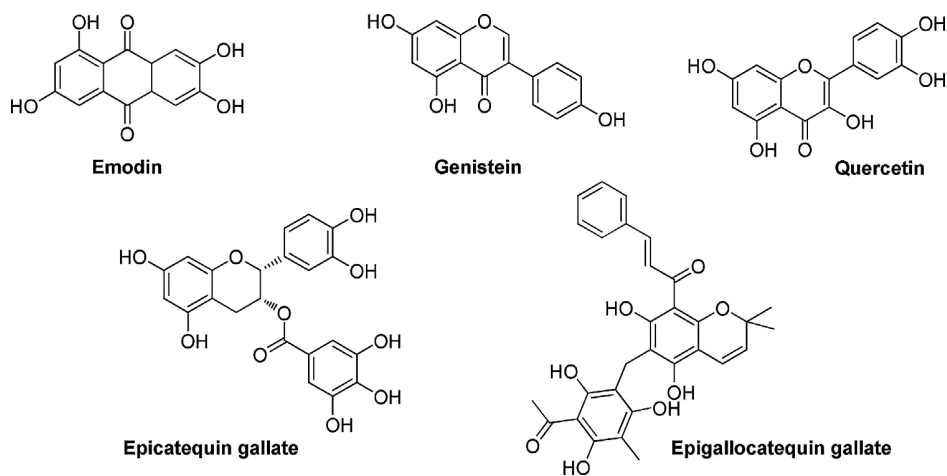


Fig. 6. Chemical structure of putative Des1 inhibitors.

Acknowledgments

Partial financial support from the “Ministerio de Ciencia e Innovación”, Spain (Grants SAF2011-22444 and CTQ2014-54743-R) and Fundació Marató TV3 (Grant 112130 and 112132) are acknowledged. PhD fellowships from SENESCYT-Ecuador to Y.F.O and MINECO to AP are also acknowledged.

References

- Abdul Rahman, A., Jamal, A.R.A., Harun, R., Mohd Mokhtar, N., Wan Ngah, W.Z., 2014. Gamma-tocotrienol and hydroxy-chavicol synergistically inhibits growth and induces apoptosis of human glioma cells. *BMC Complement. Altern. Med.* 14, 213. doi:http://dx.doi.org/10.1186/1472-6882-14-213.
- Aguirre, L., Portillo, M.P., Hijona, E., Bujanda, L., 2014. Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World J. Gastroenterol.* 20, 7366–7380. doi:http://dx.doi.org/10.3748/wjg.v20.i23.7366.
- Albertoni, G., Schor, N., 2015. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease—mini-review. *J. Bras. Nefrol.* 37, 106–114. doi:http://dx.doi.org/10.5935/0101-2800.20150015.
- Aoki, H., Takada, Y., Kondo, S., Sawaya, R., Aggarwal, B.B., Kondo, Y., 2007. Evidence that curcumin suppresses the growth of malignant gliomas in vitro and in vivo through induction of autophagy: role of Akt and extracellular signal-regulated kinase signaling pathways. *Mol. Pharmacol.* 72, 29–39. doi:http://dx.doi.org/10.1124/mol.106.033167.
- Apraiz, A., Idkowiak-Baldys, J., Nieto-Rementería, N., Boyano, M.D., Hannun, Y.A., Asumendi, A., 2012. Dihydroceramide accumulation and reactive oxygen species are distinct and nonessential events in 4-HPR-mediated leukemia cell death. *Biochem. Cell Biol.* 90, 209–223. doi:http://dx.doi.org/10.1139/o2012-001.
- Armstrong, J.L., Hill, D.S., McKee, C.S., Hernandez-Tiedra, S., Lorente, M., Lopez-Valero, I., Eleni Anagnostou, M., Babatunde, F., Corazzari, M., Redfern, C.P., Velasco, G., Lovat, P.E., 2015. Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death. *J. Invest. Dermatol.* doi:http://dx.doi.org/10.1038/jid.2015.45.
- Beauchamp, E., Goenaga, D., Le Bloc'h, J., Catheline, D., Legrand, P., Rioux, V., 2007. Myristic acid increases the activity of dihydroceramide delta4-desaturase 1 through its N-terminal myristoylation. *Biochimie* 89, 1553–1561. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2007.07.001.
- Beauchamp, E., Tekpli, X., Martel, G., Lagadic-Gossmann, D., Legrand, P., Rioux, V., 2009. N-myristoylation targets dihydroceramide delta4-desaturase 1 to mitochondria: partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid. *Biochimie* 91, 1411–1419. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2009.07.014.
- Beckmann, C., Rattke, J., Sperling, P., Heinz, E., Boland, W., 2003. Stereochemistry of a bifunctional dihydroceramide delta 4-desaturase/hydroxylase from *Candida albicans*; a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Org. Biomol. Chem.* 1, 2448–2454.
- Bedia, C., Triola, G., Casas, J., Llebaria, A., Fabriàs, G., 2005. Analogs of the dihydroceramide desaturase inhibitor GT11 modified at the amide function: synthesis and biological activities. *Org. Biomol. Chem.* 3, 3707–3712. doi:http://dx.doi.org/10.1039/b510198k.
- Bikman, B.T., Guan, Y., Shui, G., Siddique, M.M., Holland, W.L., Kim, J.Y., Fabriàs, G., Wenk, M.R., Summers, S.A., 2012. Fenretinide prevents lipid-induced insulin resistance by blocking ceramide biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 287, 17426–17437. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M112.359950.
- Blázquez, C., Salazar, M., Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., González-Feria, L., Haro, A., Velasco, G., Guzmán, M., 2008. Cannabinoids inhibit glioma cell invasion by down-regulating matrix metalloproteinase-2 expression. *Cancer Res.* 68, 1945–1952. doi:http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-5176.
- Brockman, H.L., Momsen, M.M., Brown, R.E., He, L., Chun, J., Byun, H.-S., Bittman, R., 2004. The 4,5-double bond of ceramide regulates its dipole potential, elastic properties, and packing behavior. *Biophys. J.* 87, 1722–1731. doi:http://dx.doi.org/10.1529/biophysj.104.044529.
- Brodesser, S., Kolter, T., 2011. Dihydroceramide desaturase inhibition by a cyclopropanated dihydroceramide analog in cultured keratinocytes. *J. Lipids* 2011, 724015. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2011/724015.
- Brodesser, S., Sawatzki, P., Kolter, T., 2003. Bioorganic chemistry of ceramide. *Eur. J. Org. Chem.* 2003, 2021–2034. doi:http://dx.doi.org/10.1002/ejoc.200200518.
- Buist, P.H., 2004. Fatty acid desaturases: selecting the dehydrogenation channel. *Nat. Prod. Rep.* 21, 249–262. doi:http://dx.doi.org/10.1039/b302094k.
- Cadena, D.L., Kurten, R.C., Gill, G.N., 1997. The product of the MLD gene is a member of the membrane fatty acid desaturase family: overexpression of MLD inhibits EGF receptor biosynthesis. *Biochemistry* 36, 6960–6967. doi:http://dx.doi.org/10.1021/bi9700911.
- Cakir, Z., Saydam, G., Sahin, F., Baran, Y., 2011. The roles of bioactive sphingolipids in resveratrol-induced apoptosis in HL60: acute myeloid leukemia cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 137, 279–286. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00432-010-0884-x.
- Camacho, L., Simbari, F., Garrido, M., Abad, J.L., Casas, J., Delgado, A., Fabriàs, G., 2012. 3-Deoxy-3,4-dehydro analogs of XM462. Preparation and activity on sphingolipid metabolism and cell fate. *Bioorg. Med. Chem.* 20, 3173–3179. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bmc.2012.03.073.
- Carracedo, A., Gironella, M., Lorente, M., García, S., Guzmán, M., Velasco, G., Iovanna, J.L., 2006a. Cannabinoids induce apoptosis of pancreatic tumor cells via endoplasmic reticulum stress-related genes. *Cancer Res.* 66, 6748–6755. doi:http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0169.
- Carracedo, A., Lorente, M., Egia, A., Blázquez, C., García, S., Giroux, V., Malicet, C., Villuendas, R., Gironella, M., González-Feria, L., Piris, M.A., Iovanna, J.L., Guzmán, M., Velasco, G., 2006b. The stress-regulated protein p8 mediates cannabinoid-induced apoptosis of tumor cells. *Cancer Cell* 9, 301–312. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ccr.2006.03.005.
- Chen, J., Li, L., Su, J., Li, B., Chen, T., Wong, Y.-S., 2014. Synergistic apoptosis-inducing effects on A375 human melanoma cells of natural borneol and curcumin. *PLoS One* 9, e101277. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0101277.
- Chen, J., Lin, L., Su, J., Li, B., Zhang, X., Chen, T., 2015. Proteomic analysis of G2/M arrest triggered by natural borneol/curcumin in HepG2 cells, the importance of ROS-p 53 pathway. *J. Agric. Food Chem.* doi:http://dx.doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01773.
- Chin, D., Huebber, P., Pallauf, K., Rimbach, G., 2013. Neuroprotective properties of curcumin in Alzheimer's disease—merits and limitations. *Curr. Med. Chem.* 20, 3955–3985.
- Cingolani, F., Casasampere, M., Sanllehi, P., Casas, J., Bujons, J., Fabriàs, G., 2014. Inhibition of dihydroceramide desaturase activity by the sphingosine kinase inhibitor SKI II. *J. Lipid Res.* 55, 1711–1720. doi:http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M049759.
- Conte, E., Fagone, E., Fruciano, M., Gili, E., Iemmolo, M., Vancheri, C., 2015. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of resveratrol in the lung. *Histol. Histopathol.* 30, 523–529.
- De Ligt, M., Timmers, S., Schrauwen, P., 2015. Resveratrol and obesity: can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1137–1144. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.11.012.
- Devassy, J.G., Nwachukwu, I.D., Jones, P.J.H., 2015. Curcumin and cancer: barriers to obtaining a health claim. *Nutr. Rev.* 73, 155–165. doi:http://dx.doi.org/10.1093/nutrit/nuu064.
- Devlin, C.M., Lahm, T., Hubbard, V.C., Van Demark, M., Wang, K.C., Wu, X., Bielawska, A., Obeid, L.M., Ivan, M., Petrace, I., 2011. Dihydroceramide-based response to hypoxia. *J. Biol. Chem.* 286, 38069–38078. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.297994.
- Dhule, S.S., Penforis, P., He, J., Harris, M.R., Terry, T., John, V., Pochampally, R., 2014. The combined effect of encapsulating curcumin and C6 ceramide in liposomal nanoparticles against osteosarcoma. *Mol. Pharm.* 11, 417–427. doi:http://dx.doi.org/10.1021/mp400366f.
- Dolfini, E., Roncoroni, L., Dogliotti, E., Sala, G., Erba, E., Sacchi, N., Ghidoni, R., 2007. Resveratrol impairs the formation of MDA-MB-231 multicellular tumor spheroids concomitant with ceramide accumulation. *Cancer Lett.* 249, 143–147. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2006.08.013.
- Endo, K., Akiyama, T., Kobayashi, S., Okada, M., 1996. Degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis. *Mol. Gen. Genet.* 253, 157–165.
- Enomoto, A., Omae, F., Miyazaki, M., Kozutsumi, Y., Yubisui, T., Suzuki, A., 2006. Dihydroceramide: sphinganine C-4-hydroxylase requires Des2 hydroxylase and the membrane form of cytochrome b5. *Biochem. J.* 397, 289–295. doi:http://dx.doi.org/10.1042/BJ20051938.
- Erdeich-Epstein, A., Tran, L.B., Bowman, N.N., Wang, H., Cabot, M.C., Durden, D.L., Vlckova, J., Reynolds, C.P., Stins, M.F., Groshen, S., Millard, M., 2002. Ceramide signaling in fenretinide-induced endothelial cell apoptosis. *J. Biol. Chem.* 277, 49531–49537. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M209962200.
- Ezanno, H., le Bloc'h, J., Beauchamp, E., Lagadic-Gossmann, D., Legrand, P., Rioux, V., 2012. Myristic acid increases dihydroceramide (4-desaturase 1 (DES1) activity in cultured rat hepatocytes. *Lipids* 47, 117–128. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11745-011-3638-x.
- Fabriàs, G., Muñoz-Olaya, J., Cingolani, F., Signorelli, P., Casas, J., Gagliostro, V., Ghidoni, R., 2012. Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: debutant players in the sphingolipid arena. *Prog. Lipid Res.* 51, 82–94. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.plipres.2011.12.002.
- Gagliostro, V., Casas, J., Caretti, A., Abad, J.L., Tagliavacca, L., Ghidoni, R., Fabriàs, G., Signorelli, P., 2012. Dihydroceramide delays cell cycle G1/S transition via activation of ER stress and induction of autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44, 2135–2143. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.08.025.
- Geeraert, L., Mannaerts, G.P., van Veldhoven, P.P., 1997. Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem. J.* 327 (Pt 1), 125–132.
- Ghosh, S., Banerjee, S., Sil, P.C., 2015. The beneficial role of curcumin on inflammation, diabetes and neurodegenerative disease: a recent update. *Food Chem. Toxicol.* 83, 111–124. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2015.05.022.
- Ghosh, S.S., Gehr, T.W.B., Ghosh, S., 2014. Curcumin and chronic kidney disease (CKD): major mode of action through stimulating endogenous intestinal alkaline phosphatase. *Molecules* 19, 20139–20156. doi:http://dx.doi.org/10.3390/molecules191220139.
- Gómez del Pulgar, T., Velasco, G., Sánchez, C., Haro, A., Guzmán, M., 2002. De novo-synthesized ceramide is involved in cannabinoid-induced apoptosis. *Biochem. J.* 363, 183–188.
- Gopalan, A., Yu, W., Jiang, Q., Jang, Y., Sanders, B.G., Kline, K., 2012. Involvement of de novo ceramide synthesis in gamma-tocopherol and gamma-tocotrienol-induced apoptosis in human breast cancer cells. *Mol. Nutr. Food Res.* 56, 1803–1811. doi:http://dx.doi.org/10.1002/mnfr.201200350.
- Hail, N., Kim, H.J., Lotan, R., 2006. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis* 11, 1677–1694. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10495-006-9289-3.

- Hamaguchi, T., Ono, K., Yamada, M., 2010. REVIEW: curcumin and Alzheimer's disease. *CNS Neurosci. Ther.* 16, 285–297. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j1755-5949.2010.00147.x.
- Han, G., Xia, J., Gao, J., Inagaki, Y., Tang, W., Kokudo, N., 2015. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discov. Ther.* 9 (1), 1–12. doi:http://dx.doi.org/10.5582/dtd.2015.01007.
- Han, J., Pan, X.-Y., Xu, Y., Xiao, Y., An, Y., Tie, L., Pan, Y., Li, X.-J., 2012. Curcumin induces autophagy to protect vascular endothelial cell survival from oxidative stress damage. *Autophagy* 8, 812–825. doi:http://dx.doi.org/10.4161/aut.19471.
- Hasima, N., Ozpolat, B., 2014. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis.* 5, e1509. doi:http://dx.doi.org/10.1038/cddis.2014.467.
- Hilchie, A.L., Furlong, S.J., Sutton, K., Richardson, A., Robichaud, M.R.J., Giacomantonio, C.A., Ridgway, N.D., Hoskin, D.W., 2010. Curcumin-induced apoptosis in PC3 prostate carcinoma cells is caspase-independent and involves cellular ceramide accumulation and damage to mitochondria. *Nutr. Cancer* 62, 379–389. doi:http://dx.doi.org/10.1080/01635580903441238.
- Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., Nelson, D.H., Karathanasis, S.K., Fontenot, G.K., Birnbaum, M.J., Summers, S.A., 2007. Inhibition of ceramide synthesis ameliorates glucocorticoid-, saturated-fat-, and obesity-induced insulin resistance. *Cell Metab.* 5, 167–179. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2007.01.002.
- Hsieh, T., Wu, J.M., 2010. Resveratrol: biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *Biofactors* 36, 360–369. doi:http://dx.doi.org/10.1002/biof.105.
- Hu, W., Ross, J., Geng, T., Brice, S.E., Cowart, L.A., 2011. Differential regulation of dihydroceramide desaturase by palmitate versus monounsaturated fatty acids: implications for insulin resistance. *J. Biol. Chem.* 286, 16596–16605. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.186916.
- Huang, S., Sinicrope, F.A., 2010. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. *Autophagy* 6, 256–269.
- Idkowiak-Baldys, J., Apraiz, A., Li, L., Rahmaniyan, M., Clarke, C.J., Kravka, J.M., Asumendi, A., Hannun, Y.A., 2010. Dihydroceramide desaturase activity is modulated by oxidative stress. *Biochem. J.* 427, 265–274. doi:http://dx.doi.org/10.1042/BJ20091589.
- Jendrossek, V., 2013. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer Lett.* 332, 313–324. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2011.01.012.
- Jiang, Q., 2014. Natural forms of vitamin E: metabolism, antioxidant, and anti-inflammatory activities and their role in disease prevention and therapy. *Free Radic. Biol. Med.* 72, 76–90. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2014.03.035.
- Jiang, Q., Rao, X., Kim, C.Y., Freiser, H., Zhang, Q., Jiang, Z., Li, G., 2012. Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrospingosine and dihydroceramide. *Int. J. Cancer* 130, 685–693. doi:http://dx.doi.org/10.1002/ijc.26054.
- Jiang, Q., Wong, J., Fyrst, H., Saba, J.D., Ames, B.N., 2004a. Gamma-tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17825–17830. doi:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0408340102.
- Jiang, Q., Wong, J., Fyrst, H., Saba, J.D., Ames, B.N., 2004b. Gamma-tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 17825–17830. doi:http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0408340102.
- Johansson, H., Gandini, S., Guerrieri-Gonzaga, A., Iodice, S., Ruscica, M., Bonanni, B., Gulisano, M., Magni, P., Formelli, F., Decensi, A., 2008. Effect of fenretinide and low-dose tamoxifen on insulin sensitivity in premenopausal women at high risk for breast cancer. *Cancer Res.* 68, 9512–9518. doi:http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0553.
- Jonghe, S.D., Overmeire, I.V., Calenbergh, S.V., Hendrix, C., Busson, R., Keukeleire, D. D., Herdewijn, P., 2000. Synthesis of fluorinated sphinganine and dihydroceramide analogues. *Eur. J. Org. Chem.* 2000, 3177–3183. doi:http://dx.doi.org/10.1002/1099-0690(200009)2000:18<3177::AID-EJOC3177>3.0.CO;2-U.
- Kani, K., Momota, Y., Harada, M., Yamamura, Y., Aota, K., Yamanoi, T., Takano, H., Motegi, K., Azuma, M., 2013. γ -Tocotrienol enhances the chemosensitivity of human oral cancer cells to docetaxel through the downregulation of the expression of NF- κ B-regulated anti-apoptotic gene products. *Int. J. Oncol.* 42, 75–82. doi:http://dx.doi.org/10.3892/ijo.2012.1692.
- Kantara, C., O'Connell, M., Sarkar, S., Moya, S., Ullrich, R., Singh, P., 2014. Curcumin promotes autophagic survival of a subset of colon cancer stem cells, which are ablated by DCLK1-siRNA. *Cancer Res.* 74, 2487–2498. doi:http://dx.doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-13-3536.
- Kartal, M., Saydam, G., Sahin, F., Baran, Y., 2011. Resveratrol triggers apoptosis through regulating ceramide metabolizing genes in human K562 chronic myeloid leukemia cells. *Nutr. Cancer* 63, 637–644. doi:http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2011.538485.
- Kaylor, J.J., Yuan, Q., Cook, J., Sarfare, S., Makshanoff, J., Miu, A., Kim, A., Kim, P., Habib, S., Roybal, C.N., Xu, T., Nusinowitz, S., Travis, G.H., 2013. Identification of DES1 as a vitamin A isomerase in Müller glial cells of the retina. *Nat. Chem. Biol.* 9, 30–36. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.1114.
- Kim, J.Y., Cho, T.J., Woo, B.H., Choi, K.U., Lee, C.H., Ryu, M.H., Park, H.R., 2012. Curcumin-induced autophagy contributes to the decreased survival of oral cancer cells. *Arch. Oral Biol.* 57, 1018–1025. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.04.005.
- Kizhakkayil, J., Thayyullathil, F., Chathoth, S., Hago, A., Patel, M., Galadari, S., 2012. Glutathione regulates caspase-dependent ceramide production and curcumin-induced apoptosis in human leukemic cells. *Free Radic. Biol. Med.* 52, 1854–1864. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.02.026.
- Klein, T.W., Newton, C.A., 2007. Therapeutic potential of cannabinoid-based drugs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 601, 395–413.
- Kravka, J.M., Li, L., Szulc, Z.M., Bielawski, J., Ogretmen, B., Hannun, Y.A., Obeid, L.M., Bielawska, A., 2007. Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* 282, 16718–16728. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M700647200.
- Kulkarni, S., Ghosh, S.P., Hauer-Jensen, M., Kumar, K.S., 2010. Hematological targets of radiation damage. *Curr. Drug Targets* 11, 1375–1385.
- Li, F., Zhang, H., Sun, Y., Pan, Y., Zhou, J., Wang, J., 2013. Expanding the genetic code for photolabile chemistry in *E. coli*, mammalian cells, and *A. thaliana*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1–6. doi:http://dx.doi.org/10.1002/anie.201303477.
- Lim, K.G., Gray, A.I., Pyne, S., Pyne, N.J., et al., 2012. Resveratrol dimers are novel sphingosine kinase 1 inhibitors and affect sphingosine kinase 1 expression and cancer cell growth and survival. *Br. J. Pharmacol.* 166, 1605–1616. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j1476-5381.2012.01862.x.
- Liu, M., Li, C.-M., Chen, Z.-F., Ji, R., Guo, Q.-H., Li, Q., Zhang, H.-L., Zhou, Y.-N., 2014. Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric cancer cells. *Int. J. Mol. Med.* 33, 1451–1458. doi:http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2014.1713.
- Lorente, M., Torres, S., Salazar, M., Carracedo, A., Hernández-Tiedra, S., Rodríguez-Fornés, F., García-Taboada, E., Meléndez, B., Mollejo, M., Campos-Martín, Y., Barcia, J.A., Guzmán, M., Velasco, G., 2011a. Stimulation of ALK by the growth factor midkine renders glioma cells resistant to autophagy-mediated cell death. *Autophagy* 7, 1071–1073.
- Lorente, M., Torres, S., Salazar, M., Carracedo, A., Hernández-Tiedra, S., Rodríguez-Fornés, F., García-Taboada, E., Meléndez, B., Mollejo, M., Campos-Martín, Y., Lakatos, S.A., Barcia, J., Guzmán, M., Velasco, G., 2011b. Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action. *Cell Death Differ.* 18, 959–973. doi:http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2010.170.
- Malaviya, A., Sylvestre, P.W., 2013. Mechanisms mediating the effects of γ -tocotrienol when used in combination with PPAR (agonists or antagonists on MCF-7 and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Int. J. Breast Cancer* 101705. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2013/101705.
- Mao, Z., Sun, W., Xu, R., Novgorodov, S., Szulc, Z.M., Bielawski, J., Obeid, L.M., Mao, C., 2010. Alkaline ceramidase 2 (ACER2) and its product dihydrospingosine mediate the cytotoxicity of *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide in tumor cells. *J. Biol. Chem.* 285, 29078–29090. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.105296.
- Massi, P., Solinas, M., Cinquina, V., Parolaro, D., 2013. Cannabidiol as potential anticancer drug. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 75, 303–312. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2125.2012.04298.x.
- Mata, N.L., Ruiz, A., Radu, R.A., Bui, T.V., ravis, G.H., 2005. Chicken retinas contain a retinoid isomerase activity that catalyzes the direct conversion of all-*trans*-retinol to 11-*cis*-retinol. *Biochemistry* 44, 11715–11721. doi:http://dx.doi.org/10.1021/bi050942m.
- Maurer, B.J., Melton, L., Billups, C., Cabot, M.C., Reynolds, C.P., 2000. Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide and modulators of ceramide metabolism. *J. Natl. Cancer Inst.* 92, 1897–1909.
- McIlroy, G.D., Delibegovic, M., Owen, C., Stoney, P.N., Shearer, K.D., McCaffery, P.J., Mody, N., 2013. Fenretinide treatment prevents diet-induced obesity in association with major alterations in retinoid homeostatic gene expression in adipose, liver, and hypothalamus. *Diabetes* 62, 825–836. doi:http://dx.doi.org/10.2337/db12-0458.
- Meng, B., Li, J., Cao, H., 2013. Antioxidant and antiinflammatory activities of curcumin on diabetes mellitus and its complications. *Curr. Pharm. Des.* 19, 2101–2113.
- Merrill, A.H., 2011. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem. Rev.* 111, 6387–6422. doi:http://dx.doi.org/10.1021/cr2002917.
- Michel, C., van Echten-Deckert, G., Rother, J., Sandhoff, K., Wang, E., Merrill, A.H., 1997. Characterization of ceramide synthesis. A dihydroceramide desaturase introduces the 4,5-*trans*-double bond of sphingosine at the level of dihydroceramide. *J. Biol. Chem.* 272, 22432–22437.
- Mody, N., McIlroy, G.D., 2014. The mechanisms of Fenretinide-mediated anti-cancer activity and prevention of obesity and type-2 diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 91, 277–286. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2014.07.012.
- Morad, S.A.F., Cabot, M.C., 2013. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer* 13, 51–65. doi:http://dx.doi.org/10.1038/nrc3398.
- Morales, M.-C., Pérez-Yarza, G., Rementería, N.N., Boyano, M.-D., Apraiz, A., Gómez-Muñoz, A., Pérez-Andrés, E., Asumendi, A., 2007. 4-HPR-mediated leukemia cell cytotoxicity is triggered by ceramide-induced mitochondrial oxidative stress and is regulated downstream by Bcl-2. *Free Radic. Res.* 41, 591–601. doi:http://dx.doi.org/10.1080/10715760701218558.
- Mosieniak, G., Adamowicz, M., Alster, O., Jaskowiak, H., Szczepankiewicz, A.A., Wilczynski, G.M., Ciechomska, I.A., Sikora, E., 2012. Curcumin induces permanent growth arrest of human colon cancer cells: link between senescence and autophagy. *Mech. Ageing Dev.* 133, 444–455. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.mad.2012.05.004.
- Moussavi, M., Assi, K., Gómez-Muñoz, A., Salh, B., 2006. Curcumin mediates ceramide generation via the de novo pathway in colon cancer cells. *Carcinogenesis* 27, 1636–1644. doi:http://dx.doi.org/10.1093/carcin/bgi371.

- Munoz-Olaya, J.M., Matabosch, X., Bedia, C., Egido-Gabas, M., Casas, J., Llebaria, A., Delgado, A., Fabrias, G., 2008. Synthesis and biological activity of a novel inhibitor of dihydroceramide desaturase. *ChemMedChem* 3, 946–953.
- Nabavi, S.F., Li, H., Daglia, M., Nabavi, S.M., 2014. Resveratrol and stroke: from chemistry to medicine. *Curr. Neurovasc. Res.* 11, 390–397.
- Ohi, K., Ursini, G., Li, M., Shin, J.H., Ye, T., Chen, Q., Tao, R., Kleinman, J.E., Hyde, T.M., Hashimoto, R., Weinberger, D.R., 2015. DEGS2 polymorphism associated with cognition in schizophrenia is associated with gene expression in brain. *Transl. Psychiatry* 5, e550. doi:http://dx.doi.org/10.1038/tp.2015.45.
- Omae, F., Miyazaki, M., Enomoto, A., Suzuki, M., Suzuki, Y., Suzuki, A., 2004. DES2 protein is responsible for phytoceramide biosynthesis in the mouse small intestine. *Biochem. J.* 379, 687–695. doi:http://dx.doi.org/10.1042/BJ20031425.
- Oridate, N., Suzuki, S., Higuchi, M., Mitchell, M.F., Hong, W.K., Lotan, R., 1997. Involvement of reactive oxygen species in N-(4-hydroxyphenyl) retinamide-induced apoptosis in cervical carcinoma cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 89, 1191–1198.
- Patel, M.I., Subbaramaiah, K., Du, B., Chang, M., Yang, P., Newman, R.A., Cordon-Cardo, C., Thaler, H.T., Dannenberg, A.J., 2005. Celecoxib inhibits prostate cancer growth: evidence of a cyclooxygenase-2-independent mechanism. *Clin. Cancer Res.* 11, 1999–2007. doi:http://dx.doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1877.
- Pertwee, R.G., 2008. The diverse CB1 and CB2 receptor pharmacology of three plant cannabinoids: delta9-tetrahydrocannabinol, cannabidiol and delta9-tetrahydrocannabinol. *Br. J. Pharmacol.* 153, 199–215. doi:http://dx.doi.org/10.1038/sj.bjp.0707442.
- Pervais, S., Holme, A.L., 2009. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid. Redox Signal.* 11, 2851–2897. doi:http://dx.doi.org/10.1089/ARS.2008.2412.
- Prasad, K., 2011. Tocotrienols and cardiovascular health. *Curr. Pharm. Des.* 17, 2147–2154.
- Preitner, F., Mody, N., Graham, T.E., Peroni, O.D., Kahn, B.B., 2009. Long-term Fenretinide treatment prevents high-fat diet-induced obesity, insulin resistance, and hepatic steatosis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 297, E1420–E1429. doi:http://dx.doi.org/10.1152/ajpendo.00362.2009.
- Rahmaniyan, M., Curley, R.W., Obeid, L.M., Hannun, Y.A., Kravka, J.M., 2011. Identification of dihydroceramide desaturase as a direct in vitro target for fenretinide. *J. Biol. Chem.* 286, 24754–24764. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111.250779.
- Rezaei, M., Zeidooni, L., Hashemitabar, M., Razzazzadeh, S., Mahdavinia, M., Ghasemi, K., 2014. Gamma-tocopherol enhances apoptotic effects of lovastatin in human colorectal carcinoma cell line (HT29). *Nutr. Cancer* 66, 1386–1393. doi:http://dx.doi.org/10.1080/01635581.2014.956250.
- Rioux, V., Pédrone, F., Legrand, P., 2011. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. *Biochim. Biophys. Acta* 1811 (1), 1–8. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2010.09.005.
- Rodríguez-Cuenca, S., Barbarroja, N., Vidal-Puig, A., 2014. Dihydroceramide desaturase 1, the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2014.09.021.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Egia, A., Lorente, M., Vázquez, P., Torres, S., Iovanna, J.L., Guzmán, M., Boya, P., Velasco, G., 2009a. TRB3 links ER stress to autophagy in cannabinoid anti-tumoral action. *Autophagy* 5, 1048–1049.
- Salazar, M., Carracedo, A., Salanueva, I.J., Hernández-Tiedra, S., Lorente, M., Egia, A., Vázquez, P., Blázquez, C., Torres, S., García, S., Nowak, J., Fimia, G.M., Piacentini, M., Ceconi, F., Pandolfi, P.P., González-Feria, L., Iovanna, J.L., Guzmán, M., Boya, P., Velasco, G., 2009b. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J. Clin. Invest.* 119, 1359–1372.
- Salazar, M., Lorente, M., García-Taboada, E., Hernández-Tiedra, S., Davila, D., Francis, S.E., Guzmán, M., Kiss-Toth, E., Velasco, G., 2013. The pseudokinase *tribbles* homologue-3 plays a crucial role in cannabinoid anticancer action. *Biochim. Biophys. Acta* 1831, 1573–1578. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2013.03.014.
- Savile, C.K., Fabriàs, G., Buist, P.H., 2001. Dihydroceramide delta(4) desaturase initiates substrate oxidation at C-4. *J. Am. Chem. Soc.* 123, 4382–4385.
- Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P., Ghidoni, R., 2008. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ.* 15, 1318–1329. doi:http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2008.51.
- Scharstuhl, A., Mutsaers, H.A.M., Pennings, S.W.C., Russel, F.G.M., Wagener, F.A.D.T.G., 2009. Involvement of VDAC, Bax and ceramides in the efflux of AIF from mitochondria during curcumin-induced apoptosis. *PLoS One* 4, e6688. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006688.
- Schiffmann, S., Sandner, J., Schmidt, R., Birod, K., Wobst, I., Schmidt, H., Angioni, C., Geisslinger, G., Grösch, S., 2009. The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis. *J. Lipid Res.* 50, 32–40. doi:http://dx.doi.org/10.1194/jlr.M800122-JLR200.
- Schiffmann, S., Ziebell, S., Sandner, J., Birod, K., Deckmann, K., Hartmann, D., Rode, S., Schmidt, H., Angioni, C., Geisslinger, G., Grösch, S., 2010. Activation of ceramide synthase 6 by celecoxib leads to a selective induction of C16:0-ceramide. *Biochem. Pharmacol.* 80, 1632–1640. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bcp.2010.08.012.
- Shakor, A.B.A., Atia, M., Ismail, I.A., Alshehri, A., El-Refay, H., Kwiatkowska, K., Sobota, A., 2014. Curcumin induces apoptosis of multidrug-resistant human leukemia HL60 cells by complex pathways leading to ceramide accumulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1841, 1672–1682. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbali.2014.09.006.
- Shin, K.-O., Park, N.-Y., Seo, C.-H., Hong, S.-P., Oh, K.-W., Hong, J.-T., Han, S.-K., Lee, Y.-M., 2012. Inhibition of sphingolipid metabolism enhances resveratrol chemotherapy in human gastric cancer cells. *Biomol. Ther. (Seoul)* 20, 470–476. doi:http://dx.doi.org/10.4062/biomolther.2012.20.5.470.
- Siddique, M.M., Bikman, B.T., Wang, L., Ying, L., Reinhardt, E., Shui, G., Wenk, M.R., Summers, S.A., 2012. Ablation of dihydroceramide desaturase confers resistance to etoposide-induced apoptosis in vitro. *PLoS One* 7, e44042. doi:http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0044042.
- Siddique, M.M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V.A., Summers, S., 2015. Dihydroceramides: from bit players to lead actors. *J. Biol. Chem.* doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R115.653204.
- Siddique, M.M., Li, Y., Wang, L., Ching, J., Mal, M., Ilkayeva, O., Wu, Y.J., Bay, B.H., Summers, S.A., 2013. Ablation of dihydroceramide desaturase 1, a therapeutic target for the treatment of metabolic diseases, simultaneously stimulates anabolic and catabolic signaling. *Mol. Cell. Biol.* 33, 2353–2369. doi:http://dx.doi.org/10.1128/MCB.226-13.
- Signorelli, P., Ghidoni, R., 2005. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J. Nutr. Biochem.* 16, 449–466. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jnutbio.2005.01.017.
- Signorelli, P., Munoz-Olaya, J.M., Gagliostro, V., Casas, J., Ghidoni, R., Fabriàs, G., 2009. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* 282, 238–243. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2009.03.020.
- Singh, V.K., Beattie, L.A., Seed, T.M., 2013. Vitamin E: tocopherols and tocotrienols as potential radiation countermeasures. *J. Radiat. Res.* 54, 973–988. doi:http://dx.doi.org/10.1093/jrr/rrt048.
- Stiban, J., Fistere, D., Colombini, M., 2006. Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: implications on apoptosis. *Apoptosis* 11, 773–780. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10495-006-5882-8.
- Sun, S.Y., Yue, P., Lotan, R., 1999. Induction of apoptosis by N-(4-hydroxyphenyl) retinamide and its association with reactive oxygen species/nuclear retinoic acid receptors, and apoptosis-related genes in human prostate carcinoma cells. *Mol. Pharmacol.* 55, 403–410.
- Sylvester, P.W., Wali, V.B., V. Ayoub, N.M., Akl, M.R., 2011. Tocotrienol combination therapy results in synergistic anticancer response. *Front. Biosci. (Landmark Ed.)* 16, 3183–3195.
- Szkudelski, T., Szkudelska, K., 2015. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim. Biophys. Acta* 1852, 1145–1154. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.10.013.
- Tang, P.C.-T., Ng, Y.-F., Ho, S., Gyda, M., Chan, S.-W., 2014. Resveratrol and cardiovascular health—promising therapeutic or hopeless illusion? *Pharmacol. Res.* 90, 88–115. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.phrs.2014.08.001.
- Tang, Y., 2015. Curcumin targets multiple pathways to halt hepatic stellate cell activation: updated mechanisms in vitro and in vivo. *Dig. Dis. Sci.* 60, 1554–1564. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s10620-014-3487-6.
- Tellone, E., Galtieri, A., Russo, A., Giardina, B., Ficarra, S., 2015. Resveratrol: a focus on several neurodegenerative diseases. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2015, 392169. doi:http://dx.doi.org/10.1155/2015/392169.
- Ternes, P., Franke, S., Zähringer, U., Sperling, P., Heinz, E., 2002. Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J. Biol. Chem.* 277, 25512–25518. doi:http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M202947200.
- Thayyullathil, F., Rahman, A., Pallichankandy, S., Patel, M., Galadari, S., 2014. ROS-dependent prostate apoptosis response-4 (Par-4) up-regulation and ceramide generation are the prime signaling events associated with curcumin-induced autophagic cell death in human malignant glioma. *FEBS Open Bio* 4, 763–776. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.fob.2014.08.005.
- Tiwari, R., VP, arajuli, P., Sylvester, P.W., 2015. Synergistic anticancer effects of combined γ -tocotrienol and oridonin treatment is associated with the induction of autophagy. *Mol. Cell. Biochem.* doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11010-015-2488-x.
- Triola, G., Fabriàs, G., Casas, J., Llebaria, A., 2003. Synthesis of cyclopropane analogues of ceramide and their effect on dihydroceramide desaturase. *J. Org. Chem.* 68, 9924–9932. doi:http://dx.doi.org/10.1021/jo030141u.
- Triola, G., Fabrias, G., Dragusin, M., Niederhausen, L., Broere, R., Llebaria, A., van Echten-Deckert, G., 2004. Specificity of the dihydroceramide desaturase inhibitor N-[(1R,2S)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(2-tridecyl-1-cyclopropenyl) ethyl]octanamide (GT11) in primary cultured cerebellar neurons. *Mol. Pharmacol.* 66, 1671–1678. doi:http://dx.doi.org/10.1124/mol.104.003681.
- Triola, G., Fabriàs, G., Llebaria, A., 2001. Synthesis of a cyclopropane analogue of ceramide: a potent inhibitor of dihydroceramide desaturase. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 40, 1960–1962.
- Tuerdi, G., Ichinomiya, S., Sato, H., Siddig, S., Suwa, E., Iwata, H., Yano, T., Ueno, K., 2013. Synergistic effect of combined treatment with gamma-tocotrienol and statin on human malignant mesothelioma cells. *Cancer Lett.* 339, 116–127. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.canlet.2013.07.015.
- Vara, D., Salazar, M., Olea-Herrero, N., Guzmán, M., Velasco, G., Díaz-Laviada, I., 2011. Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy. *Cell Death Differ.* 18, 1099–1111. doi:http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.32.
- Vecchi Brumatti, L., Marcuzzi, A., Tricarico, P.M., Zanin, V., Girardelli, M., Bianco, A.M., 2014. Curcumin and inflammatory bowel disease: potential and limits of innovative treatments. *Molecules* 19, 21127–21153. doi:http://dx.doi.org/10.3390/molecules191221127.

- Velasco, G., Carracedo, A., Blázquez, C., Lorente, M., Aguado, T., Haro, A., Sánchez, C., Galve-Roperh, I., Guzmán, M., 2007. Cannabinoids and gliomas. *Mol. Neurobiol.* 36, 60–67. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s12035-007-0002-5.
- Vieira, C.R., Muñoz-Olaya, J.M., Sot, J., Jiménez-Baranda, S., Izquierdo-Useros, N., Abad, J.L., Apellániz, B., Delgado, R., Martínez-Picado, J., Alonso, A., Casas, J., Nieva, J.L., Fabriás, G., Mañes, S., Goñi, F.M., 2010. Dihydrospingomyelin impairs HIV-1 infection by rigidifying liquid-ordered membrane domains. *Chem. Biol.* 17, 766–775. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.chembiol.2010.05.023.
- Wang, C., Zhang, X., Teng, Z., Zhang, T., Li, Y., 2014. Downregulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway in curcumin-induced autophagy in APP/PS1 double transgenic mice. *Eur. J. Pharmacol.* doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ejphar.2014.06.051.
- Wang, H., Maurer, B.J., Liu, Y.-Y., Wang, E., Allegood, J.C., Kelly, S., Symolon, H., Liu, Y., Merrill, A.H., Gouazé-Andersson, V., Yu, J.Y., Giuliano, A.E., Cabot, M.C., 2008. *N*-(4-Hydroxyphenyl) retinamide increases dihydroceramide and synergizes with dimethylsphingosine to enhance cancer cell killing. *Mol. Cancer Ther.* 7, 2967–2976. doi:http://dx.doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0549.
- Wang, H., Maurer, B.J., Reynolds, C.P., Cabot, M.C., 2001. *N*-(4-hydroxyphenyl) retinamide elevates ceramide in neuroblastoma cell lines by coordinate activation of serine palmitoyltransferase and ceramide synthase. *Cancer Res.* 61, 5102–5105.
- Wang, Y., Park, N.-Y., Jang, Y., Ma, A., Jiang, Q., 2015a. Vitamin E γ -tocotrienol Inhibits cytokine-stimulated NF- κ B activation by induction of anti-inflammatory A20 via stress adaptive response due to modulation of sphingolipids. *J. Immunol.* 195, 126–133. doi:http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1403149.
- Wang, Y., Yu, H., Zhang, J., Ge, X., Gao, J., Zhang, Y., Lou, G., 2015b. Anti-tumor effect of emodin on gynecological cancer cells. *Cell. Oncol. (Dordr)* doi:http://dx.doi.org/10.1007/s13402-015-0234-8.
- Wongcharoen, W., Phrommintikul, A., 2009. The protective role of curcumin in cardiovascular diseases. *Int. J. Cardiol.* 133, 145–151. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.ijcard.2009.01.073.
- Xiao, K., Jiang, J., Guan, C., Dong, C., Wang, G., Bai, L., Sun, J., Hu, C., Bai, C., 2013. Curcumin induces autophagy via activating the AMPK signaling pathway in lung adenocarcinoma cells. *J. Pharmacol. Sci.* 123, 102–109.
- Yamauchi, Y., Izumi, Y., Asakura, K., Hayashi, Y., Nomori, H., 2012. Curcumin induces autophagy in ACC-MESO-1 cells. *Phytother. Res.* 26, 1779–1783. doi:http://dx.doi.org/10.1002/ptr.4645.
- Yang, Y., Ji, C., Cheng, L., He, L., Lu, C., Wang, R., Bi, Z., 2012. Sphingosine kinase-1 inhibition sensitizes curcumin-induced growth inhibition and apoptosis in ovarian cancer cells. *Cancer Sci.* 103, 1538–1545. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2012.02335.x.
- Yu, T., Li, J., Qiu, Y., Sun, H., 2012. 1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (PDMP) facilitates curcumin-induced melanoma cell apoptosis by enhancing ceramide accumulation, JNK activation, and inhibiting PI3K/AKT activation. *Mol. Cell. Biochem.* 361, 47–54. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s11010-011-1086-9.
- Yu, T., Li, J., Sun, H., 2010. C6 ceramide potentiates curcumin-induced cell death and apoptosis in melanoma cell lines in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 66, 999–1003. doi:http://dx.doi.org/10.1007/s00280-010-1374-1.
- Yusof, K.M., Makpol, S., Jamal, R., Harun, R., Mokhtar, N., Ngah, W.Z.W., 2015. γ -Tocotrienol and 6-gingerol in combination synergistically induce cytotoxicity and apoptosis in HT-29 and SW837 Human colorectal cancer cells. *Molecules* 20, 10280–10297. doi:http://dx.doi.org/10.3390/molecules200610280.
- Zhang, Q.-J., Holland, W.L., Wilson, L., Tanner, J.M., Kearns, D., Cahoon, J.M., Pettey, D., Losee, J., Duncan, B., Gale, D., Kowalski, C.A., Deeter, N., Nichols, A., Deesing, M., Arrant, C., Ruan, T., Boehme, C., McCamey, D.R., Rou, J., Ambal, K., Narra, K.K., Summers, S.A., Abel, E.D., Symons, J.D., 2012. Ceramide mediates vascular dysfunction in diet-induced obesity by PP2A-mediated dephosphorylation of the eNOS-Akt complex. *Diabetes* 61, 1848–1859. doi:http://dx.doi.org/10.2337/db11-1399.
- Zheng, W., Kollmeyer, J., Symolon, H., Momin, A., Munter, E., Wang, E., Kelly, S., Allegood, J.C., Liu, Y., Peng, Q., Ramaraju, H., Sullards, M.C., Cabot, M., Merrill, A. H., 2006. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1758, 1864–1884. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.bbame.2006.08.009.
- Zhuang, W., Long, L., Zheng, B., Ji, W., Yang, N., Zhang, Q., Liang, Z., 2012. Curcumin promotes differentiation of glioma-initiating cells by inducing autophagy. *Cancer Sci.* 103, 684–690. doi:http://dx.doi.org/10.1111/j.1349-7006.2011.02198.x.

ARTICLE 4

Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms

Mireia Casasampere, Yadira F. Ordóñez, Josefina Casas i Gemma Fabrias

Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), 08034 Barcelona, Spain

Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. **2017**; 1861: 264-75

Factor d'impacte: 5.08

La contribució de Mireia Casasampere a aquest treball presentat com a part del capítol 3 d'aquesta tesi, correspon al disseny d'experiments, i obtenció i elaboració de les dades resultants dels experiments realitzats amb el CCX, PXD i RV i els corresponents controls en totes les línies cel·lulars emprades. També ha contribuït a l'escriptura del primer esborrany. Els resultats obtinguts amb γ -T, γ -TE i XM462 varen formar part de la tesi doctoral de Yadira F. Ordóñez, presentada el 2016 dins del programa de Doctoral de Química Orgànica de la Universitat de Barcelona.

Josefina Casas Brugulat
Directora de tesi

RESUM

Els inhibidors de la dihidroceramida desaturasa indueixen autofàgia per mecanismes dependents i independents de dihidroceramides

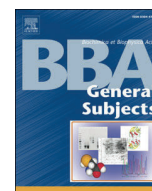
Objectiu: Els esfingolípidos són elements estructurals de les membranes cel·lulars, que a més s'ha demostrat que contribueixen a diverses funcions biològiques com la proliferació cel·lular i l'apoptosi. L'ocurrència d'una relació entre l'augment de dhCer i l'autofàgia ja ha estat descrita, però la seva implicació en la mort cel·lular o en la supervivència continua sent controvertida. Entre aquestes evidències es troben els experiments amb el XM462, un inhibidor farmacològic de la Des1, que causa una acumulació de dhCer i provoca una inducció d'autofàgia. L'objectiu d'aquest estudi és determinar l'impacte de l'augment de dhCer, induït pels inhibidors de Des1 CCX, PXD, RV i γ -TE, sobre el destí final de les línies cel·lulars de glioblastoma T98G i U87MG.

Metodologia: La viabilitat cel·lular es va determinar 24 h després dels tractaments amb l'assaig de la sulforodamina B (SRB). L'autofàgia (anàlisi de LC3-II i p62 per Western Blot i detecció de LC3-II puncta per immunofluorescència) i la composició dels esfingolípidos (UPLC-TOF) va ser mesurada en cèl·lules tractades amb la concentració IC₂₅ dels compostos. La determinació de l'activitat Des1 es va dur a terme per HPLC acoblada a un detector de fluorescència tant en llistats cel·lulars com en cèl·lules intactes després de ser incubades amb els compostos. En aquest estudi es va utilitzar a més de les cèl·lules T98G i U87MG, una línia cel·lular incapaç de produir Cer per la via *de novo* dels esfingolípidos (U87DND), i aquesta amb el gen *ATG5*, essencial per la inducció d'autofàgia, silenciada de forma estable. Els nivells relatius de mRNA dels diferents gens es van determinar per qPCR. Finalment, es va utilitzar miriocina per inhibir l'enzim SPT i 3-metiladenina (3MA) per inhibir l'autofàgia.

Resultats: En primer lloc es va comprovar que els compostos inhibien l'enzim Des1, provocant una acumulació de dhCer. Les cèl·lules tractades amb CCX, PXD, RV i γ -TE, però no γ -T, provocaven un increment de dihidroesfingolípidos, sobretot de dhCer. La determinació de l'activitat Des1 es va realitzar tant en llistats com en cèl·lules intactes, i es va observar que tots els compostos excepte γ -T, causaven una reducció de l'activitat Des1. Curiosament el γ -TE només va inhibir Des1 en cèl·lules intactes, suggerint una reducció de l'expressió gènica de Des1. Aquest fet es va confirmar analitzant els nivells de mRNA, on l'expressió de Des1 disminuïa en les cèl·lules tractades amb γ -TE. També es van analitzar altres transcrits involucrats en la via de biosíntesi *de novo* de la Cer. Tots els compostos provocaven un augment de l'expressió d'aquests enzims com les CerS o la SPT. Les anàlisis de Western Blot van mostrar que en les cèl·lules tractades amb els compostos, a excepció de γ -T, hi havia un increment dels nivells de LC3-II i p62 respecte els controls. Aquest increment augmentava en presència d'inhibidors de proteases. També es va comprovar la inducció d'autofàgia analitzant per immunofluorescència la formació dels

autofagosomes. La incubació amb miriocina va evitar l'acumulació de dhCer i tot i que es van reduir els nivells de LC3-II, encara hi havia inducció d'autofàgia en absència de dhCer. La inducció d'autofàgia per part dels compostos en el model cel·lular U87DND va demostrar que les dhCer no eren un requisit estrictament necessari per a la inducció d'autofàgia. No obstant, quan es silenciava el gen *ATG5* en les U87DND, una línia cel·lular incapaç d'acumular dhCer, els compostos eren menys tòxics. A més la toxicitat dels compostos en les U87DND controls (sense l'*ATG5* silenciada) disminuïa en afegir dhCer exògenes. Aquests resultats suggereixen que l'autofàgia dependent de dhCer té com a finalitat la supervivència cel·lular. D'altra banda quan es va inhibir l'autofàgia amb 3MA en les cèl·lules U87MG, amb nivells normals de dhCer, els compostos eren més tòxics. Aquests resultats recolzen que la via d'inducció d'autofàgia dependent de dhCer és un mecanisme de supervivència cel·lular.

Conclusions: En aquest treball s'ha demostrat que en T98G i U87MG, tots els compostos, excepte γ -T, indueixen l'autofàgia juntament amb una acumulació de dhCer a causa de l'estimulació de la biosíntesi *de novo* de Cer i una disminució de l'activitat Des1. No obstant això, l'activació d'autofàgia també pot ser induïda en absència d'una acumulació de dhCer. Es proposa que el CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 activen mecanismes pro-autofàgics tant dependents com independents de dhCer, i l'equilibri entre les dues vies té una influència sobre el destí cel·lular, sent la via d'inducció d'autofàgia dependent de dhCer un mecanisme de supervivència.



Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms

Mireia Casasampere¹, Yadira F. Ordóñez¹, Josefina Casas, Gemma Fabrias^{*}

Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Departament de Química Biomèdica, Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 September 2016
Received in revised form 10 November 2016
Accepted 23 November 2016
Available online 25 November 2016

Keywords:

Autophagy
Cancer
Dihydroceramide desaturase
Lipidomics
Sphingolipids
Inhibitor

ABSTRACT

Background: Autophagy consists on the delivery of cytoplasmic material and organelles to lysosomes for degradation. Research on autophagy is a growing field because deciphering the basic mechanisms of autophagy is key to understanding its role in health and disease, and to paving the way to discovering novel therapeutic strategies. Studies with chemotherapeutic drugs and pharmacological tools support a role for dihydroceramides as mediators of autophagy. However, their effect on the autophagy outcome (cell survival or death) is more controversial.

Methods: We have examined the capacity of structurally varied Des1 inhibitors to stimulate autophagy (LC3-II analysis), to increase dihydroceramides (mass spectrometry) and to reduce cell viability (SRB) in T98G and U87MG glioblastoma cells under different experimental conditions.

Results: The compounds activity on autophagy induction took place concomitantly with accumulation of dihydroceramides, which occurred by both stimulation of ceramide synthesis *de novo* and reduction of Des1 activity. However, autophagy was also induced by the test compounds after preincubation with myriocin and in cells with a reduced capacity to produce dihydroceramides (U87DND). Autophagy inhibition with 3-methyladenine in the *de novo* dihydroceramide synthesis competent U87MG cells increased cytotoxicity, while genetic inhibition of autophagy in U87DND cells, poorly efficient at synthesizing dihydroceramides, augmented resistance to the test compounds.

Conclusion: Dihydroceramide desaturase 1 inhibitors activate autophagy via both dihydroceramide-dependent and independent pathways and the balance between the two pathways influences the final cell fate.

General significance: The cells capacity to biosynthesize dihydroceramides must be taken into account in proautophagic Des1 inhibitors-including therapies.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

Abbreviations: 3MA, 3-methyladenine; C22:0-dhCer, docosanoylsphinganine; C24:0-dhCer, N-tetracosanoylsphinganine; C24:1-dhCer, N-tetracosenoylsphinganine; CCX, celecoxib; Cer, ceramide; CerS, ceramide synthase; d2C8dhCer, N-octanoyl-D-erythro-[4,4-²H₂]sphinganine; Des1, dihydroceramide desaturase 1; dhCer, dihydroceramide; dhCerC6NBD, N-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-D-erythro-sphinganine; dhSM, dihydrosphingomyelin; DIPACS, Des1 inhibitory pro-autophagic compounds; LacdhCer, lactosyldihydroceramide; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; Myr, myriocin; PVDF, polyvinylidenedifluoride; PXD, phenoxodiol; RV, resveratrol; SL, sphingolipids; SM, sphingomyelin; SPT, serine palmitoyltransferase; TBST, TBS with 0.1% Tween-20; UPLC-TOF MS, ultraperformance liquid chromatography coupled to time of flight mass spectrometry; γ -T, γ -tocopherol; γ -TE, γ -tocotrienol.

^{*} Corresponding author at: Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), Jordi Girona 18-26, 08034 Barcelona, Spain.

E-mail address: gemma.fabrias@iqac.csic.es (G. Fabrias).

¹ Both authors contributed equally to this work and are listed in alphabetical order.

1. Introduction

Autophagy is an evolutionary conserved cellular catabolic pathway involving the lysosomal degradation and recycling of proteins and organelles. Under physiological conditions, cells undergo autophagy to eliminate aberrant, damaged biomolecules or structures to maintain tissue homeostasis. The autophagic response is activated and exploited by cells submitted to stressors such as starvation and hypoxia as a cytoprotective mechanism to obtain nutrients and energy [1,2]. Under sustained or strong stressing conditions, autophagy can culminate in programmed cell death [3–5].

Problems in the execution of autophagy are linked to different pathological conditions, such as neurodegeneration, aging, and cancer [6] with manipulation of autophagy emerging as a potential therapeutic target [7–9]. In cancer, tumors able to undergo autophagy exhibit increased resistance to therapy [10–13], which can be counteracted by co-administration of autophagy inhibitors [14–16]. However, beyond a still unclear check point, autophagy is no longer protective but kills

tumor cells in a genetically programmed way. Thus, the convenience of inducing or impairing autophagy for therapeutic purposes requires a deep knowledge of this process at the molecular level.

Sphingolipids (SL), which are ubiquitous membrane lipids in eukaryotic cells, are involved in the generation of membrane structures and contribute to various cellular functions. While the role of SL in cell proliferation and apoptosis has long been recognized, their implication in autophagy is more recent [17]. Specifically, ceramides (Cer) [18], sphingosine-1-phosphate [19–21], dihydroceramides (dhCer) [22], sphingomyelins (SM) [23,24] and gangliosides [25–27] seem able to differentially regulate the autophagic pathway and/or contribute to the autophagosome formation.

Evidences arising from studies with chemotherapeutic drugs and pharmacological tools sustain a role for dhCer in the induction of autophagy [22]. Thus, several compounds reported to induce autophagy have also activity as dihydroceramide desaturase 1 (Des1) inhibitors. Drugs include tetrahydrocannabinol [28–32] (inhibition of Des1 in rat liver microsomes using dhCerC6NBD as substrate [33] occurs with an IC_{50} value of 30 μ M), fenretinide [34,35], resveratrol (RV) [36–39] and celecoxib (CCX) [40–43]. Pharmacological tools include the sphingosine kinase inhibitor SKI-II [44], and the synthetic Des1 inhibitors GT11 [32] and XM462 [37]. On the other hand, increased levels of dihydrosphingosine and dhCer have been shown to occur in prostate cancer cells incubated by γ -tocotrienol (γ -TE), and this increase appears to contribute to the autophagic response elicited by the compound [45,46]. Although these results suggest that γ -TE inhibits Des1, inhibition has not been demonstrated in an enzyme activity assay. Finally, phenoxodiol (PXD) is a synthetic analog of genistein, a natural isoflavone reported to induce autophagy [47,48]. PXD has been reported to promote non-apoptotic cell death, but the proautophagic activity of PXD has not been investigated. Furthermore, although its phenolic structure suggests activity as Des1 inhibitor [22], this property has not been examined.

Using T98G and U87MG glioblastoma cell lines and different Des1 inhibitory pro-autophagic compounds (DIPACS) exhibiting different cytotoxicities (CCX, PXD, RV, γ -TE and XM462) we show that autophagy induction occurs concomitantly with dhCer buildup. However, autophagy is also induced in the absence of dhCer accrual. We propose that DIPACS trigger both dhCer-dependent and independent pathways and that their balance, along with the differently *N*-acylated dhCer/Cer ratios in the first case, has an impact on the final cell fate.

2. Materials and methods

2.1. Materials

Dulbecco's Modified Eagle Medium, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, sulforhodamine B, BSA, Trypsin-EDTA, RV, γ -T, pepstatin A, myriocin, puromycin dihydrochloride from *Streptomyces alboniger* and hexadimethrine bromide were purchased from Sigma. CCX was purchased from Selleckchem. PXD was a kind gift of Marshall Edwards Pty Ltd. (New South Wales, Australia). γ -TE was purchased from Cayman Chemical Company. E64D was purchased from Enzo. Polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane was purchased from Roche. ECL Prime Western blotting detection reagent was purchased from GE Healthcare. Paraformaldehyde was purchased from Fluka. *N*-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-*D*-erythro-sphinganine (dhCerC6NBD) [33], *N*-octanoyl-*D*-erythro-[4,4-²H₂]sphinganine (d2C8dhCer) [49] and XM462 [33] were synthesized in our laboratories. Internal standards for lipidomics were purchased from Avanti Polar Lipids. Laemmli buffer and acrylamide were purchased from BioRad, SDS from Fluka. Antibodies: anti-LC3 was purchased from Abcam (code ab48394) (Western blot) or MBL (code M152-3) (Immunofluorescence microscopy), anti-p62 was from Abcam (code ab56416) and β -actin was from Sigma (code A2228). HRP-secondary antibodies (anti-mouse and anti-rabbit) were from GE Healthcare. FITC-secondary antibody was purchased from Millipore. For stable knock down of *ATG5* expression, the pool of concentrated transduction-ready

viral particles containing 3 target-specific shRNAs or 3 nontargeted control shRNA constructs were obtained from Santa Cruz Biotechnology.

2.2. Cell culture

Human glioblastoma cell lines T98G and U87MG were cultured at 37 °C in 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 ng/mL each of penicillin and streptomycin. U87DND-shC and U87DND-Atg5 cells were cultured at 37 °C in 5% CO₂ in the same medium supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 ng/mL each of penicillin and streptomycin and 2 μ g/mL puromycin.

2.3. Cell treatments

Cells were plated at the appropriate density and allowed to adhere for 24 h in complete medium. DIPACS were then added at the specified concentration from stock solutions in ethanol or DMSO and cells were collected by trypsinization after the indicated times. In some experiments, 3-methyladenine (3MA) (5 mM) was added 3 h prior to DIPACS addition and was maintained in the culture until the end of the experiment (24 h). In other experiments, cells were treated 24 h after seeding with d2C8dhCer (25 μ M) and either 2/3 serial dilutions of PXD from 6.8 to 0.12 μ M (ethanol as vehicle control) or a fixed PXD concentration (1.8 μ M). Twenty-four hours later, a new dose of d2C8dhCer (25 μ M) was added and cells were cultured for 24 h additional hours, after which cell viability was determined as detailed below or cells were collected by trypsinization and processed for lipid analysis (UPLC/TOF MS). In treatments with d2C8dhCer (25 μ M) and vehicle, samples were also collected and processed for Western blot analysis of LC3.

2.4. Cell viability

Cell viability was examined in triplicate samples by the sulphorhodamine B assay. Cells were seeded in 96 well plates at a density of 1×10^5 cells/mL and then subjected to various treatments for 24 or 48 h. At the end of the treatments, cells were fixed with ice-cold trichloroacetic acid for 1 h at 4 °C. After washing the plates in distilled water, sulphorhodamine B solution was added to each well and staining was allowed at room temperature for 30 min. To remove unbound dye, plates were washed with 1% v/v acetic acid. Sulphorhodamine B was solubilized by adding 10 mM Tris base to each well and shaking for 5 min on a shaker platform. Absorbance was measured at 564 nm.

2.5. Desaturase activity

To determine the compounds activity on Des1 in intact cells, cells were seeded in 6 well plates at a density of 1×10^5 cells/mL. Twenty-four hours after seeding, the medium was replaced with fresh complete medium containing CCX, PXD, RV, γ -tocopherol (γ -T), γ -TE or XM462, which was used as a positive control. After incubation at 37 °C for 20 h, dhCerC6NBD (substrate) was added to the medium and incubated for an additional 4 h. The media was then collected, cells were washed with PBS (400 μ L/well) and the washing solution was combined with the collected media. Cells were detached by trypsinization (400 μ L/well Trypsin-EDTA), 600 μ L of medium was then added to the cell suspension and the solution was transferred to an Eppendorf tube. One milliliter of MeOH was added to each tube (medium and cell suspension) and the mixture was vortexed and kept at 4 °C overnight. After centrifugation (10,000 rpm for 3 min), the supernatants were transferred to HPLC vials and either 25 μ L (media) or 100 μ L (cells) were injected in to HPLC. Analyses were performed with an Alliance apparatus coupled to a fluorescence detector using a C18 reversed-phase column eluted with 15% H₂O and 85% acetonitrile, both with a 0.1% trifluoroacetic acid, flowing at 1 mL/min. The detector was set at an excitation wavelength of 470 nm and the emission wavelength at 530 nm. Each sample was run for up to 15 min.

2.6. Western blotting

For LC3-II and p62 protein analysis 1×10^5 cells were plated in 6 well plates and were allowed to adhere for 24 h. Cells were preincubated with proteases inhibitors (E64D, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ and pepstatin A, 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$). After 2 h cells were treated for 24 h with CCX, PXD, RV, γ -T, γ -TE and XM462 or EtOH as control. Cells were directly lysed in Laemmli sample buffer and boiled for 5 min. Samples were loaded onto a 12% polyacrylamide gel, separated by electrophoresis at 140 V/1 h and transferred onto a PVDF membrane (100 V/1 h). Unspecific binding sites were then blocked with 5% milk in TBST (LC3 and p62) or 3% BSA in TBST (Actin). Anti-LC3 and anti-p62 antibodies were diluted 1:1000 in 5% milk in TBST. Anti-actin antibody was diluted 1:2000 in 3% BSA in TBST. Membranes were incubated overnight at 4 °C under gentle agitation. After washing with TBST, membranes were probed with the correspondent secondary antibody for 1 h at room temperature (LC3: anti-rabbit, diluted 1:1000 in 3% BSA in TBST; Actin and p62: anti-mouse, diluted 1:10,000 in 5% milk in TBST). Antibody excess was eliminated by washing with TBST and protein detection was carried out using ECL and membrane scanning with LI-COR C-DiGit® Blot Scanner. Band intensities were quantified by LI-COR Image Studio Lite Software.

2.7. Lipid analysis

Cells were seeded at 1×10^5 cells/mL into 6 well plates (1 mL/well) and were allowed to adhere for 24 h. Medium was replaced with fresh medium containing CCX, PXD, RV, γ -T, γ -TE and XM462 or EtOH as control. After 24 h, medium was removed; cells were washed with 400 μL PBS and harvested with 400 μL Trypsin-EDTA and 600 μL of medium. Sphingolipid extracts, fortified with internal standards (*N*-dodecanoylsphingosine, *N*-dodecanoylglucosylsphingosine, *N*-dodecanoylsphingosylphosphorylcholine and C17-sphinganine 0.2 nmol each) were prepared and analyzed by UPLC-TOF MS as reported [33].

The dhCer/Cer ratios for the different *N*-acyl species were evaluated by performing one hierarchical cluster analysis (HCA) with headmapping display, which allowed examining dhCer/Cer ratios similarly affected by each treatment. MATLAB 8.6.0 R2015b (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) was used as the development platform for data analysis and visualization.

2.8. Immunofluorescence

Cells were grown on coverslips in 6 well plates at a density of 1×10^5 cells/mL and allowed to attach. Medium was replaced with fresh medium containing CCX, PXD, RV, γ -T, γ -TE and XM462 at the desired concentration, or EtOH as control. After 24 h cells were washed with PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature. After washing the cells with PBS, aldehydes were quenched with 50 mM NH_4Cl in PBS for 10 min. Cells were washed again with PBS and permeabilized and blocked with 3% BSA, 0.1% Triton X-100 in PBS for 30 min at room temperature. After washing with PBS, cells were incubated with 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ anti-LC3 antibody in PBS overnight at 4 °C. Following incubation, cells were washed and treated with FITC-conjugated secondary antibody diluted 1:100 in PBS for 1.5 h at room temperature. Punctate pattern of LC3 was visualized under a fluorescence microscope at 60 \times objective magnification or a confocal fluorescence microscope. At least 50 green cells per well were counted, and the percentage of cells that had at least 5 clear green dots in the cytosol was determined.

2.9. qPCR

Total RNA was isolated from cells using RNeasy® Mini Kit from QIAGEN protocol. RNA concentration was measured by spectrophotometric absorption at 260 nm in a NanoDrop ND-8000 Spectrophotometer. RNA was treated with DNase I to remove genomic DNA

contamination. Quantities from 1 μg to 100 ng of DNase I-treated RNA were retrotranscribed to cDNA using Superscript® II Reverse Transcriptase from Invitrogen and stored at -20 °C. cDNA preparations were used to quantify specific transcripts in a LightCycler® 480 Real Time PCR System, using SYBR®Green Mix (Roche, Germany) and the following pairs of primers: Des1 (F, 5'-CTATGCGTTTGGCAGTTGCA-3', and R, 5'-CAGTTGCCAAAGGCAGCATT-3'), CerS2 (F, 5'-AGATCATCCACCA TGTGGCC-3', and R, 5'-TGATTAGAGTCCAGCTCGGA-3'), CerS5 (F, 5'-AGGGCCACTGGCAACATACT-3', and R, 5'-ACTCCTCAGTGCCTGCAGTC-3'), CerS6 (F, 5'-TGGTTTTATCACCACAGACTG-3', and R, 5'-CAACGAT CTCCAGCTTTCAA-3'), SPTLC1 (F, 5'-CAGAACCTTGTTCCTCCTGTC-3', and R, 5'-TTTTGTGGCTTGGAGGGC-3'), SPTLC2 (F, 5'-TGGAGTGTG CAGTACTCGGC-3', and R, 5'-TTGCTACAAGCTCCTCTAGTTCTTCAT-3') and GAPDH (F, 5'-ACCATCTTCCAGGAGCGAGA-3', and R, 5'-GATGGCATGGACTGTGGTCA-3'). For all genes, the initial PCR steps were: 10 min at 95 °C, followed by 45 cycles of a 10 s melting at 95 °C and a 30 s annealing/extension at 60 °C. The final step was 1 min incubation at 60 °C. All reactions were performed in triplicate. Relative mRNA abundances of the different genes were calculated from the second derivative maximum of their respective amplification curves (Cp, calculated in duplicates). Cp values for target genes (Tg) were compared to the corresponding values for the GAPDH reference gene to obtain the ΔCp values ($\Delta\text{Cp} = \text{CpGAPDH} - \text{CpTg}$).

2.10. Infection with ATG5 shRNA-human lentiviral particles

U87DND cells were plated in 12-well dishes 24 h prior to viral infection. The following day, when cells had reached 50% confluence, medium was replaced by complete medium containing hexadimethrine bromide (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration). Cells were then infected with control- or ATG5-selective shRNA lentiviral particles. After 24 h, the medium was replaced by complete medium without hexadimethrine bromide and selection of clones stably expressing the shRNAs was carried out by incubation of cells with puromycin (2 to 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ final concentration). Stable silencing was confirmed by Western blot. At least 20 different selected clones were pooled for each of the cell lines generated.

2.11. Statistical analyses

All experiments were performed in triplicate and data are given as means \pm S.D. For comparison of two means, data were analyzed by Student's *t*-test. For comparison of more than two means, data were analyzed by one-way ANOVA followed by Dunnett's (pairwise comparisons of multiple treatment groups with a single control group) or Bonferroni's (comparisons between all data groups) multiple comparison post-tests. Differences with $P < 0.05$ were considered significant. Dose response curves were adjusted with the sigmoidal dose-response curve with variable slope equation. Comparison of dose-response curves (LogCC₅₀ and Hill Slope) was carried out with the extra sum-of-squares F test. All tests were run with the GraphPad programme. The figures in this article are representative of at least three independent experiments with a similar pattern.

3. Results

3.1. DIPACS have different effects on U87MG and T98G cell viability

The compounds used in this study affected cell viability in glioblastoma U87MG and T98G cells lines with different potencies. Thus, CCX caused a decrease in cell viability with CC₅₀ values (24 h) of 124.7 μM (U87MG) and 97.5 μM (T98G), while γ -TE was cytotoxic with CC₅₀ values (24 h) of 73.5 μM (U87MG) and 44.3 μM (T98G) (Fig. 1A, B). In contrast, PXD and RV were poorly effective at decreasing cell viability (CC₅₀ values (24 h) above 200 μM in both cell lines) and γ -tocopherol (γ -T), which differs from γ -TE by the absence of the double bonds in the isoprenoid chain, did not affect cell viability at concentrations up

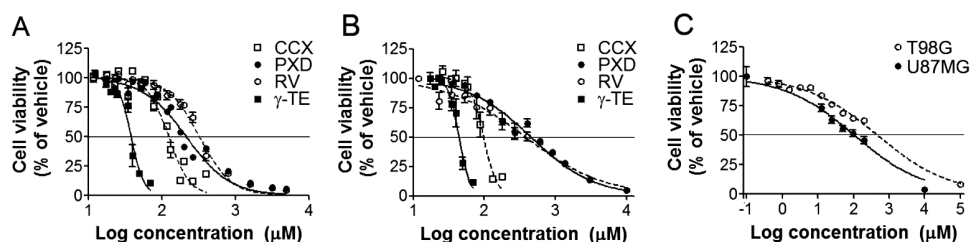


Fig. 1. Effect of test compounds on cell viability. U87MG (A, C) and T98G (B, C) cells were exposed to CCX (A, B), PXD (A, B), RV (A, B), γ -TE (A, B) and XM462 (C) for 24 h and cell viability was determined by the sulphorhodamine B test. Curve fitting with the sigmoidal dose-response (variable slope) equation afforded the CC_{50} values detailed in the text. Data were obtained from 3 to 5 experiments with triplicates.

to 200 μ M (data not shown). The active-site directed Des1 inhibitor XM462, which has also been reported to induce an increase in dhCer [37,50], was more potent at modifying cell viability in U87MG than in T98G cells (Fig. 1C).

3.2. DIPACS induce an increase in dihydrospingolipids

In order to assess the putative occurrence of a correlation between cytotoxicity and sphingolipid composition, lipid analysis was carried out in extracts from cells treated with the compounds at subtoxic concentrations. CCX, RV, PXD and γ -TE, but not γ -T at 50 μ M, promoted an increase in dhCer, dihydrospingomyelins (dhSM) and lactosyldihydroceramides (LacdhCer) in U87MG (Fig. 2A) and T98G cell lines (Fig. S1A). Similar results were found with the active site-directed Des1 inhibitor XM462 (100 μ M/24 h). In contrast, sphingolipids derived from sphingosine (Cer, SM, monohexosylceramides (MHC) and lactosylceramides (LacCer)) did not change significantly over those of vehicle-treated cells except for a few specific cases (Figs. 2A and S1A). However, in both cell lines the highest accrual over controls occurred for dhSL, mainly for dhCer (Figs. 2B and S2B). It is worth noting that, in general, U87MG cells were more responsive to the compounds at increasing dhSL levels than T98G cells. In the most responsive cell line (U87MG), dhCer rose 2-fold (XM462), 10-fold (γ -TE), 17-fold (PXD and RV) and 30-fold (CCX) after treatments, while dhSM levels

were 1.5-fold (XM462), 5-fold (γ -TE and PXD), 3.6-fold (RV) and 2.6-fold (CCX) higher in treated cells than in controls and LacdhCer levels were 1.8-fold (XM462), 3.5-fold (PXD and RV), 5-fold (γ -TE) and 6-fold (CCX) higher than controls (Fig. 2B). Levels of long chain bases and their phosphates did not change significantly upon the treatments (data not shown). This finding is at odds with reported data showing that treatment of various cancer cell lines with CCX [40] or γ -TE [46] significantly increased sphinganine. Differences in SL metabolizing enzyme activities between the different cells lines used in those studies and in this work may account for the contrasting sphinganine contents produced in response to CCX and γ -TE.

Since differently acylated Cer [51–58] and dhCer [59,60] have been reported to exert different effects on cell fate, the impact of the compounds on dhCer composition was determined. In both cell lines, the various dhCer species were differently affected by the compounds (Figs. 2C–G and S1C–G). The most striking changes over controls occurred for the C24:0-dhCer, which increased in treatments with PXD (Figs. 2F and S1F) and RV (Figs. 2G and S1G), accounting for a ca 65% of total dhCer (Figs. 2H and S1H), and C24:1-dhCer, which decreased to about a 20% of total in treatments with PXD (Figs. 2H and S1H) and RV (Figs. 2H and S1H). In contrast, cells treated with γ -TE (Figs. 2C, H, S2C and S1H), CCX (Figs. 2E, H and S1E,H) and XM462 (Figs. 2D, H and S1D,H) exhibited no preponderance of C24:0-dhCer.

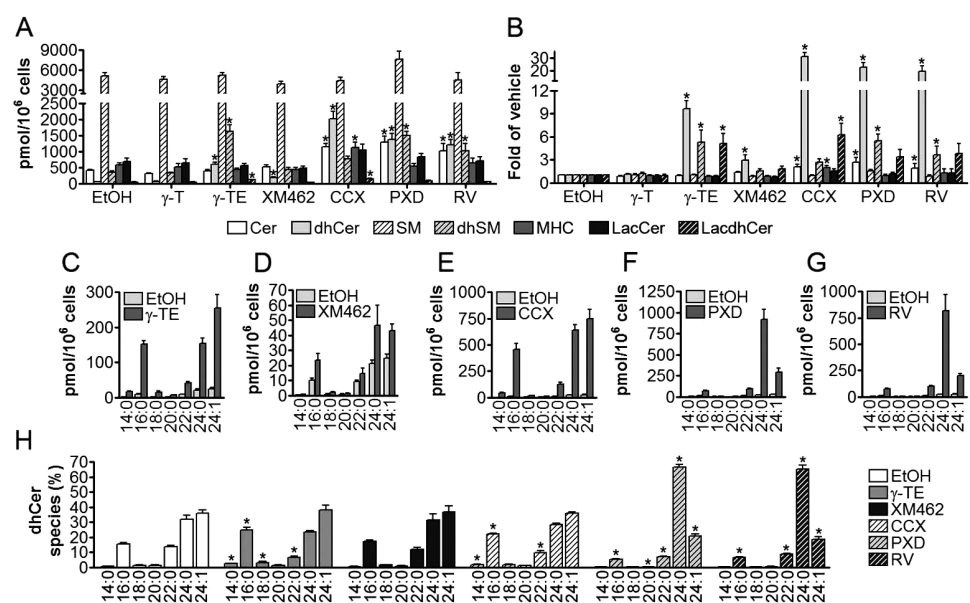


Fig. 2. Effect of compounds on sphingolipid levels in U87MG cells. Cells were incubated with the compounds at γ -T, 50 μ M; γ -TE, 35 μ M; XM462, 100 μ M; RV, 100 μ M; PXD, 100 μ M and CCX, 100 μ M for 24 h. Lipids analysis was carried out by LC/MS. A. Amounts of total sphingolipids. B. Increase of total sphingolipids over vehicle-treated controls. C–G. dhCer species. H. Percentage of dhCer species in differently treated cells. In A, B and H, data were obtained from 4 experiments with triplicates. Data corresponding to each sphingolipid family were analyzed by one way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$ (*, $P < 0.05$ from vehicle-treated cells). In C–G, all dhCer species increased significantly over the respective vehicle controls (unpaired, two-tailed t -test, $P < 0.01$)

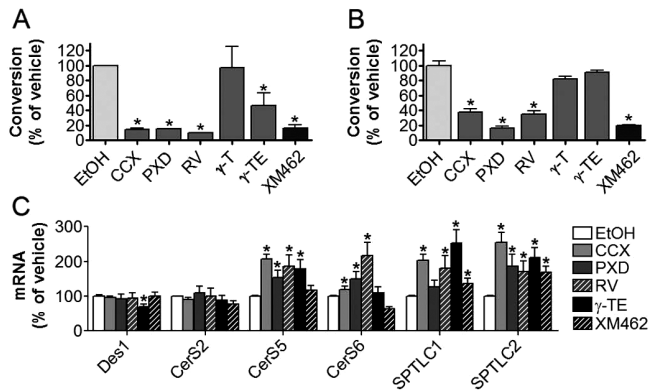


Fig. 3. Effect of the test compounds on the activity of Des1. A. T98G cells were treated for 20 h with either ethanol (control), CCX (50 μ M), PXD (50 μ M), RV (100 μ M), γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M) or XM462 (100 μ M) (positive control). Then, the Des1 substrate (dhCer6NBD, 10 μ M) was added and cells were collected 4 h later. Medium and cell samples were analyzed by HPLC coupled to a fluorescence detector (see [33]). B. cell lysates were incubated with both substrate (10 μ M) and test compounds (CCX, 100 μ M; PXD, 50 μ M; RV, 100 μ M; γ -T, 50 μ M; γ -TE, 200 μ M; XM462, 10 μ M) for 4 h and analysis was carried out by HPLC coupled to a fluorescence detector. C. Effect of compounds at the same concentrations as in A on mRNA levels (as determined by quantitative real-time PCR). In both A and B, data are the average \pm SD of two independent experiments with triplicates. In C, data correspond to 5 independent experiments with duplicates. Data were analyzed by one way ANOVA following by Dunnett's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. (*, $P < 0.01$ from vehicle-treated cells).

3.3. The increase in dhCer levels occurs by decreased Des1 activity and stimulation of ceramide biosynthesis *de novo*

The observed effect of the compounds on the sphingolipidome agreed with Des1 inhibition. This was confirmed in enzyme assays using a fluorescent analog of dhCer as substrate [33] and the test compounds at the concentrations found to increase dhCer levels. As shown in Fig. 3A, all compounds except for γ -T provoked a reduction in Des1 activity when administered to whole cells (20 h). The lowest effect was produced by γ -TE, which reduced Des1 activity to about the 50% of control in the assay conditions. The other compounds tested provoked a similar reduction in Des1 activity to an approximately 15% of control, in resemblance with the inhibition provoked by the Des1 active site-directed inhibitor XM462. When Des1 inhibition was tested in cell lysates, potent inhibition was exhibited by PXD, RV and XM462

(positive control) (Fig. 3B). However, CCX inhibited Des1 in cell lysates at concentrations higher than those required for inhibition in intact cells and γ -TE was not inhibitory (Fig. 3B). This last result suggested that decreased Des1 activity in intact cells exposed to γ -TE could result from down-regulation of Des1 expression. This assumption was confirmed in mRNA analysis by qPCR, which showed that cells treated with γ -TE at the same concentrations found to decrease Des1 activity contained significantly less Des1 transcript than controls (Fig. 3C). In contrast, other transcripts involved in ceramide synthesis *de novo* were either unaffected or upregulated by γ -TE. As for the other Des1 inhibitors examined, none of them modified Des1 mRNA levels as compared to controls, but provoked an increased expression of genes of the *de novo* pathway (Fig. 3C). These overall results indicate that the compounds studied here bring about an increase in cellular dhCer by both stimulating Cer synthesis *de novo* and decreasing Des1 activity by either direct inhibition or down-regulation of Des1 gene expression.

3.4. Inhibition of Des1 induces cytoprotective autophagy

Several lines of evidence support that dhCer mediate autophagy induced by different inputs, including cell exposure to both cytotoxic [32, 40] and non-toxic compounds [37]. Since the compounds studied here induce an increase in dhCer, we examined whether they activated autophagy in the two cell lines at the same concentrations and incubation time (24 h) used to examine their effect on the sphingolipidome. Western blot analysis of proteins from U87MG and T98G cells treated with CCX, RV, PXD and γ -TE showed an increased production of LC3-II over controls. The increase in LC3-II expression was enhanced in the presence of protease inhibitors, demonstrating that the 4 compounds activate the autophagic flux in both U87MG (Fig. 4) and T98G (Fig. S2) cells. The active site-directed Des1 inhibitor XM462 at 100 μ M/24 h also induced an LC3-II increase, which was augmented in the presence of protease inhibitors in both U87MG (Fig. 4) and T98G (Fig. S2) cells. In contrast, γ -T (100 μ M/24 h) did not induce the production of LC3-II in either U87MG (Fig. 4) and T98G (Fig. S2) cells. Similar results were found when the autophagy substrate p62/SQSTM1 was monitored (Fig. S3). The increase in p62 levels over vehicle controls in all treatments except for γ -T correspond to the expected changes during initiation of autophagy [61].

Immunofluorescence studies with an antibody that recognizes preferentially the lipidated form of endogenous LC3, revealed an increased accumulation of immunostained LC3-II puncta in cells treated with the compounds, except for γ -T, in comparison to cells treated with

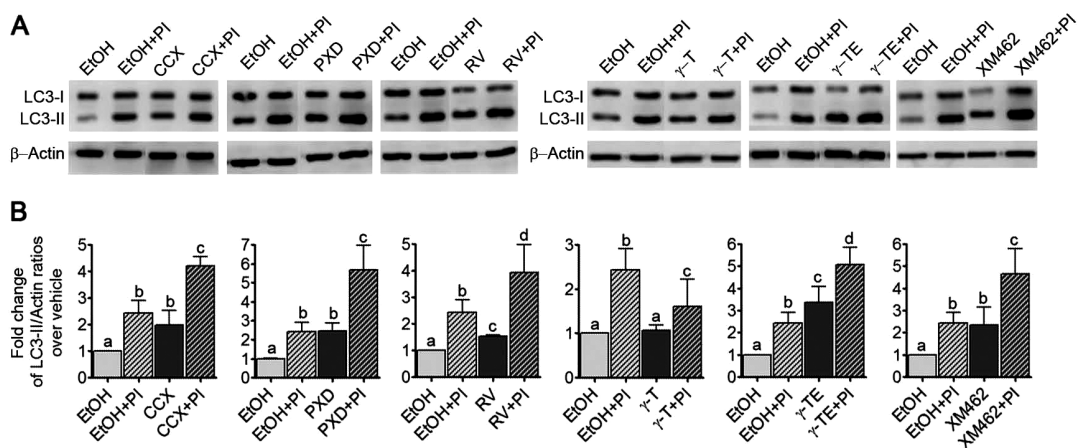


Fig. 4. Effect of the test compounds on the autophagic flux in U87MG cells. Cells were treated with CCX (100 μ M), PXD (100 μ M), RV (100 μ M), γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M) and XM462 (100 μ M) for 24 h with or without a preincubation of 2 h with protease inhibitors (PI) (E64D and Pepstatin A). A. Western blot images corresponding to one representative experiment. B. Histograms showing the fold-changes of LC3-II/Actin over control (EtOH). Data are the average \pm SD of five individual experiments and were analyzed by one way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each bar denote statistical significance between groups ($P < 0.05$).

vehicle, indicating that the compounds induce autophagosome formation (Figs. 5 and S4).

Using U87MG cells as models, we found that inhibition of autophagy with 3-methyladenine (3MA) (5 mM) increased the cytotoxicity of DIPACS, as concluded from the significant shift of the dose-response curves to the left (resulting in decreases in the CC_{50} values as compared to 3MA untreated cells) (Fig. 6A). Inhibition of autophagy by 3MA in our experimental conditions was confirmed by Western blot analysis of LC3-II in treatments with PXD in the presence and absence of 3MA. As shown in Fig. 6B, C, 3MA reduced the amounts of LC3-II induced by PXD both in the absence and presence of PI, confirming inhibition of the autophagic flux by 3MA. These results indicate that the autophagy induced by DIPACS in U87MG cells is cytoprotective.

3.5. Autophagy is also induced by DIPACS independently of dhCer production

In order to assess whether dhCer was a strict requirement for autophagy activation by DIPACS, a series of experiments were carried out under conditions of impaired dhCer synthesis. In a first set of experiments, dhCer synthesis was blunted with myriocin, an inhibitor of SPT, the enzyme that catalyzes the first committed step in the *de novo* ceramide synthesis pathway. As shown in Figs. 7A, B and S5A, B, cells treated with myriocin (5 μ M/24 h) prior to addition of RV, PXD or γ -TE at concentrations shown to induce autophagy produced lower LC3-II levels than cells treated with the compounds alone for 24 h. Protease inhibitors enhanced the increase in LC3-II induced by the compounds, but lower levels of LC3-II were also evident in myriocin plus protease inhibitors-treated cells.

Moreover, cells treated in parallel with the compounds for 24 h after 24 h preincubation with myriocin produced significantly less dhCer (and SL in general) than controls treated with the compounds only (Figs. 7C and S5C). However, myriocin-pretreatment reduced the compounds-promoted increase in dhCer to a higher extent than it lowered autophagy induction (compare Fig. 7B with 7C and Fig. S5B with S5C). Furthermore, myriocin pretreatment did not modify the levels of LC3-II induced by CCX (Figs. 7A, B and S5A, B), although significantly less

SL, including dhCer, were present in the myriocin pretreated samples than in vehicle treated controls (Figs. 7C and S5C). On the other hand, cell viability determinations evidenced that myriocin pretreatment did not modify the effect of DIPACS on cell viability at least under our experimental conditions (data not shown). These results suggest that dhCers are not a strict requirement for autophagy induction by DIPACS and that other mechanisms in addition to dhCer-accumulation may be involved in the cell sensitivity to these compounds. The latter is not unexpected, since none of the compounds acts exclusively as an inhibitor of Des1.

In a second set of experiments, the ability of DIPACS to induce autophagy was examined in a clone of U87MG cells that exhibited a remarkably low competence at producing ceramide *de novo* (U87DND). Thus, these cells exhibited very low levels of basal mRNA for serine palmitoyltransferases (SPT) long chain 1 and 2 (LC1 and LC2) and ceramide synthases (CerS) 2, 5 and 6 (CerS2, CerS5 and CerS6). The *de novo* ceramide synthesis competent U87MG cells were used as positive controls to ensure that proper primers were used to amplify the target genes (Fig. S6A). Furthermore, the levels of those transcripts did not rise by treatment with the compounds (data not shown). In agreement with the gene expression data, lipid analysis carried out in U87DND cells exposed to marginally toxic concentrations of DIPACS showed a low capacity to respond to the compounds by increasing dhCer levels (Fig. S6B). Thus, while in U87MG and T98 cells dhCer amounts experienced large increases upon treatments, ranging from 5 to 30-fold over vehicle control (Fig. 2B, S1B), dhCer levels increased only 2–2.5-fold of vehicle in U87DND cells (Fig. S6C). Therefore, these cells were envisaged to be a good model to investigate the putative capacity of DIPACS to induce autophagy in a dhCer-independent predominant way and its role in cell fate. To this aim, the autophagy essential Atg5 gene was stably silenced in U87DND cells. Despite the low capacity of U87DND cells to increase dhCer in response to DIPACS, the compounds were able to induce autophagy in U87DND-shC cells (infected with viral particles containing nontargeted control shRNA constructs). As expected, levels of LC3-II in U87DND-shAtg5 cells treated with the compounds were significantly lower than those in treated mock cells (U87DND-shC) both in the presence and absence of protease inhibitors (Fig. 8A, B), sustaining the success of Atg5 silencing at decreasing the cells competence at undergoing

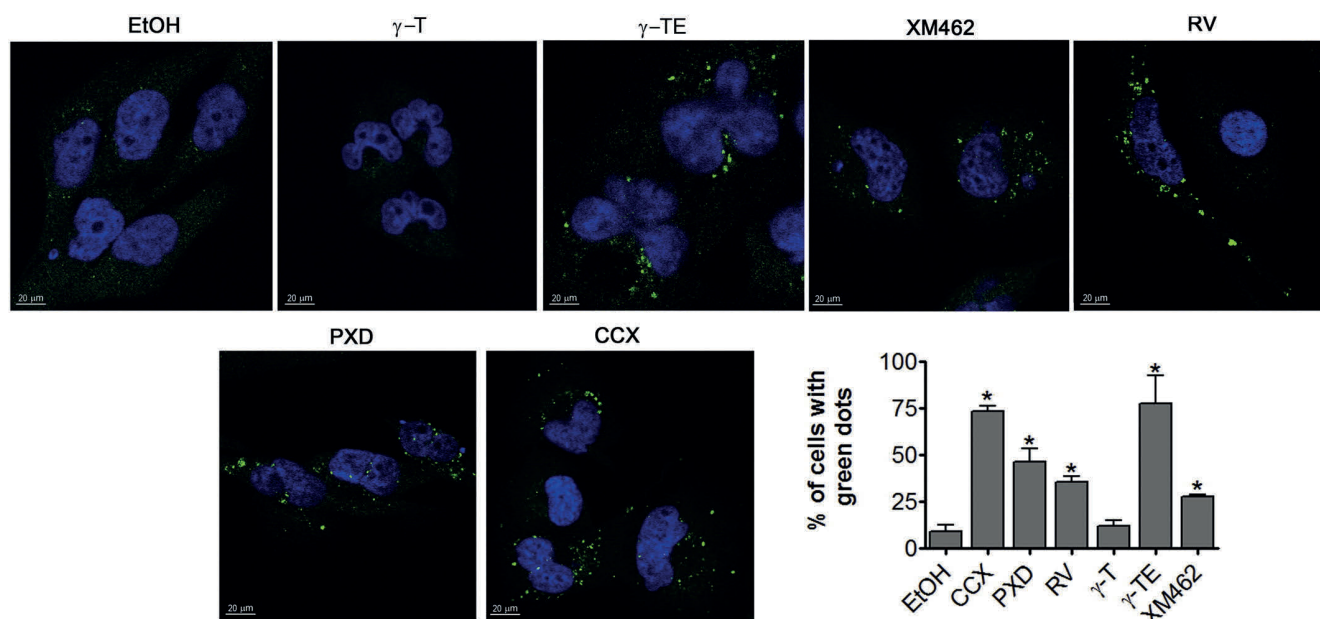


Fig. 5. Autophagy induction by the test compounds. Representative images showing the formation of immunostained-LC3 puncta in U87MG cells after treatment with γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M), RV (100 μ M), PXD (100 μ M) and CCX (100 μ M) for 24 h. Ethanol was used as control and XM462 (100 μ M) was used as a positive control of autophagy induction. The percentage of cells with more than five defined cytosolic green dots is represented in the histogram. * $P \leq 0.01$ (one way ANOVA following by Dunnet's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$). Analysis was performed by confocal fluorescence microscopy.

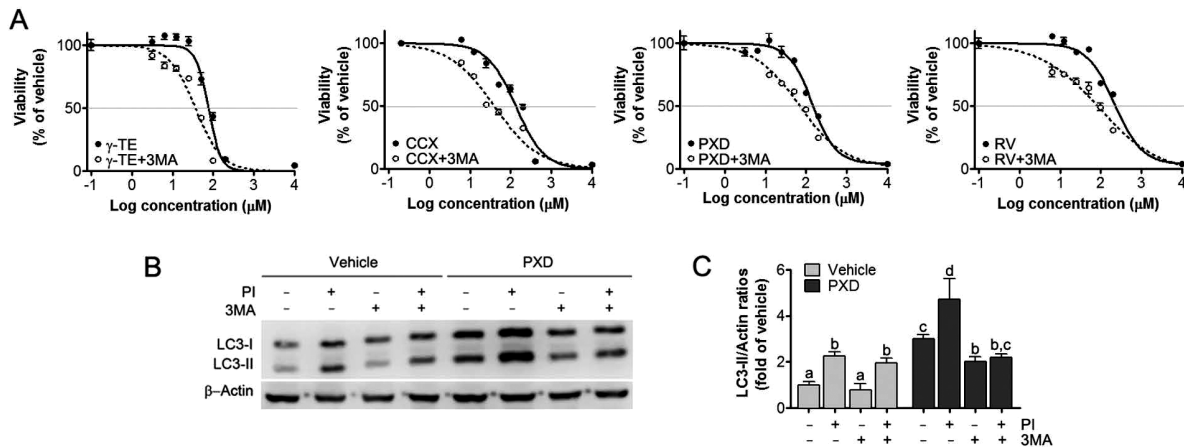


Fig. 6. Effect of 3-methyladenine on the activity of DIPACS on cell viability. **A.** U87MG cells were treated with either ethanol or 3MA (5 mM) for 3 h and then serial dilutions of γ -TE, CCX, PXD and RV were added to the culture without medium renewal and cells were incubated for 24 h. Cell viability was estimated by the sulphorhodamine B assay. Data (average \pm SD) correspond to one representative experiment ($n = 3$ for each dose) that was performed 3 times. Curve fitting with the sigmoidal dose-response (variable slope) equation afforded the following CC_{50} values (μ M) (95% confidence intervals): γ -TE/vehicle, 75.65 (61.86 to 92.52); γ -TE/3MA, 36.73 (29.56 to 45.63); CCX/vehicle, 133.0 (109.2 to 161.9); CCX/3MA, 39.7 (32.47 to 48.54); PXD/vehicle, 141.9 (116.6 to 172.6); PXD/3MA, 69.2 (50.89 to 94.08); RV/vehicle, 217.7 (159.0 to 298.3); RV/3MA, 93.06 (54.35 to 159.3). The differences between data sets corresponding to treatments with each compound in the absence and presence of 3MA were statistically significant at $P < 0.0001$ in all cases (extra sum-of-squares F test. F (DFn/DFd): γ -TE, 25.04 (2/47); CCX, 38.15 (2/44); PXD, 32.08 (2/42); RV, 43.30 (2/42)). **B.** Cells were incubated with PXD (100 μ M) for 24 h after a 3 h preincubation with 3MA (5 mM) or vehicle and a subsequent 2 h treatment with protease inhibitors (PI) or vehicle. Cells were then collected and processed for Western blot analysis. **B.** Western blot image corresponding to one representative experiment. **C.** Fold-changes of LC3-II/Actin ratios over control (EtOH) (mean \pm SD, three experiments with triplicates, $n = 9$). Statistical analysis was carried out by one way ANOVA followed by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each bar denote statistical significance ($P < 0.05$).

autophagy. This result supports that DIPACS are able to induce autophagy even in conditions of low dhCer production. On the other hand, genetic inhibition of Atg5 resulted in a slight but significant increase in viability over controls (U87DND-shC) in treatments with RV, PXD and CCX, while not significantly different curves were obtained with γ -TE (Fig. 8C). These findings suggest that the autophagy induced independently of *de novo* dhCer synthesis leads to cell death in the case of CCX, RV and PXD, while autophagy does not participate in cell death induced by γ -TE in the experimental conditions of the assay.

3.6. Effect of dhCer on PXD cytotoxicity

Although the different autophagy outcome in U87MG and U87DND cells exposed to DIPACS is likely explained in terms of activation of different targets in the two different cell line models, the fact that autophagy induced in U87MG cells (responding with large increases in dhCer) was cytoprotective while cytotoxic autophagy was activated when rises in dhCer were limited (U87DND cells) suggested a prosurvival role of dhCer. To assess this possibility and the implication of autophagy in the cytoprotective activity of dhCer, the effect of a metabolic precursor of dhCer on PXD cytotoxicity was examined in U87DND shC and U87DND shAtg5 cells. PXD was chosen as model compound because its cytotoxicity was dramatically different in the *de novo* Cer synthesis competent (U87MG) and poorly competent (U87DND) cells (Compare Fig. 1A with Fig. 8C). A dideuterated dihydroceramide analog, namely *N*-octanoyl-*D*-erythro-[4,4- 2 H $_2$]sphinganine (d2C8dhCer) was used as metabolic source of dhCer. This molecule is *N*-transacylated and desaturated in intact cells, although desaturation occurs at a slower rate than that of natural dhCer due to the existence of a primary isotope effect [62], thereby resulting in an accumulation of dideuterated dihydroceramides. As expected, both U87DND shC and U87DND shAtg5 cells treated with d2C8dhCer accumulated dideuterated dihydroceramides (Fig. 9A) of different *N*-acyl chain lengths, accounting for total of *ca* 1900 pmols/10⁶ cells. Furthermore, as shown in Fig. 9B, U87DND shC cells treated with PXD in the presence of d2C8dhCer were significantly more resistant ($CC_{50} = 1.46 \mu$ M; 95% confidence interval: 1.37 to 1.55 μ M) to PXD than cells untreated with d2C8dhCer ($CC_{50} = 0.86 \mu$ M; 95% confidence interval: 0.76 to 0.97 μ M). These results support a cytoprotective role for dhCer in the experimental

conditions of our assay. Interestingly, d2C8dhCer treatment did not modify significantly the sensitivity of U87DND shAtg5 cells to PXD (Fig. 9B) [vehicle: $CC_{50} = 1.36 \mu$ M (95% confidence interval: 1.206 to 1.537 μ M); d2C8dhCer: $CC_{50} = 1.37 \mu$ M (95% confidence interval: 1.240 to 1.509 μ M)], supporting that the protective effect of towards PXD elicited by the deuterated dhCer is likely to involve autophagy and it occurs upstream of autophagy activation. To support the hypothesis that dhCer was protective *via* the induction of autophagy, the levels of LC3-II in U87DND cells treated or not with d2C8dhCer were measured. As shown in Fig. 9C, D, treatment with d2C8dhCer induced and increase in LC3-II levels over controls and this increase was enhanced in cells pretreated with protease inhibitors.

4. Discussion

After the pioneering work by Merrill and co-workers [35], studies involving pharmacological inhibitors to reduce Des1 activity [37,50] or using fibroblasts from a *DES1* gene knock-out mice [63] have provided further support for a role for dhCer in autophagy induction. However, the action of dhCer on cell fate and whether their activity at promoting cell death or survival follows autophagy induction are less clear. Thus, in some studies, Des1 blockade resulted in cell proliferation arrest or delay [63–65] and increased resistance to apoptosis caused by diverse stimuli [50,63,66–68], such as chemotherapeutic drugs [50,66] and photodynamic therapy [67]. On the other hand, accumulation of dhCer has been reported to favor cell survival in adaptation to hypoxia [64,69]. In contrast to these cytoprotective effects of dhCer, CCX [40] and γ -TE [46] have been shown to induce autophagy and cytotoxicity by increasing dhCer and sphinganine levels and a selective increase of C22:0- and C24:0-dhCer has been reported to induce autophagy and mixed cytotoxicity in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines [60]. Likewise, accumulation of dhCer has been demonstrated to induce cytotoxic autophagy in glioma cells upon tetrahydrocannabinol treatment [32]. Importantly, only in a few of the above studies the effect of dhCer on cell fate has been shown to follow autophagy induction [32,50,60,63]. In an attempt to shade additional light on the role of dhCer in autophagy activation and outcome (protection or death), in this work we studied the effect of several Des1 inhibitors on the autophagic flux and cell fate in U87MG and T98G glioblastoma cell lines.

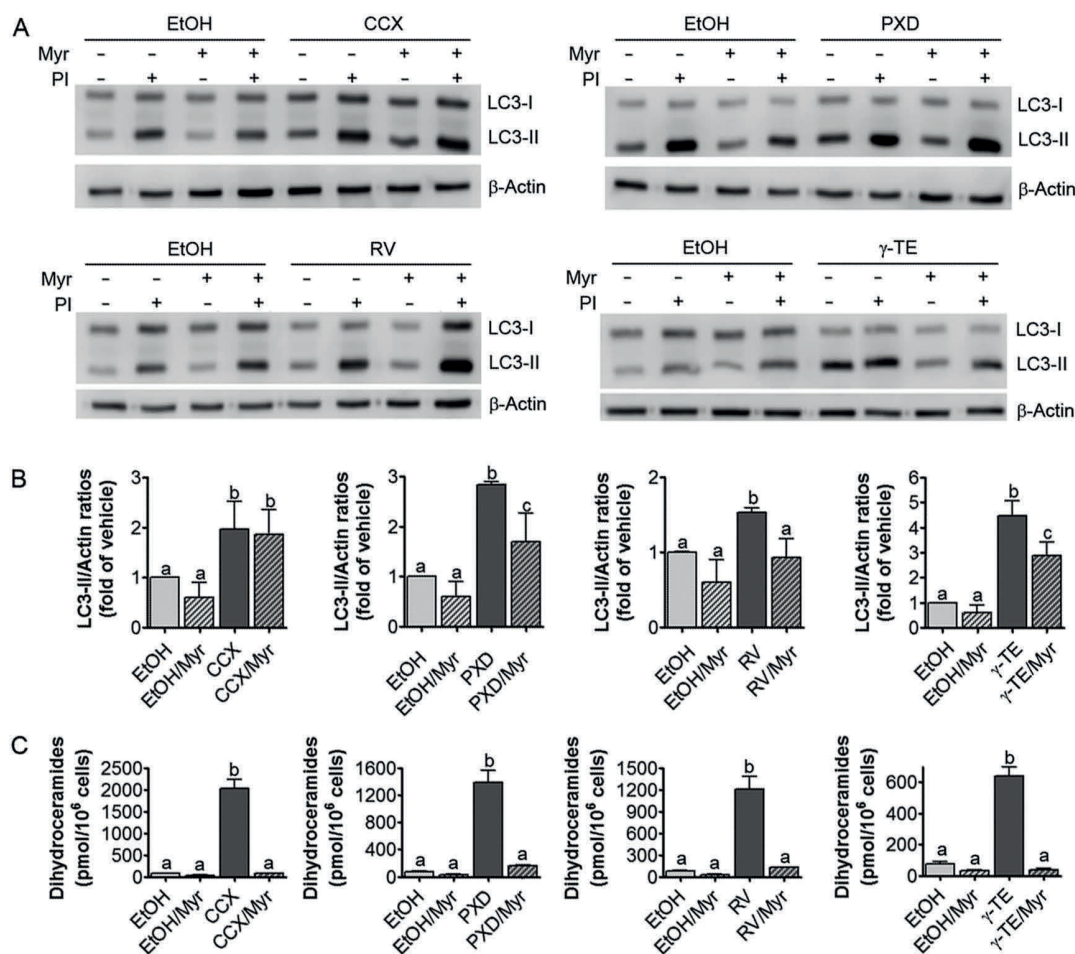


Fig. 7. Effect of myriocin on the activity of the test compounds in U87MG cells. Cells were treated with CCX (100 μ M), PXD (100 μ M), RV (100 μ M), γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M) and XM462 (100 μ M) for 24 h after a 24 h preincubation with myriocin (Myr) (5 μ M) or vehicle and a subsequent 2 h treatment with protease inhibitors (PI) or vehicle. Cells were then collected and processed for either Western blot (A, B) or lipid analysis (C). A. Western blot images corresponding to one representative experiment. B. Fold-changes of LC3-II/Actin ratios over control (EtOH) are shown in the histograms. C. Amounts of total dhCer analyzed by LC/MS. Data are the average \pm SD of four experiments with duplicates (A, B) and three experiments with triplicates (C). Statistical analysis was carried out by one way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each denote statistical significance ($P < 0.05$).

Although the compounds examined in this article had been reported to increase dhCer levels [32,37,40,46] their Des1 inhibitory activity had not been examined in enzyme-based assays except for CCX [40]. In this work we found that CCX, RV and PXD decreased Des1 activity in intact cells without modifying the *DES1* gene expression. Furthermore, inhibitory activity was retained in cell lysates, proving that inhibition occurs at the protein level or by interacting with the Des1 associated electron transport chain [22]. This is not the case of γ -TE, which was not inhibitory in cell lysates but it reduced Des1 activity in intact cells by decreasing gene expression. It is worth noting that higher concentrations were required for CCX to inhibit Des1 in cell lysates than in intact cells. This difference in activity between intact and lysed cells was also reported for the active site directed inhibitor GT11 in cerebellar primary neurons [70] and it can be explained by the situation in living cells, which might allow for a local subcellular enrichment of the inhibitor at its site of action, the endoplasmic reticulum. CCX has been reported to inhibit Des1 in cultured HCT116 cells with an IC_{50} value of 79 μ M, but the activity in cell lysates was not examined [40]. A higher Des1 inhibitory potency has been found here in intact T98G cells, since around a 90% inhibition was observed with 50 μ M CCX.

In this article we provide further evidence that dhCer participate in the induction of the autophagic flux. Thus, we show that autophagy is activated in glioblastoma T98G and U87MG cell lines by treatment with RV, PXD, CCX and γ -TE, all of which provoke an increase in

dhCer levels by stimulating Cer synthesis *de novo* and decreasing Des1 activity. Similar results were found with the Des1 active site-directed inhibitor XM462. Moreover, γ -T, which differs from γ -TE by the absence of the double bonds in the isoprenoid chain, does not induce autophagy, is unable to promote an increase in dhCer and does not inhibit Des1 activity. Nevertheless, myriocin pretreatment reduced the compounds-promoted increase in dhCer to a much higher extent than it lowered autophagy induction. Furthermore, the compounds ability to induce autophagy was retained in cells with a very low capacity for ceramide biosynthesis *de novo* (U87DND) and thus poorly able to accumulate dhCer in response to DIPACS treatments. These two lines of evidence support that the DIPACS examined in this study are also able to stimulate the autophagic flux independently of dhCer generation and that dhCer is not the only mediator of autophagy induced by Des1 inhibitors.

Regarding the autophagy outcome, U87DND cells with a decreased ability to undergo autophagy (U87DND-shAtg5) were significantly more resistant to RV, PXD and CCX than autophagy competent U87DND cells (U87DND-shC). These results support that CCX, PXD and RV-induced dhCer-independent autophagy leads cells to exhaustion and death. In contrast, sensitivity to γ -TE was similar in both cell lines, suggesting that, in our experimental conditions, dhCer-independent autophagy and cell death signaling following γ -TE treatment act independently of each other. In contrast, inhibition of early steps of the autophagic machinery with 3MA increased the sensitivity of

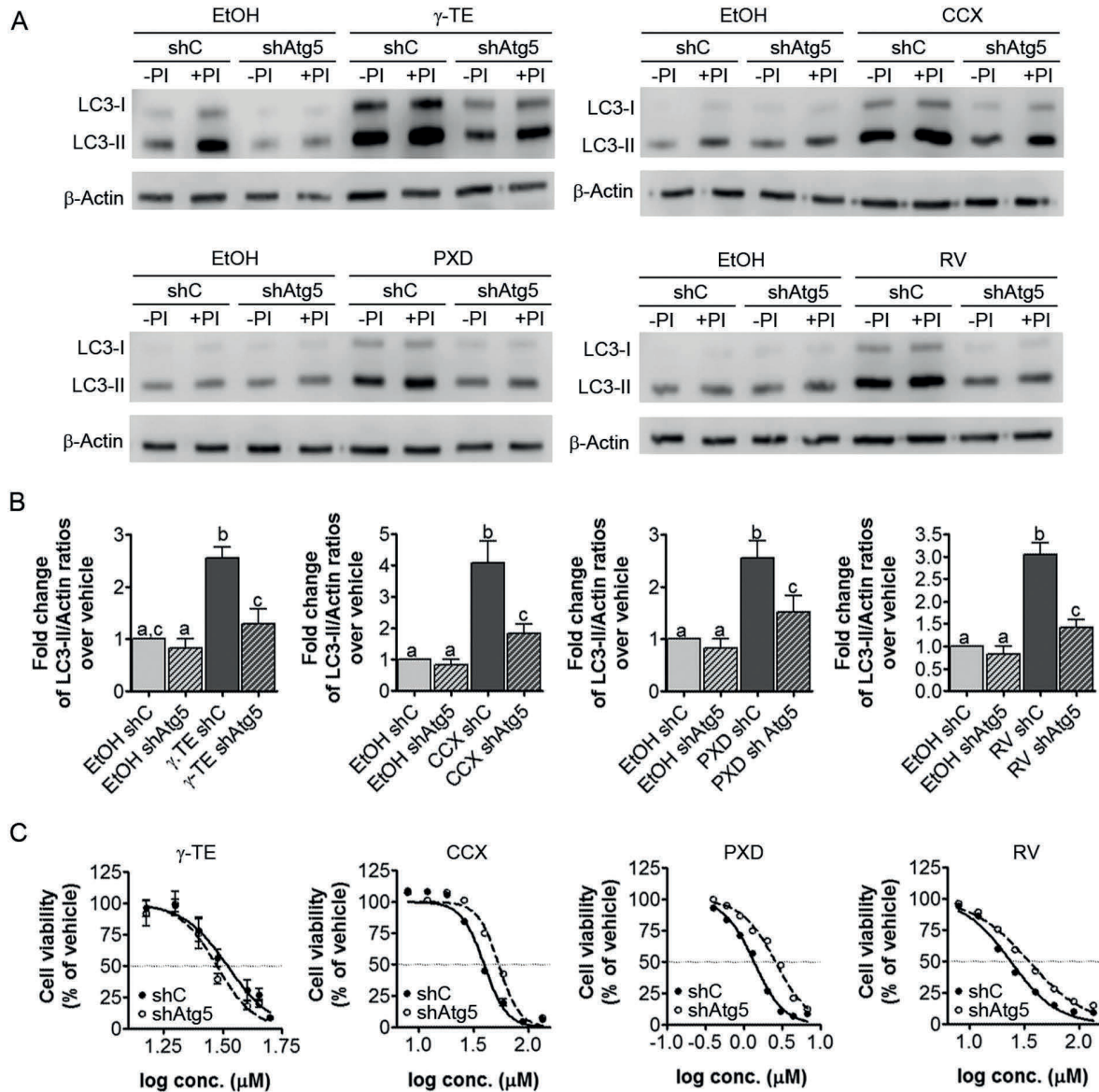


Fig. 8. Effect of Atg5 silencing on cell viability and proautophagic activity of the test compounds in U87DND cells. A. Cells (shC, U87DND-shC; shAtg5, U87DND-shAtg5) were treated for 48 h with either ethanol or γ -TE (28 μ M), CCX (33 μ M), PXD (1 μ M) or RV (18 μ M). Western blot images corresponding to one representative experiment. B. Fold of LC3-II/Actin ratios over sh-C/EtOH. Data are the average \pm SD of three experiments with triplicates. C. Cells were treated with either ethanol or serial dilutions of CCX, PXD, RV or γ -TE for 48 h and cell viability was estimated by the sulphorhodamine B assay. Data are the average \pm SD of three experiments with triplicates. In C, curve fitting with the sigmoidal dose-response (variable slope) equation afforded the following CC50 values (μ M) (95% confidence intervals): U87DND shC: γ -TE, 33.2 (31.0 to 35.4), CCX, 39.5 (38.2 to 40.9); PXD, 1.4 (1.3 to 1.4); RV, 23.8 (22.8 to 25.0). U87DND shAtg5: γ -TE, 29.9 (27.9 to 32.0), CCX, 53.6 (51.9 to 55.2); PXD, 2.6 (2.4 to 2.6); RV, 35.2 (33.4 to 36.6). Data were obtained from 3 to 5 experiments with triplicates. Comparison of fits gave statistically significant ($P < 0.0001$) differences between the LogCC₅₀ values for CCX (F (DFn/DFd) = 159.8 (1/188)), PDX (F (DFn/DFd) = 544.2 (1/181)) and RV (F (DFn/DFd) = 134.6 (1/139)). In B, statistical analysis was carried out by one way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each denote statistical significance ($P < 0.05$).

U87MG cells to DIPACS, supporting that dhCer-mediated autophagy induction occurs prior to the observed effects of the test compounds on cell viability and that it drives cell survival in the experimental conditions of our assays. In support of a role of dhCer at promoting pro-survival autophagy, exposure to an exogenous dhCer precursor increased the resistance to PXD of autophagy competent U87DND cells, but had no effect on autophagy deficient U87DND cells. The finding that d2C8dhCer induces the autophagic flux in U87DND cells provides support to the hypothesis that dhCer is protective *via* the activation of autophagy. These results are in accordance with previous studies demonstrating a role of dhCer at promoting cytoprotective autophagy induction [50,63], but disagree with reported data showing the induction of cytotoxic autophagy by dhCer [32,58]. The reasons for

these discrepancies are so far unclear and they may involve differences in cell lines (and therefore intracellular targets and metabolic pathways) and the cellular context or experimental conditions (i.e. percentage of FBS in the culture medium). For instance, the test compounds may induce cytoprotection of U87MG cells by dhCer-mediated autophagic degradation of proapoptotic caspase-8 [71]. This is one possibility deserving investigation.

Although all DIPACS tested in this work induced dhCer accrual, they had different effects on cell viability. Given the varied nature of the compounds, these results can be explained considering the involvement of different targets to modulate cell fate. However, the differently *N*-acylated dhCer species produced as response to the various treatments may also contribute to define the cell outcome. Interestingly, PXD and

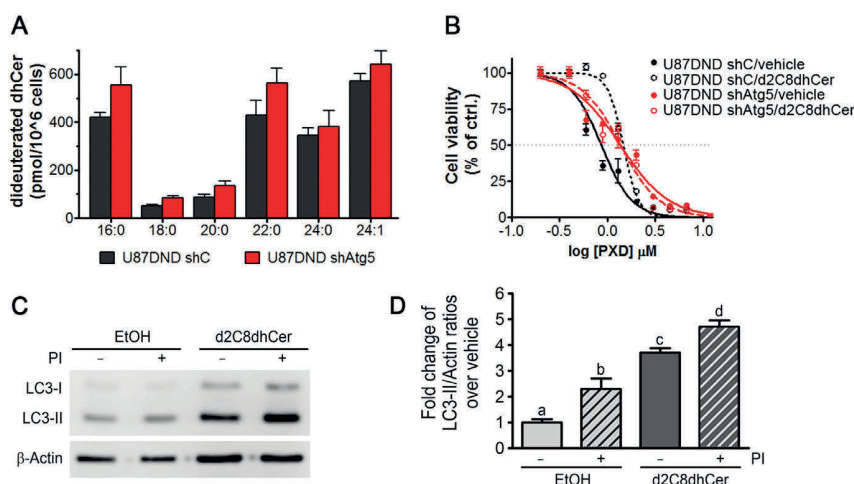


Fig. 9. Effect of d2C8dhCer on PXD cytotoxicity, d2hCer levels and the autophagic flux. U87DND shC and U87DND shAtg5 cells were treated with PXD in the absence (vehicle) or presence of d2C8dhCer (25 μ M) for 24 h. A new dose of d2C8dhCer was added and cells were grown for 24 h additional hours. Then lipid analysis was carried out by UPLC-TOF MS of lipid extracts (A) and cell viability was measured by sulphorhodamine B (B). Data represent the mean \pm SD of two experiments with triplicates. In B, curve adjustment with the four parameter logistic equation with variable slope afforded IC_{50} values of 0.86 μ M (95% confidence interval: 0.76 to 0.97 μ M) (vehicle) and 1.46 μ M (95% confidence interval: 1.37 to 1.55 μ M) (d2C8dhCer) in U87DND shC cells and 1.36 μ M (95% confidence interval: 1.206 to 1.537 μ M) (vehicle) and 1.37 μ M (95% confidence interval: 1.240 to 1.509 μ M) (d2C8dhCer) in U87DND shAtg5 cells. Global comparison of fits show that differences between curves corresponding to vehicle and d2C8dhCer-treated cells are statistically significant for U87DND shC ($P < 0.0001$; F (DFn/DFd) 56.91 (2/53)), but not U87DND shAtg5 cells. C, Representative Western blot image showing the effect of d2C8dhCer at activating the autophagic flux in U87-DND cells. D, Fold-changes of LC3-II/Actin ratios over control (EtOH). Data are the average \pm SD of four independent experiments. Statistical analysis was carried out by one way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each denote statistical significance ($P < 0.05$).

RV, the least toxic compounds, produced C24:0-dhCer preponderantly, while C16-dhCer and C24:1-dhCer were also abundantly increased in treatments with γ -TE and CCX, which exhibited higher cytotoxicity than PXD and RV. These findings concur with a cytoprotective role for C24:0-dhCer. However, silencing Cers2, which produces C24:0-dhCer (and C24:0-Cer) did not increase the sensitivity of U87MG cells to PXD and RV (data not shown). Furthermore, a selective increase of C22:0- and C24:0-dhCer has been reported to induce cytotoxicity, not survival, in T-cell acute lymphoblastic leukemia cells [60]. Regarding the augmented and reduced levels of C24:0-dhCer and C24:1-dhCer, respectively, in treatments with PXD and RV, a recent report has shown that genetic ablation of stearoyl-CoA desaturase 1 in 3T3-L1 adipocytes results in an increased ratio of 24:0 to 24:1 in ceramide, sphingomyelin and glycosphingolipids [72]. This suggests that the increased ratio of C24:0-dhCer to C24:1-dhCer in treatments with PXD and RV could arise from a reduction in stearoyl-CoA desaturase activity. In support of this possibility, RV and genistein have been reported to inhibit stearoyl-CoA desaturase gene expression [73,74].

As recently reported for tetrahydrocannabinol [32], another possibility is that the dhCer/Cer ratios instead of the absolute increase in dhCer levels resulting in cells after treatment influence the dhCer-dependent autophagy outcome. Clustering analysis of individual dhCer/Cer ratios for the differently *N*-acylated species (Fig. S7) revealed that non-cytotoxic treatments (RV and PXD) result in lower short chain-dhCer/Cer ratios than more cytotoxic treatments (γ -TE and CCX), with this difference being especially relevant for the C18-dhCer/Cer ratios. In agreement with previous reports showing that dhCer counteract the effects of Cer [68] and supporting dissimilar activities of differently acylated dhCer [59,60] and Cer species [51–58], the difference in short-chain dhCer/Cer ratios may contribute to explain the contrasting sensitivity of cells to the compounds studied here. Although myriocin pretreatment did not affect the sensitivity of U87MG cells to the test compounds despite reducing all dhCer/Cer ratios, we cannot disregard that prolonged downregulation of SPT (as in stable knockdowns, for instance) is necessary to upregulate or downregulate cell death or survival mediators, respectively, while the transient blockade of SPT does not allow sufficient time to trigger such hypothetical long-term adaptive responses.

The likely varied molecular mechanisms involved in autophagy induction by DIPACS and its outcome have not been investigated in

this work. In the light of reported articles, potential mediators in cell death decisions include ROS. Their generation has been reported to be activated by RV [75–77] and CCX and some derivatives thereof [78–80]. However, RV is also known to be a robust scavenger of ROS [81–83] and both γ -TE [84,85] and genistein [86] decrease rather than induce ROS production. The possibility that dhCer induce ROS has not been investigated, but it has been reported that dhCer accumulation and ROS generation are distinct events in leukemia cell death mediated by fenretinide (another known Des1 inhibitor) [87].

In summary, we have provided experimental evidence that in T98G and U87MG glioblastoma cell lines, CCX, PXD, RV and γ -TE induce autophagy concomitantly with dhCer buildup due to stimulation of Cer synthesis *de novo* and decreased Des1 activity. However, autophagy activation by these DIPACS is also induced in conditions of poor dhCer accrual, indicating that other actors besides dhCer are involved in autophagy activation by Des1 inhibitors. Whether autophagy leads to cell death or survival upon exposure to Des1 inhibitors most likely depends on the cell type, the cellular context, the stressing agent and the presence or absence of downstream targets. Although experimental evidence is still lacking, we speculate that the autophagy outcome may be also influenced by the balance between dhCer-independent and dhCer-dependent pathways and that the selective production of differently *N*-acylated dhCer and Cer species and/or their ratios at specific subcellular compartments contribute to the survival effectiveness of the dhCer-dependent pathway.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgements

Partial financial support from the “Ministerio de Economía y Competitividad” (CTQ2014-54743-R) and Fundació La Marató de TV3 (Grant 112132) are acknowledged. We thank SENESCYT-Ecuador for a predoctoral fellowship from to Y. F. O. and Marshall Edwards Pty Ltd. for a donation of phenoxodiol.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.033>.

References

- [1] S.W. Ryter, S.M. Cloonan, A.M.K. Choi, Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis, *Mol. Cell* 36 (2013) 7–16.
- [2] N. Rohwer, T. Cramer, Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways, *Drug Resist. Updat.* 14 (2011) 191–201.
- [3] T. Yonekawa, A. Thorburn, Autophagy and cell death, *Essays Biochem.* 55 (2013) 105–117.
- [4] D. Gozuacik, A. Kimchi, Autophagy and cell death, *Curr. Top. Dev. Biol.* 78 (2007) 217–245.
- [5] D. Denton, S. Nicolson, S. Kumar, Cell death by autophagy: facts and apparent artefacts, *Cell Death Differ.* 19 (2012) 87–95.
- [6] Z. Papáčkova, M. Cahová, Important role of autophagy in regulation of metabolic processes in health, disease and aging, *Physiol. Res.* 63 (2014) 409–420.
- [7] D.C. Rubinstein, P. Codogno, B. Levine, Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases, *Nat. Rev. Drug Discov.* 11 (2012) 709–730.
- [8] Y. Cheng, X. Ren, W.N. Hait, J.-M. Yang, Therapeutic targeting of autophagy in disease: biology and pharmacology, *Pharmacol. Rev.* 65 (2013) 1162–1197.
- [9] W. Martinet, P. Agostinis, B. Vanhooeck, M. Dewaele, G.R.Y. De Meyer, Autophagy in disease: a double-edged sword with therapeutic potential, *Clin. Sci. (Lond.)* 116 (2009) 697–712.
- [10] X. Peng, F. Gong, Y. Chen, Y. Jiang, J. Liu, M. Yu, S. Zhang, M. Wang, G. Xiao, H. Liao, Autophagy promotes paclitaxel resistance of cervical cancer cells: involvement of Warburg effect activated hypoxia-induced factor 1- α -mediated signaling, *Cell Death Dis.* 5 (2014) e1367.
- [11] Y. Zhou, K. Sun, Y. Ma, H. Yang, Y. Zhang, X. Kong, L. Wei, Autophagy inhibits chemotherapy-induced apoptosis through downregulating Bad and Bim in hepatocellular carcinoma cells, *Sci. Rep.* 4 (2014) 5382.
- [12] L.-J. Bao, M.C. Jaramillo, Z.-B. Zhang, Y.-X. Zheng, M. Yao, D.D. Zhang, X.-F. Yi, Nrf2 induces cisplatin resistance through activation of autophagy in ovarian carcinoma, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 7 (2014) 1502–1513.
- [13] J. Ge, Z. Chen, J. Huang, J. Chen, W. Yuan, Z. Deng, Z. Chen, Upregulation of autophagy-related gene-5 (ATG-5) is associated with chemoresistance in human gastric cancer, *PLoS ONE* 9 (2014) e110293.
- [14] S. Lefort, C. Joffre, Y. Kieffer, A.-M. Givel, B. Bourachot, G. Zago, I. Bieche, T. Dubois, D. Mesure, A. Vincent-Salomon, J. Camonis, F. Mehta-Grigoriou, Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers, *Autophagy* 10 (2014) 2122–2142.
- [15] H. Yuan, A.-J. Li, S.-L. Ma, L.-J. Cui, B. Wu, L. Yin, M.-C. Wu, Inhibition of autophagy significantly enhances combination therapy with sorafenib and HDAC inhibitors for human hepatoma cells, *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 4953–4962.
- [16] S. Chittarajan, S. Bortnik, W.H. Dragowska, J. Xu, N. Abeysundara, A. Leung, N.E. Go, L. DeVorkin, S.A. Weppner, K. Gelmon, D.T. Yapp, M.B. Bally, S.M. Gorski, Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 3159–3173.
- [17] C. Tommasino, M. Marconi, L. Ciarlo, P. Matarrese, W. Malorni, Autophagic flux and autophagosome morphogenesis require the participation of sphingolipids, *Apoptosis* 20 (2015) 645–657.
- [18] W. Jiang, B. Ogretmen, Autophagy paradox and ceramide, *Biochim. Biophys. Acta* 1841 (2014) 783–792.
- [19] S. Lépine, J.C. Allegood, Y. Edmonds, S. Milstien, S. Spiegel, Autophagy induced by deficiency of sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase 1 is switched to apoptosis by calpain-mediated autophagy-related gene 5 (Atg5) cleavage, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 44380–44390.
- [20] G. Lavieu, F. Scarlatti, G. Sala, S. Carpentier, T. Levade, R. Ghidoni, J. Botti, P. Codogno, Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 8518–8527.
- [21] Y.-L. Huang, C.-L. Chang, C.-H. Tang, Y.-C. Lin, T.-K. Ju, W.-P. Huang, H. Lee, Extrinsic sphingosine 1-phosphate activates S1P5 and induces autophagy through generating endoplasmic reticulum stress in human prostate cancer PC-3 cells, *Cell. Signal.* 26 (2014) 611–618.
- [22] G. Fabrias, J. Muñoz-Olaya, F. Cingolani, P. Signorelli, J. Casas, V. Gagliostro, R. Ghidoni, Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: debutant players in the sphingolipid arena, *Prog. Lipid Res.* 51 (2012) 82–94.
- [23] E. Gabandé-Rodríguez, P. Boya, V. Labrador, C.G. Dotti, M.D. Ledesma, High sphingomyelin levels induce lysosomal damage and autophagy dysfunction in Niemann Pick disease type A, *Cell Death Differ.* 21 (2014) 864–875.
- [24] S. Terés, V. Lladó, M. Higuera, G. Barceló-Coblijn, M.L. Martin, M.A. Noguera-Salvà, A. Marcilla-Etxenike, J.M. García-Verdugo, M. Soriano-Navarro, C. Saus, U. Gómez-Pinedo, X. Busquets, P.V. Escrivá, Normalization of sphingomyelin levels by 2-hydroxyoleic acid induces autophagic cell death of SF767 cancer cells, *Autophagy* 8 (2012) 1542–1544.
- [25] P. Matarrese, T. Garofalo, V. Manganelli, L. Gambardella, M. Marconi, M. Grasso, A. Tinari, R. Misasi, W. Malorni, M. Sorice, Evidence for the involvement of GD3 ganglioside in autophagosome formation and maturation, *Autophagy* 10 (2014) 750–765.
- [26] J. Hwang, S. Lee, J.T. Lee, T.K. Kwon, D.R. Kim, H. Kim, H.-C. Park, K. Suk, Gangliosides induce autophagic cell death in astrocytes, *Br. J. Pharmacol.* 159 (2010) 586–603.
- [27] J. Wei, M. Fujita, A. Sekigawa, K. Sekiyama, M. Waragai, M. Hashimoto, Gangliosides' protection against lysosomal pathology of synucleinopathies, *Autophagy* 5 (2009) 860–861.
- [28] J.L. Armstrong, D.S. Hill, C.S. McKee, S. Hernandez-Tiedra, M. Lorente, I. Lopez-Valero, M. Eleni Anagnostou, F. Babatunde, M. Corazzari, C.P. Redfern, G. Velasco, P.E. Lovat, Exploiting cannabinoid-induced cytotoxic autophagy to drive melanoma cell death, *J. Invest. Dermatol.* 135 (2015) 1629–1637.
- [29] D. Vara, M. Salazar, N. Olea-Herrero, M. Guzmán, G. Velasco, I. Díaz-Laviada, Anti-tumoral action of cannabinoids on hepatocellular carcinoma: role of AMPK-dependent activation of autophagy, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 1099–1111.
- [30] M. Lorente, S. Torres, M. Salazar, A. Carracedo, S. Hernández-Tiedra, F. Rodríguez-Fornés, E. García-Taboada, B. Meléndez, M. Mollejo, Y. Campos-Martín, S.A. Lakatos, J. Barcia, M. Guzmán, G. Velasco, Stimulation of the midkine/ALK axis renders glioma cells resistant to cannabinoid antitumoral action, *Cell Death Differ.* 18 (2011) 959–973.
- [31] M. Salazar, A. Carracedo, I.J. Salanueva, S. Hernández-Tiedra, M. Lorente, A. Egia, P. Vázquez, C. Blázquez, S. Torres, S. García, J. Nowak, G.M. Fimia, M. Piacentini, F. Cecconi, P.P. Pandolfi, L. González-Feria, J.L. Iovanna, M. Guzmán, G. Velasco, Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1359–1372.
- [32] S. Hernández-Tiedra, G. Fabriàs, D. Dávila, I.J. Salanueva, J. Casas, L.R. Montes, Z. Antón, E. García-Taboada, M. Salazar, M. Lorente, J. Nylandsted, J. Armstrong, I. López-Valero, C.S. McKee, A. Serrano-Puebla, R. García-López, J. González-Martínez, J.L. Abad, K. Hanada, P. Boya, F.M. Goñi, M. Guzmán, P. Lovat, M. Jäättelä, A. Alonso, G. Velasco, Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization, *Autophagy* 12 (2016) 2213–2229.
- [33] J.M. Muñoz-Olaya, X. Matabosch, C. Bedia, M. Egido-Gabás, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, G. Fabriàs, Synthesis and biological activity of a novel inhibitor of dihydroceramide desaturase, *ChemMedChem* 3 (2008) 946–953.
- [34] B. Fazi, W. Bursch, G.M. Fimia, R. Nardacci, M. Piacentini, F. Di Sano, L. Piredda, Fenretinide induces autophagic cell death in caspase-defective breast cancer cells, *Autophagy* 4 (2008) 435–441.
- [35] W. Zheng, J. Kollmeyer, H. Symolon, A. Momin, E. Munter, E. Wang, S. Kelly, J.C. Allegood, Y. Liu, Q. Peng, H. Ramaraju, M.C. Sullards, M. Cabot, A.H. Merrill, Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy, *Biochim. Biophys. Acta* 1758 (2006) 1864–1884.
- [36] K.-O. Shin, N.-Y. Park, C.-H. Seo, S.-P. Hong, K.-W. Oh, J.-T. Hong, S.-K. Han, Y.-M. Lee, Inhibition of sphingolipid metabolism enhances resveratrol chemotherapy in human gastric cancer cells, *Biomol. Ther. (Seoul)* 20 (2012) 470–476.
- [37] P. Signorelli, J.M. Muñoz-Olaya, V. Gagliostro, J. Casas, R. Ghidoni, G. Fabriàs, Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells, *Cancer Lett.* 282 (2009) 238–243.
- [38] M. Shakibaei, K.B. Harikumar, B.B. Aggarwal, Resveratrol addiction: to die or not to die, *Mol. Nutr. Food Res.* 53 (2009) 115–128.
- [39] D. Delmas, E. Solary, N. Latruffe, Resveratrol, a phytochemical inducer of multiple cell death pathways: apoptosis, autophagy and mitotic catastrophe, *Curr. Med. Chem.* 18 (2011) 1100–1121.
- [40] S. Schiffmann, J. Sandner, R. Schmidt, K. Birod, I. Wobst, H. Schmidt, C. Angioni, G. Geisslinger, S. Grösch, The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis, *J. Lipid Res.* 50 (2009) 32–40.
- [41] K.B. Kang, C. Zhu, S.K. Yong, Q. Gao, M.C. Wong, Enhanced sensitivity of celecoxib in human glioblastoma cells: induction of DNA damage leading to p53-dependent G1 cell cycle arrest and autophagy, *Mol. Cancer* 8 (2009) 66.
- [42] M. Liu, C.-M. Li, Z.-F. Chen, R. Ji, Q.-H. Guo, Q. Li, H.-L. Zhang, Y.-N. Zhou, Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric cancer cells, *Int. J. Mol. Med.* 33 (2014) 1451–1458.
- [43] R. Mazzanti, F. Platini, C. Bottini, O. Fantappiè, M. Solazzo, L. Tessitore, Down-regulation of the HGF/MET autocrine loop induced by celecoxib and mediated by P-gp in MDR-positive human hepatocellular carcinoma cell line, *Biochem. Pharmacol.* 78 (2010) 31–32.
- [44] F. Cingolani, M. Casasampere, P. Sanllehi, J. Casas, J. Bujons, G. Fabrias, Inhibition of dihydroceramide desaturase activity by the sphingosine kinase inhibitor SKI II, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 1711–1720.
- [45] A. Gopalan, W. Yu, Q. Jiang, Y. Jang, B.G. Sanders, K. Kline, Involvement of de novo ceramide synthesis in gamma-tocopherol and gamma-tocotrienol-induced apoptosis in human breast cancer cells, *Mol. Nutr. Food Res.* 56 (2012) 1803–1811.
- [46] Q. Jiang, X. Rao, C.Y. Kim, H. Freiser, Q. Zhang, Z. Jiang, G. Li, Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide, *Int. J. Cancer* 130 (2012) 685–693.
- [47] R.F. Prietsch, L.G. Monte, F.A. da Silva, F.T. Beira, F.A.B. Del Pino, V.F. Campos, T. Collares, L.S. Pinto, R.M. Spanevello, G.D. Gamaro, E. Braganhol, Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes, *Mol. Cell. Biochem.* 390 (2014) 235–242.
- [48] R. Suzuki, Y. Kang, X. Li, D. Roife, R. Zhang, J.B. Fleming, Genistein potentiates the antitumor effect of 5-fluorouracil by inducing apoptosis and autophagy in human pancreatic cancer cells, *Anticancer Res.* 34 (2014) 4685–4692.
- [49] Y.F. Ordóñez, J. González, C. Bedia, J. Casas, J.L. Abad, A. Delgado, G. Fabrias, 3-Ketosphinganine provokes the accumulation of dihydrosphingolipids and induces autophagy in cancer cells, *Mol. Biosyst.* 12 (2016) 1166–1173.
- [50] V. Gagliostro, J. Casas, A. Caretti, J.L. Abad, L. Tagliavacca, R. Ghidoni, G. Fabrias, P. Signorelli, Dihydroceramide delays cell cycle G1/S transition via activation of ER stress and induction of autophagy, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 44 (2012) 2135–2143.

- [51] W. Jiang, B. Ogretmen, Ceramide stress in survival versus lethal autophagy paradox: ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy, *Autophagy* 9 (2013) 258–259.
- [52] R.D. Sentelle, C.E. Senkal, W. Jiang, S. Ponnusamy, S. Gencer, S.P. Selvam, V.K. Ramshesh, Y.K. Peterson, J.J. Lemasters, Z.M. Szulc, J. Bielawski, B. Ogretmen, Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy, *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 831–838.
- [53] S.B. Russo, R. Tidhar, A.H. Futerman, L.A. Cowart, Myristate-derived d16:0 sphingolipids constitute a cardiac sphingolipid pool with distinct synthetic routes and functional properties, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 13,397–13,409.
- [54] S.B. Russo, C.F. Baicu, A. Van Laer, T. Geng, H. Kasiganesan, M.R. Zile, L.A. Cowart, Ceramide synthase 5 mediates lipid-induced autophagy and hypertrophy in cardiomyocytes, *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 3919–3930.
- [55] N. Cruickshanks, J.L. Roberts, M.D. Bareford, M. Tavallai, A. Poklepovic, L. Booth, S. Spiegel, P. Dent, Differential regulation of autophagy and cell viability by ceramide species, *Cancer Biol. Ther.* 16 (2015) 733–742.
- [56] M. Yamane, K. Miyazawa, S. Moriya, A. Abe, S. Yamane, D,L-Threo-1-phenyl-2-decanoylamino-3-morpholino-1-propanol (DL-PDMP) increases endoplasmic reticulum stress, autophagy and apoptosis accompanying ceramide accumulation via ceramide synthase 5 protein expression in A549 cells, *Biochimie* 93 (2011) 1446–1459.
- [57] S.D. Spassieva, T.D. Mullen, D.M. Townsend, L.M. Obeid, Disruption of ceramide synthesis by CerS2 down-regulation leads to autophagy and the unfolded protein response, *Biochem. J.* 424 (2009) 273–283.
- [58] T. Walker, C. Mitchell, M.A. Park, A. Yacoub, M. Graf, M. Rahmani, P.J. Houghton, C. Voelkel-Johnson, S. Grant, P. Dent, Sorafenib and vorinostat kill colon cancer cells by CD95-dependent and -independent mechanisms, *Mol. Pharmacol.* 76 (2009) 342–355.
- [59] A. Caretti, A. Bragonzi, M. Facchini, I. De Fino, C. Riva, P. Gasco, C. Mucicanti, J. Casas, G. Fabriàs, R. Ghidoni, P. Signorelli, Anti-inflammatory action of lipid nanocarrier-delivered myriocin: therapeutic potential in cystic fibrosis, *Biochim. Biophys. Acta* 1840 (2014) 586–594.
- [60] M.W. Holliday, S.B. Cox, M.H. Kang, B.J. Maurer, C22:0- and C24:0-dihydroceramides confer mixed cytotoxicity in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines, *PLoS ONE* 8 (2013) e74768.
- [61] R.A. Gottlieb, A.M. Andres, J. Sin, D.P.J. Taylor, Untangling autophagy measurements: all fluxed up, *Circ. Res.* 116 (2015) 504–514.
- [62] C.K. Savile, G. Fabriàs, P.H. Buist, Dihydroceramide delta(4) desaturase initiates substrate oxidation at C-4, *J. Am. Chem. Soc.* 123 (2001) 4382–4385.
- [63] M.M. Siddique, Y. Li, L. Wang, J. Ching, M. Mal, O. Ilkayeva, Y.J. Wu, B.H. Bay, S.A. Summers, Ablation of dihydroceramide desaturase 1, a therapeutic target for the treatment of metabolic diseases, simultaneously stimulates anabolic and catabolic signaling, *Mol. Cell. Biol.* 33 (2013) 2353–2369.
- [64] C.M. Devlin, T. Lahm, W.C. Hubbard, M. Van Demark, K.C. Wang, X. Wu, A. Bielawska, L.M. Obeid, M. Ivan, I. Petrache, Dihydroceramide-based response to hypoxia, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 38,069–38,078.
- [65] J.M. Kravka, L. Li, Z.M. Szulc, J. Bielawski, B. Ogretmen, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, A. Bielawska, Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 16718–16728.
- [66] M.M. Siddique, B.T. Bikman, L. Wang, L. Ying, E. Reinhardt, G. Shui, M.R. Wenk, S.A. Summers, Ablation of dihydroceramide desaturase confers resistance to etoposide-induced apoptosis in vitro, *PLoS ONE* 7 (2012) e44042.
- [67] P. Breen, N. Joseph, K. Thompson, J.M. Kravka, T.I. Gudiz, L. Li, M. Rahmaniyan, J. Bielawski, J.S. Pierce, E. Van Buren, G. Bhatti, D. Separovik, Dihydroceramide desaturase knockdown impacts sphingolipids and apoptosis after photodamage in human head and neck squamous carcinoma cells, *Anticancer Res.* 33 (2013) 77–84.
- [68] J. Stiban, D. Fistere, M. Colombini, Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: implications on apoptosis, *Apoptosis* 11 (2006) 773–780.
- [69] R. Azzam, F. Hariri, N. El-Hachem, A. Kamar, G. Dbaibo, G. Nemer, F. Bitar, Regulation of de novo ceramide synthesis: the role of dihydroceramide desaturase and transcriptional factors NFATC and Hand2 in the hypoxic mouse heart, *DNA Cell Biol.* 32 (2013) 310–319.
- [70] G. Triola, G. Fabrias, M. Dragusin, L. Niederhausen, R. Broere, A. Llebaria, G. van Echten-Deckert, Specificity of the dihydroceramide desaturase inhibitor N-[(1R,2S)-2-hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(2-tridecyl-1-cyclopropenyl)ethyl]octanamide (GT11) in primary cultured cerebellar neurons, *Mol. Pharmacol.* 66 (2004) 1671–1678.
- [71] Y.-B. Zhang, W. Zhao, R.-X. Zeng, Autophagic degradation of caspase-8 protects U87MG cells against H₂O₂-induced oxidative stress, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14 (2013) 4095–4099.
- [72] S. Rodriguez-Cuenca, L. Whyte, R. Hagen, A. Vidal-Puig, M. Fuller, Stearoyl-CoA desaturase 1 is a key determinant of membrane lipid composition in 3T3-L1 adipocytes, *PLoS ONE* 11 (2016) e0162047.
- [73] X.-H. Zhang, B. Huang, S.-K. Choi, J.-S. Seo, Anti-obesity effect of resveratrol-amplified grape skin extracts on 3T3-L1 adipocytes differentiation, *Nutr. Res. Pract.* 6 (2012) 286–293.
- [74] E.S. Shin, H.H. Lee, S.Y. Cho, H.W. Park, S.J. Lee, T.R. Lee, Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells, *J. Nutr.* 137 (2007) 1127–1131.
- [75] F.-Y. Tang, C.-Y. Chen, H.-W. Shyu, S. Hong, H.-M. Chen, Y.-H. Chiou, K.-H. Lin, M.-C. Chou, L.-Y. Wang, Y.-F. Wang, Resveratrol induces cell death and inhibits human herpesvirus 8 replication in primary effusion lymphoma cells, *Chem. Biol. Interact.* 242 (2015) 372–379.
- [76] F. Lang, Z. Qin, F. Li, H. Zhang, Z. Fang, E. Hao, Apoptotic cell death induced by resveratrol is partially mediated by the autophagy pathway in human ovarian cancer cells, *PLoS ONE* 10 (2015) e0129196.
- [77] H. Miki, N. Uehara, A. Kimura, T. Sasaki, T. Yuri, K. Yoshizawa, A. Tsubura, Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells, *Int. J. Oncol.* 40 (2012) 1020–1028.
- [78] J.-S. Wang, F.-M. Ho, H.-C. Kang, W.-W. Lin, K.-C. Huang, Celecoxib induces heme oxygenase-1 expression in macrophages and vascular smooth muscle cells via ROS-dependent signaling pathway, *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 383 (2011) 159–168.
- [79] M. Gao, P.Y. Yeh, Y.-S. Lu, C.-H. Hsu, K.-F. Chen, W.-C. Lee, W.-C. Feng, C.-S. Chen, M.-L. Kuo, A.-L. Cheng, OSU-03012, a novel celecoxib derivative, induces reactive oxygen species-related autophagy in hepatocellular carcinoma, *Cancer Res.* 68 (2008) 9348–9357.
- [80] E. Lee, M.K. Choi, I.O. Han, S.J. Lim, Role of p21CIP1 as a determinant of SC-560 response in human HCT116 colon carcinoma cells, *Exp. Mol. Med.* 38 (2006) 325–331.
- [81] M. Kitada, D. Koya, Renal protective effects of resveratrol, *Oxidative Med. Cell. Longev.* 2013 (2013), 568093.
- [82] B. Turan, E. Tuncay, G. Vassort, Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies, *J. Bioenerg. Biomembr.* 44 (2012) 281–296.
- [83] N. Vitale, A. Kisslinger, S. Paladino, C. Procaccini, G. Matarese, G.M. Pierantoni, F.P. Mancini, D. Tramontano, Resveratrol couples apoptosis with autophagy in UVB-irradiated HaCaT cells, *PLoS ONE* 8 (2013), e80728.
- [84] H. Takano, Y. Momota, K. Kani, K. Aota, Y. Yamamura, T. Yamanoi, M. Azuma, γ -Tocotrienol prevents 5-FU-induced reactive oxygen species production in human oral keratinocytes through the stabilization of 5-FU-induced activation of Nrf2, *Int. J. Oncol.* 46 (2015) 1453–1460.
- [85] K. Nishio, M. Horie, Y. Akazawa, M. Shichiri, H. Iwahashi, Y. Hagihara, Y. Yoshida, E. Niki, Attenuation of lipopolysaccharide (LPS)-induced cytotoxicity by tocopherols and tocotrienols, *Redox Biol.* 1 (2013) 97–103.
- [86] D.G. Pons, M. Nadal-Serrano, M. Torrens-Mas, J. Oliver, P. Roca, The phytoestrogen genistein affects breast cancer cells treatment depending on the ER α /ER β ratio, *J. Cell. Biochem.* 117 (2016) 218–229.
- [87] A. Apraiz, J. Idkowiak-Baldys, N. Nieto-Rementería, M.D. Boyano, Y.A. Hannun, A. Asumendi, Dihydroceramide accumulation and reactive oxygen species are distinct and nonessential events in 4-HPR-mediated leukemia cell death, *Biochem. Cell Biol.* 90 (2012) 209–223.

SUPPLEMENTARY FIGURES

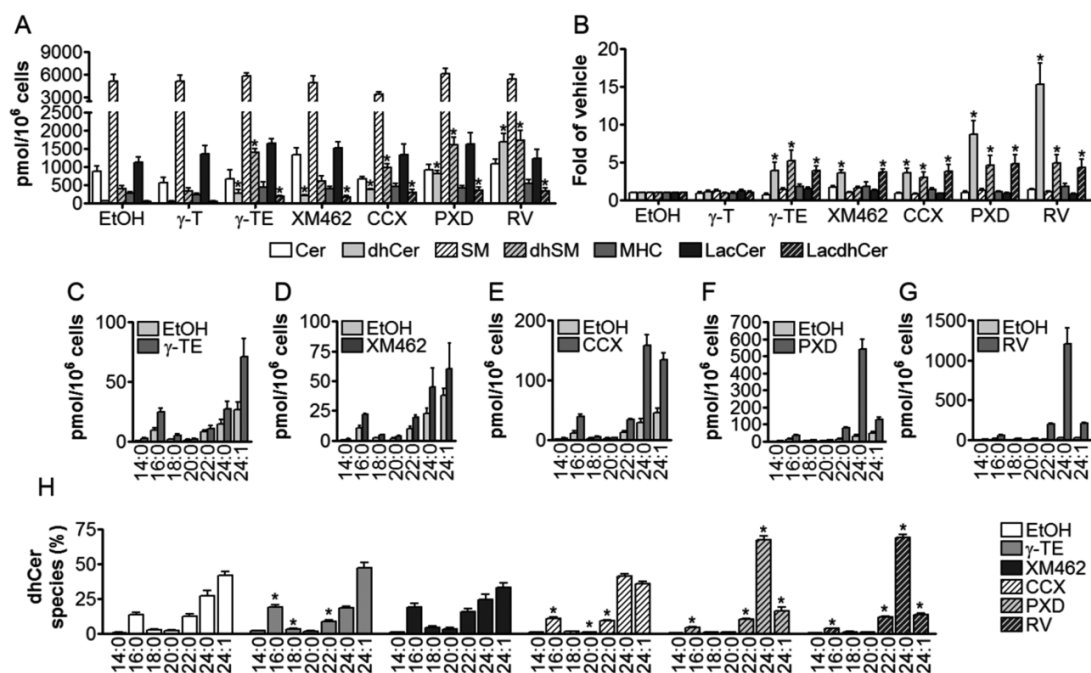


Figure S1. Effect of compounds on sphingolipid levels in T98G cells. Cells were incubated with the compounds at γ -T, 50 μ M; γ -TE, 35 μ M; XM462, 100 μ M; CCX, 50 μ M; RV, 100 μ M and PXD, 50 μ M for 24 h. Lipids analysis was carried out by LC/MS. **A.** Amounts of total sphingolipids. **B.** Increase of total sphingolipids over vehicle-treated controls. **C-G.** dhCer species. **H.** Percentage of dhCer species in differently treated cells. Data were obtained from 4 experiments with triplicates. In A, B, and H, data corresponding to each sphingolipid family were analyzed by one way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$ (*, $P < 0.05$ from vehicle-treated cells). In C-G, all dhCer species increased significantly over the respective vehicle controls (unpaired, two-tailed t test, $P < 0.01$).

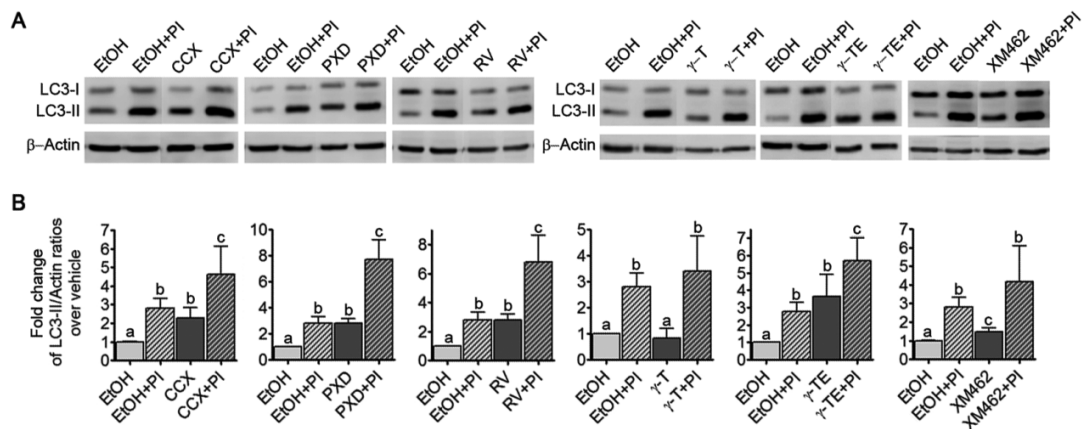


Figure S2. Effect of the test compounds on the autophagic flux in T98G cells. Cells were treated with CCX (50 μ M), PXD (50 μ M), RV (100 μ M), γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M) and XM462 (100 μ M) for 24 h with or without a preincubation of 2 h with protease inhibitors (PI) (E64D and Pepstatin A). **A.** Western blot images corresponding to one representative experiment. **B.** Histograms showing the relative fold-changes of LC3-II/Actin over control (EtOH). Data are the average \pm SD of five individual experiments and were analyzed by one way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each bar denote statistical significance ($P < 0.05$).

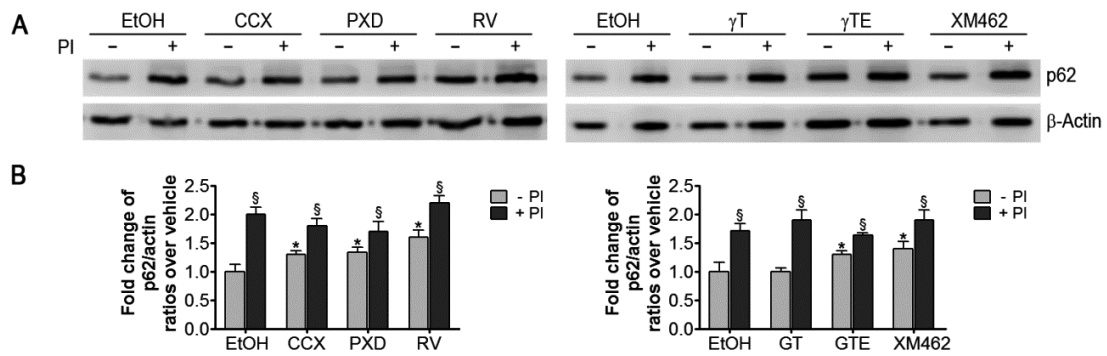


Figure S3. Effect of the test compounds on p62/SQSTM1 levels in U87MG cells. Cells were treated with CCX (50 μ M), PXD (50 μ M), RV (100 μ M), γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M) and XM462 (100 μ M) for 24 h with or without a preincubation of 2 h with protease inhibitors (PI) (E64D and Pepstatin A). **A.** Western blott images corresponding to representative experiments. **B.** Histograms showing the relative fold-changes of p62/actin over control (EtOH). Data are the average \pm SD of three individual experiments. Asterisks indicate statistically significant differences between treatments and vehicle (unpaired, two-tailed Student's *t* test. $P < 0.05$). Symbols § indicate statistically significant differences between treatment in the absence and presence of protease inhibitors (unpaired, two-tailed Student's *t* test. $P < 0.05$).

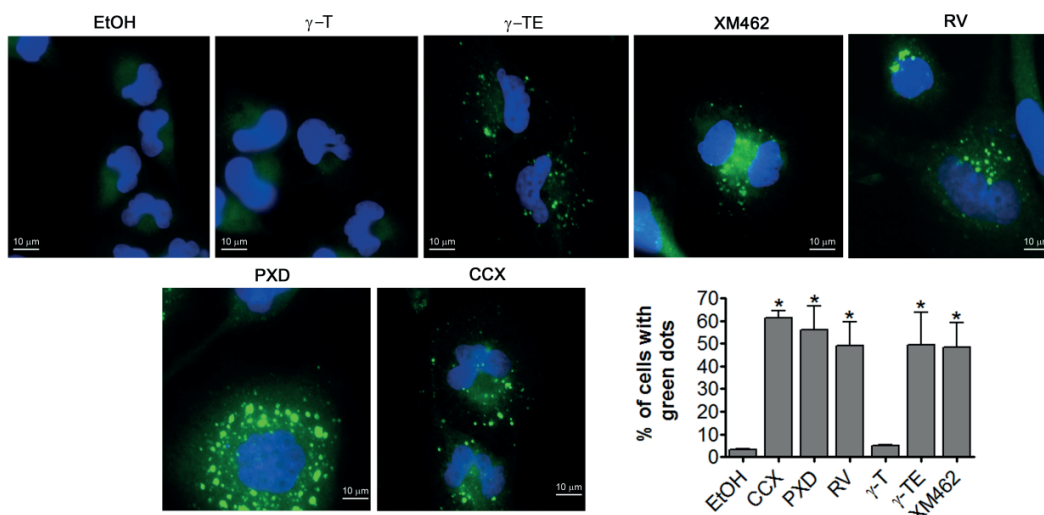


Figure S4. Autophagy induction by the test compounds in T98G cells. Representative images showing the formation of immunostained LC3 puncta after treatment with γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M), XM462 (100 μ M), RV (100 μ M), PXD (50 μ M) and CCX (50 μ M), for 24 h. Ethanol was used as control and XM462 (100 μ M) was used as a positive control. Magnification, $\times 60$. Scaled bar: 10 μ m. The percentage of cells with more than five defined cytosolic green dots is depicted in the histogram. Means are statistically different from vehicle at $*P \leq 0.01$, (one way ANOVA followed by Dunnett's Multiple Comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$). Analysis was performed by fluorescence microscopy.

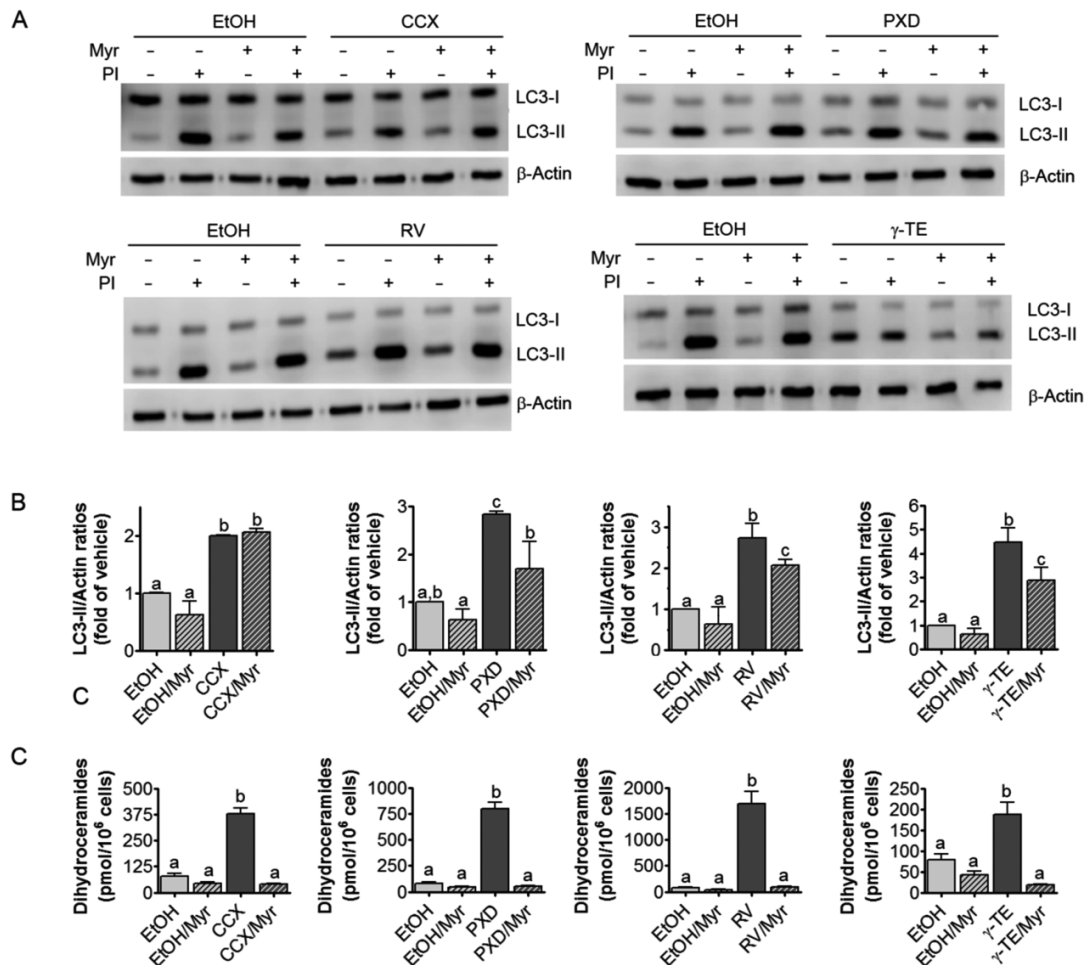


Figure S5. Effect of myriocin on the activity of the test compounds in T98G cells. Cells were treated with CCX (50 μ M), PXD (50 μ M), RV (100 μ M), γ -T (50 μ M), γ -TE (35 μ M) and XM462 (100 μ M) for 24 h after a 24 h preincubation with myriocin (Myr) (5 μ M) or vehicle and a subsequent 2 h treatment with PI or vehicle. Cells were then collected and processed for either Western blot (A,B) or lipid analysis (C). A, Western blot images corresponding to one representative experiment. B, Fold-changes of LC3-II/Actin ratios over control (EtOH). C, Amounts of total dhCer analyzed by LC/MS. Data are the average \pm SD of three experiments with triplicates. Statistical analysis was carried out by one way ANOVA following by Bonferroni's multiple comparison post-test if ANOVA $P < 0.05$. Different letters atop each denote statistical significance ($P < 0.05$).

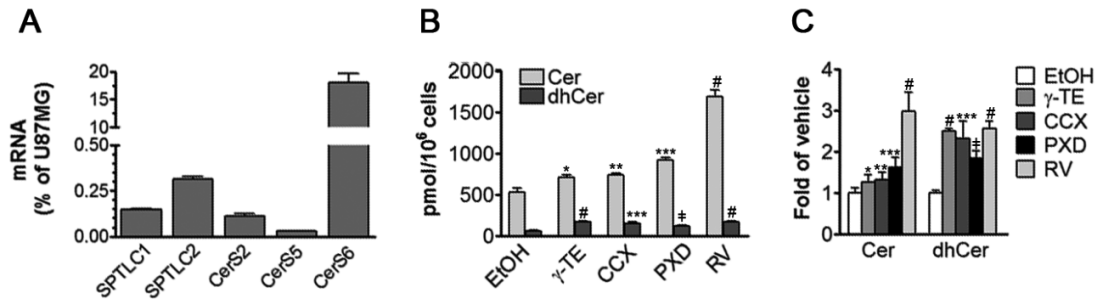


Figure S6. Defective *de novo* ceramide synthesis pathway in U87DND cells. **A.** Basal mRNA levels (as determined by qPCR) of SPTLC1, SPTLC2, CerS2, CerS5 and CerS6 in U87DND cells. Data correspond to the mean \pm SD of five independent experiments with duplicates. U87MG cells were used as reference controls to ensure that proper primers were used to amplify the target genes. **B.** Cer and dhCer levels in U87DND cells treated for 24 h with either ethanol or the compounds at: γ -TE, 28 μ M; CCX, 33 μ M; PXD, 1 μ M; RV, 18 μ M (these concentrations provoked less than 25% cell death). The increase of total Cer and dhCer over vehicle treated controls is given in **C**. Data correspond to the mean \pm SD of three independent experiments with triplicates. Statistically significant difference *vs* vehicle is given as: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; ***, $P < 0.005$; †, $P < 0.0005$; #, 0.00001 (unpaired, two-tailed *t* test).

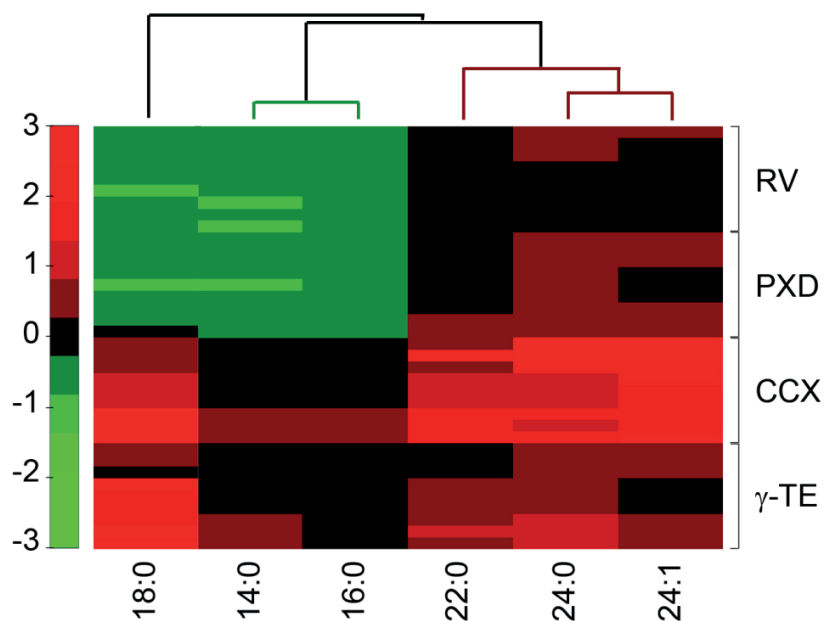


Figure S7. Hierarchical clustering heatmap of individual dhCer/Cer ratios in U87MG cells after different treatment. High and low dhCer/Cer ratios are marked with red or green, respectively, and unchanged ratios in black inside the heatmap, as indicated by the colour bar at the left of figure. dhCer/Cer species ratios are represented in the horizontal axis, and sample groups in the vertical axis. Clustering analysis (n=9 for each treatment) identified three main clusters corresponding to the dhCer/Cer ratios for C18 (cluster 1), C14 and C16 (cluster 2), and C22, C24:0 and C24:1 (cluster 3) *N*-acyl chains. RV and PXD had depleted clusters 1 and 2, while cluster 1 was enriched and cluster 2 was unchanged in CCX and γ -TE. CCX was enriched in cluster 3, which was unchanged in RV, PXD and γ -TE.

ARTICLE 5

Chemometric evaluation of glioma cell lipidoma in response to proautophagic compounds

Mireia Casasampere¹, Eva Gorrochategui², Romà Tauler², Gemma Fabrias¹ i Josefina Casas¹

¹Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC), Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), 08034 Barcelona, Spain

²Consell Superior d'Investigacions Científiques (CSIC), Institut de diagnosi ambiental i estudis de l'aigua (IDAEA), Departament de química ambiental, 08034 Barcelona, Spain

En preparació per a Journal of lipid research

Factor d'impacte: 4.56

La contribució de Mireia Casasampere a aquest treball presentat com a part del capítol 3 d'aquesta tesi, correspon al disseny d'experiments, i obtenció i elaboració de les dades resultants dels experiments realitzats. També ha contribuït a l'escriptura del primer esborrany.

Josefina Casas Brugulat
Directora de tesi

RESUM

Avaluació quimiomètrica del lipidoma de cèl·lules de glioma en resposta a compostos proautofàgics

Objectiu: La hipòtesi en la que es basa aquest treball és que els inhibidors de l'enzim Des1, també poden actuar sobre altres dessaturases del metabolisme lipídic. Així, a part del seu conegut efecte en l'acumulació de dhCer, podrien provocar alteracions d'altres espècies de lípids. L'objectiu d'aquest estudi va ser determinar l'efecte dels inhibidors de Des1 CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 en el lipidoma de la línia cel·lular de glioblastoma T98G, mitjançant l'anàlisi de MCR-ALS de perfils resolts.

Metodologia: Les cèl·lules T98G es van incubar amb el CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 a la concentració IC₂₅ o amb el control EtOH durant 24h. Passat aquest temps es va realitzar una extracció lipídica i es van analitzar les mostres per UPLC-TOF. La identificació de les espècies lipídiques es va realitzar gràcies a bases de dades pròpies o externes com LipidMaps. Es va emprar l'anàlisi MCR-ALS per resoldre grups de dades que coelueïen, i per a la identificació de possibles biomarcadors es van avaluar les àrees per PLS-DA i per l'anàlisi estadístic t de Student. Els canvis entre les espècies lipídiques es van avaluar visualment mitjançant la realització d'un HCA ("hierarchical cluster analyses").

Resultats: Es va observar un augment en els nivells de dihidroesfingolípid i/o una disminució dels esfingolípid insaturats, que confirma l'efecte inhibitori dels compostos estudiats sobre Des1. D'altra banda, també es va observar en els tractaments amb els compostos, un increment de la quantitat de fosfolípids, si bé amb una disminució relativa de fosfolípids que contenien grups acil poliinsaturats. Aquest comportament s'observa sobretot en les PC, els fosfolípids més abundants en les cèl·lules.

Conclusions: Els resultats obtinguts en l'anàlisi quimiomètric, a part de corroborar l'efecte del CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 sobre la Des1, suggereixen una inhibició de les dessaturases d'àcids grassos amb la conseqüent disminució relativa de lípids insaturats.

Chemometric evaluation of glioma cell lipidoma in response to proautophagic compounds

Mireia Casasampere¹, Eva Gorrochategui², Romà Tauler², Gemma Fabriàs¹, Josefina Casas¹

(1) Department of Biomedical Chemistry, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), Jordi Girona 18-26, Barcelona, 08034, Catalonia, Spain.

(2) Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Jordi Girona 18-26, Barcelona, 08034, Catalonia, Spain.

Abstract :

A chemometric analysis was carried out in the human glioblastoma T98G cells exposed to celecoxib (CCX), phenoxodiol (PXD), resveratrol (RV), γ -tocotrienol (GTE) and XM462 or with a EtOH control during 24 h. After that, there was a lipid extraction and samples were analyzed by ultra-high liquid chromatography coupled to time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-HRMS). Multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) untargeted analysis was used to solve coeluting groups of data. To identify the lipid species that varied significantly between treatments, the areas were evaluated by PLS-DA and a t Student's statistical analysis. We observed an increase in dihydroshingolipids levels confirming the inhibitory effect of the compounds studied on Des1. On the other hand, there was also an increase in the amount of phospholipids, although with a relative decrease of the polyunsaturated species. The results suggest that CCX, PXD, RV, GTE and XM462 apart from inhibit Des1, may inhibit the fatty acid desaturases.

Keywords : lipidomics, celecoxib, phenoxodiol, resveratrol, γ -tocotrienol, XM462, chemometrics

1. Introduction

Liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS) methods are highly used in omic procedures (*e.g.*, lipidomic studies) since they enable proper analysis of low molecular weight compounds in biological systems, such as complex lipid mixtures or biomolecules (1). The generated LC-MS data from each chromatogram are arranged in data sets containing information of mass-to-charge (m/z), retention times and intensities. Hence, massive amounts of information-rich MS data are obtained in the analysis of every sample, thus requiring specific tools for their analysis and interpretation. Among them, a chemometric tool named multivariate curve resolution-alternating least squares (MCR-ALS) (2), has shown to successfully resolve extensive LC-MS data sets with strongly co-eluted and hidden peaks in recent omic (*e.g.*, lipidomic) studies (3–7). In addition, other chemometric tools such as principal component analysis (PCA) and partial least squares-discriminant analysis (PLS-DA) can further explore sample classification/discrimination and allow biomarker discovery (8).

The hypothesis proposes that exposure to dihydroceramide desaturase 1 (Des1) inhibitors also influences the desaturation of other lipid species apart from the well-known effect on dihydroceramides (dhCer). The aim of this study was to elucidate the effect of some Des1 inhibitors such as celecoxib (CCX), phenoxodiol (PXD), resveratrol (RV), γ -tocotrienol (GTE) and XM462 in the lipidomic metabolism produced in T98G glioblastoma cell line, using MCR-ALS resolved profiles.

2. MATERIALS AND METHODS

LC-MS analysis

LC-HRMS analysis was performed using an Acquity ultra-high performance liquid chromatography (UHPLC) system (Waters, USA) connected to a Time of Flight (LCT Premier XE) Detector with an Acquity UHPLC BEH C₈ column (1.7 μ m particle size, 100 mm x 2.1 mm, Waters, Ireland) at a flow rate of 0.3 mL/min and column temperature of 30 °C. Full scan spectra from 50 to 1800 Da were acquired, and individual spectra were summed to produce data points each of 0.2 sec. Mass accuracy at a resolving power of 10,000 and reproducibility were maintained by using an independent reference spray *via* the LockSpray interference. The mobile phases were methanol with 2 mM ammonium formiate and 0.2% formic acid (A)/ water with 2 mM ammonium formiate and 0.2% formic acid (B). Phosphatidylcholine (PC), plasmalogen PC, lyso plasmalogen PC, phosphatidylethanolamine (PE), phosphatidylglycerol (PG), triacyl glycerol (TAG), sphingomyelin (SM), dihydrosphingomyelin (dhSM), dhCer, lactosylceramide (LacCer), lactosyldihydroceramide (LacdhCer) glucodihydroceramide (Glc dhCer) and sterol lipids (colic acid and cholesterol sulphate) were analysed under positive ESI.

Chemicals and reagents

Dulbecco's Modified Eagle Medium, fetal bovine serum, penicillin/streptomycin, Trypsin-EDTA, RV were purchased from Sigma Aldrich. CCX was purchased from Selleckchem. PXD was a kind gift of Marshall Edwards Pty Ltd. (New South Wales, Australia). GTE was

purchased from Cayman Chemical Company. XM462 (9) was synthesized in our laboratories. Internal standards for lipidomics were purchased from Avanti Polar Lipids.

Cell culture

Human glioblastoma cell line T98G was cultured at 37°C in 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 ng/mL each of penicillin and streptomycin.

Cell treatment and lipid extraction

Cells were seeded at 1×10^5 cells/mL into 6 well plates (1 mL/well) and allowed to adhere for 24 h in complete medium. Medium was replaced with fresh medium containing CCX (50 μM), PXD (50 μM), RV (100 μM), GTE (35 μM) and XM462 (100 μM) from stock solutions in ethanol at the specified concentrations or EtOH as control. After 24 h, medium was removed; cells were washed with 400 μL PBS and harvested with 400 μL Trypsin-EDTA and 600 μL of complete medium. Sphingolipid extracts, fortified with internal standard (C12-sphingosine, C12-glucosylsphingosine, C12-sphingosylphosphorylcholine and C17-sphinganine, 0.2 nmol each) were prepared and analysed by UHPLC-TOF-MS as previously explained. Six replicates were generated per group, except for CCX and GTE treatments, which contained three and four replicates, respectively. Thus, the current data set included a total of 31 samples, which were pairwise-analysed so that for each treatment the samples (stressed samples) were compared to the control (ethanol as vehicle control).

Peak assignment and identification of lipids

For the identification of the potential biomarkers (*i.e.*, components showing significant differences in control *vs* stressed samples), both a home-made database of lipids built previously (5) using the same chromatographic conditions, and also external databases available on-line such as LipidMaps (<http://www.lipidmaps.org>) were used. The assigned compound corresponded to the lipid molecule with the minimum mass error value (≤ 10 ppm) respect to the measured *m/z*, considering the possible adducts in positive ionization mode. The lipid annotated also had to fulfill an adequate retention time regarding its polarity. Glycerophospholipids, TAG and DAG species were annotated as <lipid subclass> <total fatty acyl chain length>:<total number of unsaturated bonds> and sphingolipids <total fatty acyl chain length>:<total number of unsaturated bonds in the acyl chain>.

Chemometric analysis of LC-HRMS data

For data analysis, first step was the conversion of the original UHPLC-HRMS chromatographic run recorded for every sample in a NetCDF file, which was further imported into MATLAB environment. Next, data were loaded into MATLAB workspace and converted to data matrices, with the retention times in the row dimension and the *m/z* values in the column dimension. While constructing these matrices, the size of the original data was simultaneously reduced using in-house written routines which search for the regions of interest (ROI) and construct compressed data matrices containing relevant LC-HRMS features (10), with no loss of

spectral mass accuracy. In a further step, five column-wise augmented data matrices containing information of two sample groups each were constructed. Then, the generated augmented matrices were analysed by MCR-ALS (2) in order to resolve co-eluted elution profiles and hidden peaks of the different sample constituents (lipids), together with their corresponding mass spectra. In these analyses, the relative areas of the resolved elution profiles for each of the components in the different sample groups (control and stressed) were also obtained. In order to explore potential biomarkers, the resolved areas of the MCR-ALS components were evaluated using two approaches. First, five PLS-DA models were performed, one for each MCR-ALS resolved augmented data matrix containing information of the areas of the resolved peaks. The determination of the components (*i.e.*, lipids) showing significant differences was possible by selecting those variables importance in projection (VIP) with a score value higher than one. The second approach was to statistically corroborate the previously found potential biomarkers, by using a two-sample Student's *t*-Test ($P < 0.05$). Changes in lipid areas among the distinct sample classes were visualized by performing five hierarchical cluster analyses (HCA) together with headmapping display (11), which also allowed examining lipid species showing similar behavior amongst chemical exposure.

Software for LC-MS data analysis

MATLAB 8.6.0 R2015a and R2015b (The MathWorks, Inc., Natick, MA, USA) were used as the development platforms for LC-MS data analysis and visualization. A graphical interface was used to apply MCR-ALS, which additionally provided detailed information about the implementation of this algorithm. Statistics ToolboxTM for MATLAB, PLS Toolbox 7.3.1 (Eigenvector Research Inc., Wenatchee, WA, USA), Bioinformatics ToolboxTM and other homemade routines (10) were used in this work. Waters/Micromass MassLynxTM V 4.1 software was used for data set conversion from raw into NetCDF format and as one of the formula identification platforms through its elemental composition tool.

3. RESULTS

First evaluation of control and stressed LC-MS lipid profiles

The UHPLC-TOF-MS chromatogram information allows us to classify the families of lipids by their retention time. According to a previous study carried out under the same LC and MS conditions, lipids corresponding to the families of lyso PC and lyso plasmalogen PC were the first to elute from the column. Later, the eluted lipids were PC, plasmalogen PC, PE, plasmalogen PE, PG, Cer, LacCer, dhCer, SM, dhSM, GlcdhCer, LacdhCer and DAG species. Finally, the last lipid species to leave the column were TAG. **Figure 1** is a representation of the generated data matrices in MATLAB environment corresponding to the LC-MS lipid profiles of a control sample (see **Figure 1A**) and five stressed samples belonging to the treatments with CCX, PXD, RV, GTE and XM462 (see **Figures 1B to 1F**). In a first approach, UHPLC-TOF-MS chromatograms of the distinct sample classes were compared. In broad terms, results suggest differences between control and treatments, especially in the central region of the chromatogram. However, there was a need to study in greater depth to draw clear conclusions.

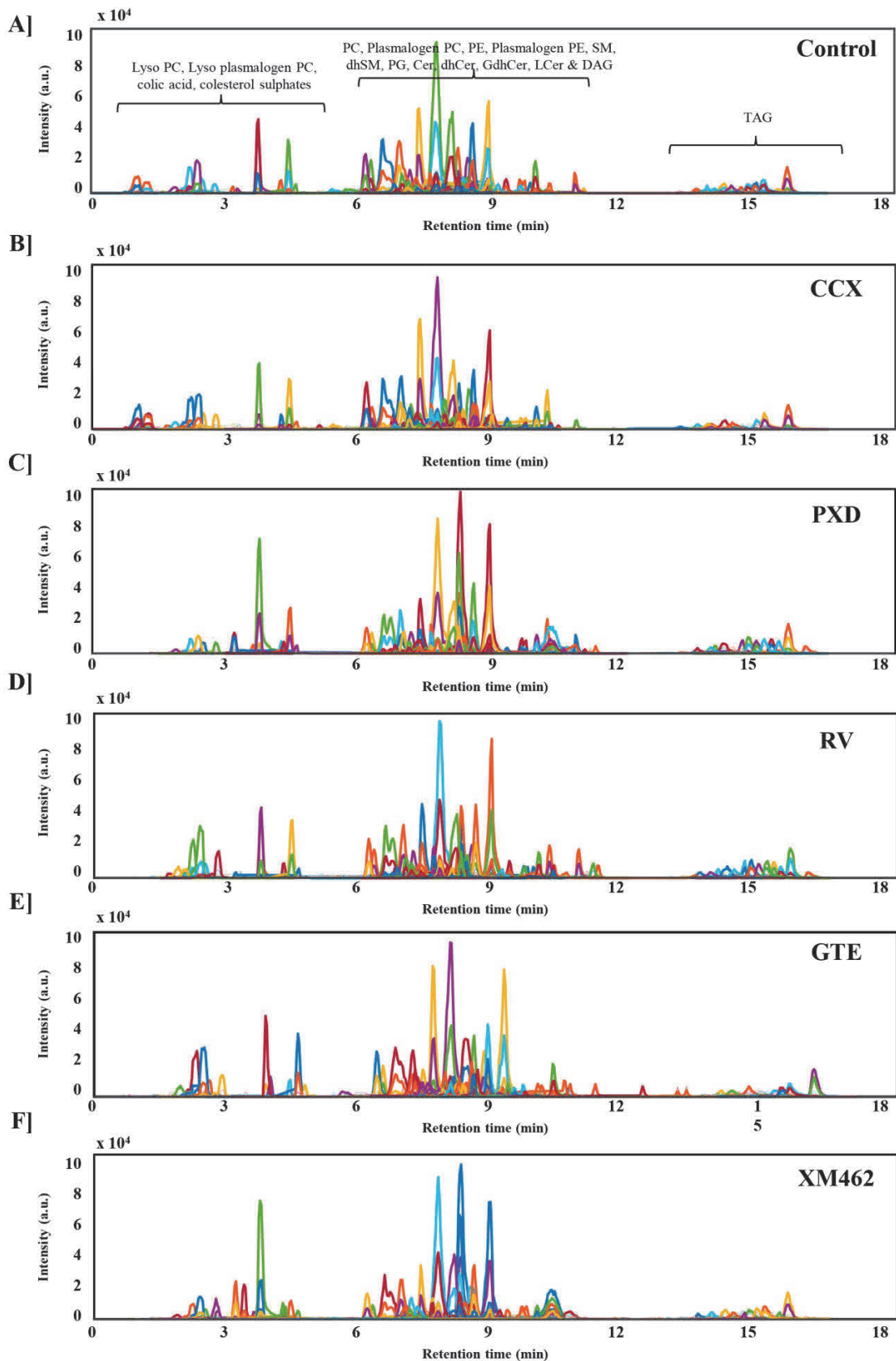


Figure 1. LC-MS profiles once imported into MATLAB environment and after ROI compression and data matrix construction of A) control sample, B) CCX-stressed sample, C) PXD-stressed sample, D) RV-stressed sample, E) GTE-stressed sample and F) XM462-stressed sample.

MCR-ALS results

From the matrices generated on the basis of UHPLC-TOF-MS chromatograms, new augmented matrices were generated containing information of two samples group each. Specifically, five augmented matrices were generated: controls and CCX, controls and PXD, controls and RV, control and GTE, and controls and XM462; arranging samples one at the top of the other (sample x elution time, m/z values) (see **figure S1**). MCR-ALS allows the resolution of multiple coeluted chromatographic peaks generated during LC-MS analysis of complex lipid samples such as a cell lysate. Moreover, it allows the evaluation of possible treatment effects in the lipidome of cells. For this reason the information extracted from the LC-MS data was analysed by MCR-ALS, in order to distinguish elution profiles in the same retention time and other minority peaks of each of the components (lipids) in samples, all together with their corresponding mass spectra. In the five MCR-ALS models performed on the five data sets (*i.e.*, controls and CCX, controls and PXD, controls and RV, controls and GTE and controls and XM462), 150, 120, 120, 100 and 95 components were respectively resolved, each one describing a pure elution and mass spectral profile, and a 98.7, 99.1, 99.0, 98.7 and 98.8% of the total variance was respectively explained (see **Figure S2**).

The elution profiles of the resolved MCR-ALS components in the distinct models were further examined to select those that described reliable chromatographic peak features and filter out the ones explaining background instrumental noise or solvent contribution. Thus, the number of relevant components of the distinct MCR-ALS models resulted in 105, 82, 80, 65 and 69 for the data sets of CCX, PXD, RV, GTE and XM462, respectively.

Identification of lipid species

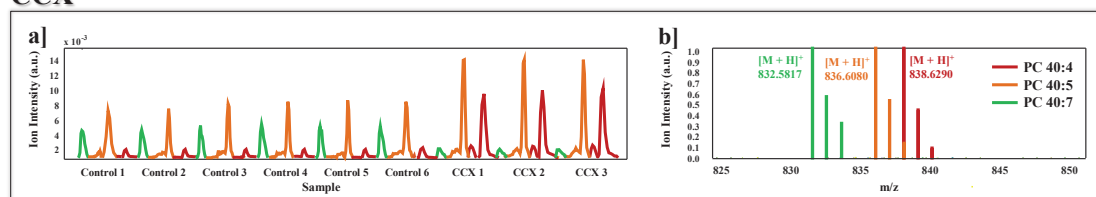
In order to identify the corresponding lipid species, the exact mass provided in the MCR-ALS spectra profiles was used. Using the information of exact mass contained in their spectra profiles, the lipid species were identified. Their relative areas were next used to evaluate their relative amounts in each sample. In this study, 21 PC, 9 plasmalogen PC, 2 lyso PC, 1 lyso plasmalogen PC, 2 PE, 3 plasmalogen PE, 2 PG, 9 TAG, 4 SM, 2 dhSM, 2 dhCer, 2 LacCer, 1 LacdhCer, 1 GldhCer lipid, colic acid and cholesterol sulfate species were identified (**Table S2**).

It is worth pointing out that it was possible to identify the metabolites of the compounds tested (see **Table S3**). In the samples incubated with GTE, two MCR-ALS components were found, the first describing GTE monomer and the other GTE dimer. In XM462-stressed samples, XM462 compound itself was detected and also other molecules resulting from its metabolism, such as the oxidation product (O-XM462) and its glycosylation form (GlcXM462). The other compounds tested (*i.e.* CCX, RV and PXD) were not detected since they are expected to elute in the first minute of the chromatogram and would appear in the chromatographic front (data not analysed).

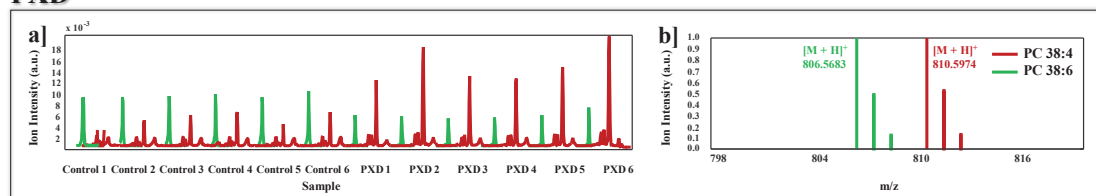
Comparison of MCR-ALS elution and spectra profiles among treatments

In order to draw significant conclusions of the effects caused by the treatments, a comprehensive study of the MCR-ALS results was performed. The elution profiles were compared against sample classes in order to elucidate the possible effects of the different cell treatments. As it can be observed, this is highly useful to evaluate the differences produced in the elution profiles of stressed samples respect to controls. Among the distinct MCR-ALS resolved components corresponding to reliable chromatographic peaks, there was a group of them which presented a significant behavior. **Figure 2** shows the elution (see **Figures 2A**) and spectra profiles (see **Figures 2B**) of some of these lipid species, in concrete distinct PC species.

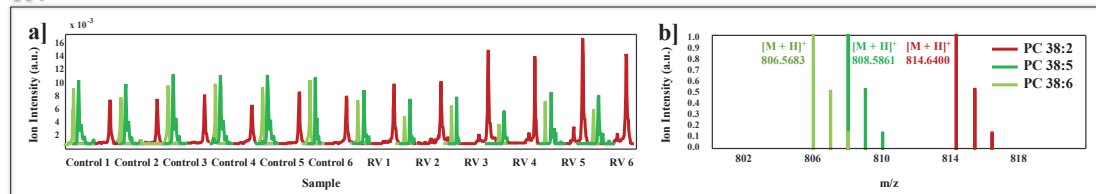
CCX



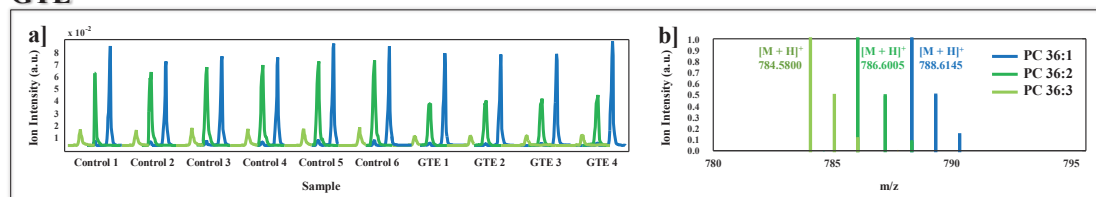
PXD



RV



GTE



XM

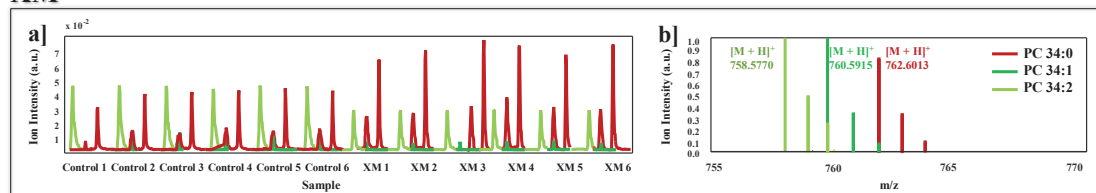


Figure 2. MCR-ALS elution (a) and spectra (b) profiles of some phosphatidylcholine lipid species presenting up-regulation (orange, red), down-regulation (light and dark green) or non-variance (blue) after exposure to CCX, PXD, RV, GTE and XM462. Numbers in the figure correspond to the distinct replicates.

As expected, the findings corroborate the initial hypothesis, since all treatments seemed to block the desaturation of the PC. Thus, treatments produced a decrease in the unsaturated species while an increase or no-change in saturated species in stressed-samples, compared to the control samples. Treatment with CCX, showed a noted increase in PC 40:4, a moderated increase in PC 40:5 and a clear reduction in PC 40:7. PXD also showed the same pattern, increasing the levels of PC 38:4 and decreasing PC 38:6. The same behaviour was observed with RV, in that case the amount of PC 38:2 increased whereas PC 38:5 and PC 38:6 species decreased. However, saturated species did not increase due to desaturation blockade after GTE treatment, since PC 36:1 levels did not vary after treatment, whereas lower levels of PC 36:2 and PC 36:3 were observed. Finally, with XM462 treatment, the amount of PC 34:0 specie raised, while lower levels of PC 34:1 and PC 34:2 were detected.

The effects of treatments were not only produced on PC species but also in other lipid families. As mentioned earlier, it is well known that CCX, PXD, RV, GTE and XM462 are inhibitors of the sphingolipid metabolism enzyme Des1. As expected, among the lipids altered by the treatments, sphingolipids were also modified. In concrete, it was observed an increase in levels of dihydrosphingolipids (*e.g.* dhCer) and/or a decrease of unsaturated sphingolipids (*e.g.* SM) which confirms their effect on Des1. In the case of TAG metabolism, it was differently affected by the treatments: an exposure to PXD and RV caused an increase in TAG species, both saturated and unsaturated, whereas the treatment with CCX and GTE caused a decrease in the amount of TAG species.

Statistical comparison of elution profiles

Effects of the distinct cell treatments were thoroughly studied by a statistical comparison of the calculated areas of the MCR-ALS resolved chromatographic peaks. Two distinct strategies were used to find components showing significant differences among treatments compared with control. PLS-DA is performed in order to sharpen the separation between groups of observations. Thus, if a sample is represented in the region of the space corresponding to a particular category, it is classified as belonging to that category. All treatments used the same approach of classification, considering two group classes: controls and treatments. Therefore, five PLS-DA analyses were applied, considering the same control and one different treatment each time. **Figure 3** shows the PLS-DA scores plot for the five data sets (one for each MCR-ALS resolved augmented data matrix). In all the cases, the controls are distinguished from the stressed samples. PLS-DA analysis was also performed for the purpose of obtaining the variables importance in projection (VIP) scores, which were used to reveal which lipids had a greatest influence on the discrimination between controls and treated samples. Following the general criteria for variable selection the threshold value was set on one. Consequently, the lipids selected as potential biomarkers were those that were associated with a VIP score greater than one (see **Figure S3**).

As a second approach, a two-sample Student's *t*-Test ($P < 0.05$) was performed to corroborate the biomarker selection by using PLS-DA approach. Finally, only those lipid

species showing significant alterations in both approaches (VIPs from PLS-DA and Student's *t*-Test) were proposed as potential biomarkers (see **Table S1**).

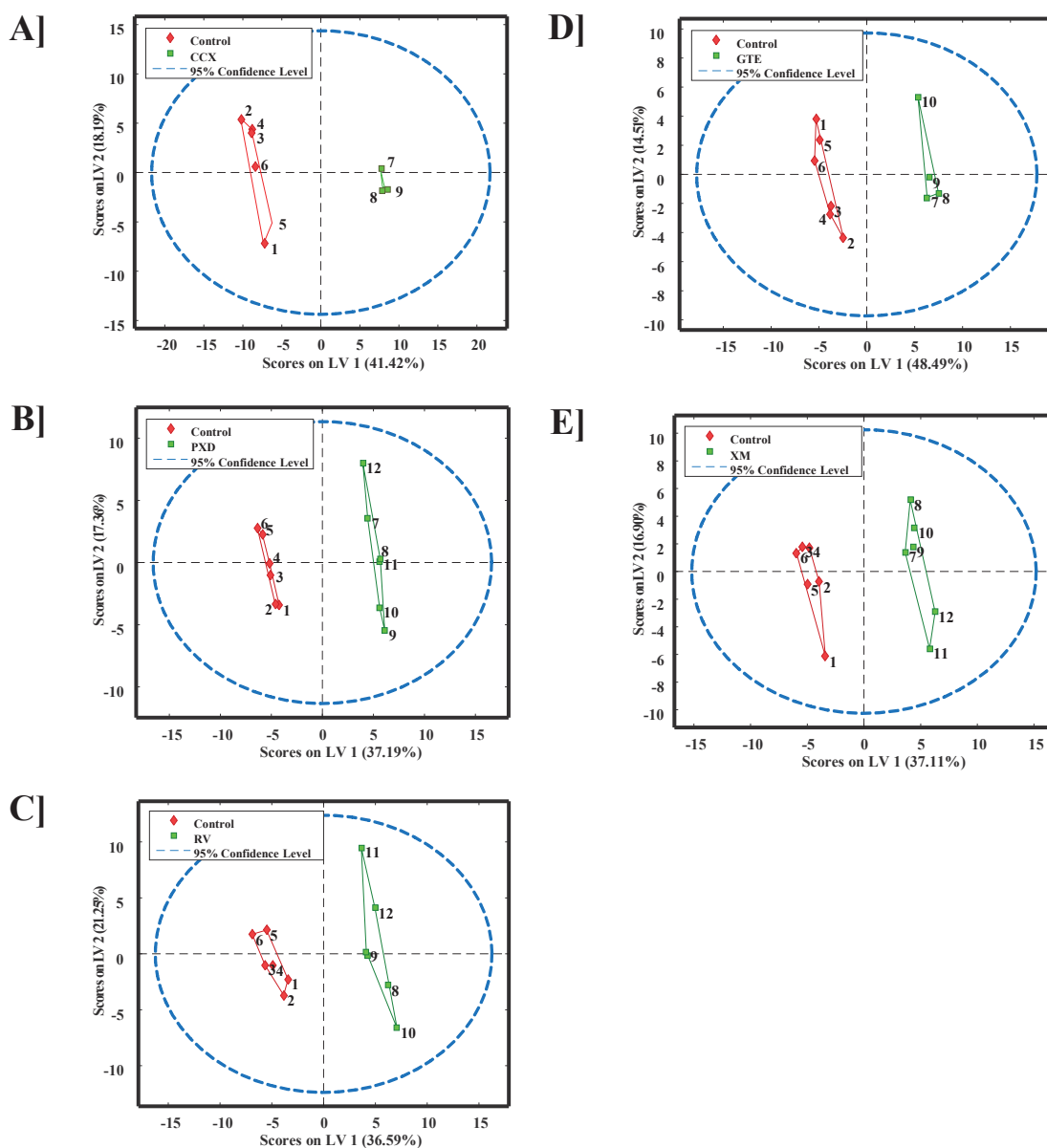


Figure 3. Scores of the five PLS-DA models performed with the MCR-ALS resolved areas of the augmented data matrices containing information of A) controls and CCX samples, B) controls and PXD samples, C) controls and RV samples, D) controls and GTE samples and E) controls and XM462 samples.

Hierarchical clustering heatmap of significant lipids among treatments

Once the biomarkers had been selected, through statistical analyses, results were evaluated using a hierarchical cluster analysis (HCA) and were represented in a heatmap (see **Figure 4**). This tool allows grouping lipid species that present similar behaviour and thereby provides a representation of lipid changes among the distinct sample treatments.

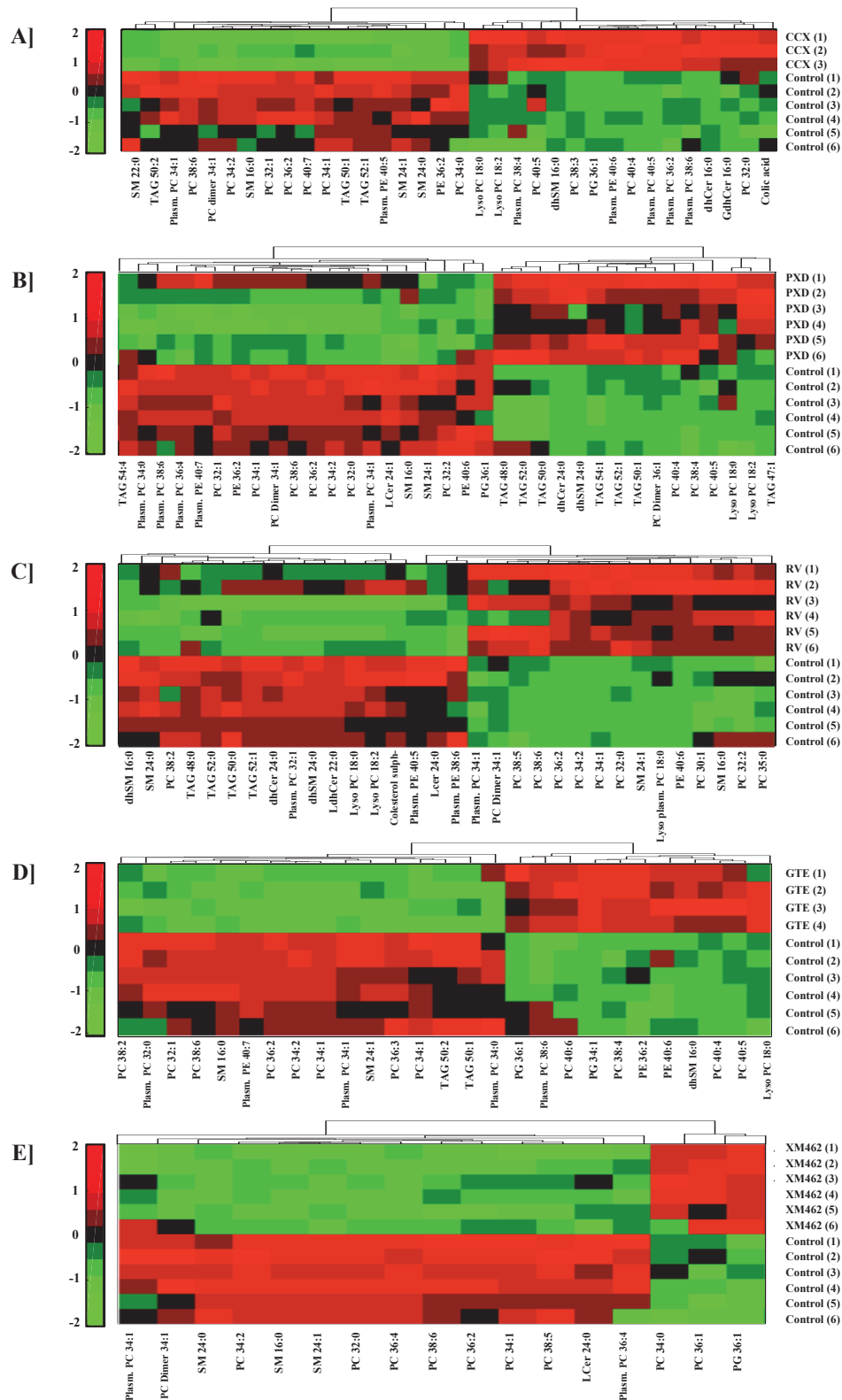


Figure 4. Hierarchical clustering heatmaps of the peak areas of the identified lipid species in T98MG cells (autoscaled data) exposed to A) CCX, B) PXD, C) RV, D) GTE and E) XM462. Degree of change in the stressed groups compared with the control group is marked with colours inside the heatmap indicating up-regulation (red) and down-regulation (green), as indicated by the colour bars. Identified lipids are represented in the horizontal axis, and sample groups in the vertical axis. (1 to 6: replicate number). Numbers in the figure correspond to the distinct replicates.

4. DISCUSSION

Application of MCR-ALS on the UHPLC-HRMS lipidomic data together with the assessment by PLS-DA and the statistical treatment of results, distinguish between the effects caused by each treatment compared with control samples. Thus, in this case the peak areas of the resolved elutions profiles showed distinct responses for the lipids of treated versus control cells, evidencing an effect on the cell lipidome attributed to the presence of the test compounds. The untargeted methodology used in this study allowed the objective interpretation of the lipidome, exclusively focusing the attention on lipids showing significant differences among control and treated cells.

Des1 is the last enzyme in the *de novo* biosynthesis pathway of Cer and catalyzes the insertion of a double bond in dhCer. The enzyme Des1 as other desaturases, to exert its catalytic action requires NAD(P)H as electron donor and an electron transport chain with oxygen as the final acceptor (12). This means that any change in the cellular redox status can modulate the activity Des1 (13). Several drugs and natural products have been exposed as Des1 inhibitors either acting directly on the enzyme or disrupting the electron transport chain essential for its desaturase activity. Although it has been described that the CCX (14), RV (15) and GTE (16) increased dhCer levels, its ability to inhibit Des1 had not been examined until recently for our group. In this study, we described CCX and RV along with PXD directly inhibited Des1 (17). Moreover, GTE inhibited the enzyme by altering *DEGSI* gene expression (17), which is the gene that encodes for Des1. XM462 is a synthetic compound specifically designed to inhibit the directly Des1 enzyme (9), based on the enzyme mechanism in desaturation activity.

The hypothesis in this study was Des1 enzyme inhibitors might also act on other desaturases of lipid metabolism. Thus, apart from its known effect on the accumulation of dhCer, could disturb other lipid species. The aim of this study was to determine the effect of Des1 inhibitors CCX, PXD, RV, GTE and XM462 on the glioblastoma cell line T98G lipidome, through the analysis of MCR-ALS resolved profiles.

As expected, among the lipids altered by the treatments, it was observed changes in sphingolipids. In particular, there was an increase in the levels of dihydrosphingolipids and/or a decrease in unsaturated sphingolipids, confirming the inhibitory effect of the compounds studied on Des1 (17). This effect was observed mainly in dhCer, but also in other more complex dihydrosphingolipids as dhSM, LacdhCer or GlcdhCer. Among these sphingolipids were only identified the most abundant species, specifically the C16, C22 and C24 *N*-acylated.

In the case of GTE and XM462 was also possible to identify the metabolites of the compounds themselves. As shown in Table S3, the metabolites identified for XM462 included the XM462 compound itself, the 1-glucosyl derivative (Glc-XM462), as well as the oxidation product (O-XM462). The identification of XM462 metabolites indicated that this compound is hydrolysed and metabolised to the 1-glucosyl and 1-oxy derivatives, as described (9). On the other hand in the samples treated with GTE, it was identified the monomer and the dimer of the compound. Specifically, most of the product was found as a dimer. Taking into account that XM462 and GTE were not present in control samples, they have been overlooked in the further

statistical analysis and they have not been considered as biomarkers. Regarding CCX, RV and PXD, it had not been possible their identification in the corresponding samples. Due to its polar nature, are eluted in the first minute of the chromatogram and would appear in the chromatographic front. That is why they had not been identified in the chemetric analysis.

In addition to changes in the cellular content of sphingolipids and the identification of some of the own compounds, it was observed in treatments with CCX, PXD, RV, GTE and XM462, an increase in the amount of phospholipids. Among the phospholipids species identified we found PC, plasmalogen PC, Lyso PC, lyso plasmalogen PC, PE, plasmalogen PE, PG, TAG and some sterols lipids. A large percentage of the lipids identified correspond to PC, it is because these lipids are found in abundance in eukaryotic cells and therefore are easily affected by an alteration of cell lipidome. It is important to note that the increased levels of phospholipids are not comparable between the different lipid species. There was observed a relative decrease of phospholipids containing polyunsaturated acyl groups. These results suggest an inhibition by tested compounds of some fatty acid desaturases.

In humans there are three fatty acid desaturases, $\Delta 9$ or stearoyl-CoA desaturase, $\Delta 6$ and $\Delta 52$ (18). The chemometric analysis suggests an inhibition of some fatty acid desaturases by CCX, PXD, RV, GTE and XM462. Supporting this hypothesis, it is known that RV (19) and genistein (20) (PXD natural analogue) inhibit the stearoyl-CoA desaturase gene expression. The fatty acid desaturases, such as Des1, depend on the electron transport chain and are modulated by cellular redox state (21). Therefore these enzymes are susceptible to the inhibition by the compounds studied. Thus the results suggest that CCX, PXD, RV, GTE and XM462 might change the redox cell state and hence downregulate desaturase activity, which requires NAD(P)H oxidation and oxygen reduction.

Autophagy is a catabolic pathway involving the lysosomal degradation of proteins and organelles to maintain the cellular homeostasis and obtain nutrients and energy under starvation or hypoxia conditions (22, 23). CCX (24), RV (15) and GTE (16) have been described as autophagy inducers in several cell models. In a recent work of our group, we provide further evidence that dhCer participate in the induction of the autophagic flux by CCX, PXD, RV, GTE and XM462 in the human glioblastoma cell line T98G (17). The identification of autophagy biomarkers among the lipids species has not been investigated deeply in this work. However, the fact that all compounds induce autophagy and the existence of changes in lipid species common in some samples, suggests the possibility that some of these disturbed lipid species could be in fact autophagy biomarkers.

In summary we used a chemometric method to identify significantly altered lipids of T98G cells treated with CCX, PXD, RV, GTE and XM462. The results, in addition to confirm the effect of the test compounds on Des1, suggest an inhibition of the fatty acid desaturases by the test compounds with the corresponding relative decrease of unsaturated lipids.

GRANT SUPPORT

The research leading to these results has received funding from the European Research Council under the European Union's Seventh Framework Programme (FP/2007-2013)/ERC Grant Agreement no. 320737. One of the authors (Eva Gorrochategui), acknowledges the Spanish Government (Ministerio de Educación, Cultura y Deporte) for a predoctoral FPU scholarship (FPU13/04384).

REFERENCES

1. Wilson, I. D., R. Plumb, J. Granger, H. Major, R. Williams, and E. M. Lenz. 2005. HPLC-MS-based methods for the study of metabonomics. *J. Chromatogr. B. Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* **817**: 67–76.
2. Tauler, R.. 1995. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom. Intell. Lab. Syst.* **30**: 133–146.
3. Bedia, C., N. Dalmau, J. Jaumot, and R. Tauler. 2015. Phenotypic malignant changes and untargeted lipidomic analysis of long-term exposed prostate cancer cells to endocrine disruptors. *Environ. Res.* **140**: 18–31.
4. Farrés, M., B. Piña, and R. Tauler. 2014. Chemometric evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* metabolic profiles using LC-MS. *Metabolomics.* **11**: 210–224.
5. Gorrochategui, E., J. Casas, E. Pérez-Albaladejo, O. Jáuregui, C. Porte, and S. Lacorte. 2014. Characterization of complex lipid mixtures in contaminant exposed JEG-3 cells using liquid chromatography and high-resolution mass spectrometry. *Environ. Sci. Pollut. Res. Int.* **21**: 11907–16.
6. Navarro-Reig, M., J. Jaumot, A. García-Reiriz, and R. Tauler. 2015. Evaluation of changes induced in rice metabolome by Cd and Cu exposure using LC-MS with XCMS and MCR-ALS data analysis strategies. *Anal. Bioanal. Chem.* **407**: 8835–47.
7. Ortiz-Villanueva, E., J. Jaumot, F. Benavente, B. Piña, V. Sanz-Nebot, and R. Tauler. 2015. Combination of CE-MS and advanced chemometric methods for high-throughput metabolic profiling. *Electrophoresis.* **36**: 2324–2335.
8. L. Yi, N. Dong, Y. Yun, B. Deng, D. Ren, S. Liu, Y. L.. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Anal. Chim. Acta.* **In press**.
9. Munoz-Olaya, J. M., X. Matabosch, C. Bedia, M. Egado-Gabás, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, and G. Fabriàs. 2008. Synthesis and biological activity of a novel inhibitor of dihydroceramide desaturase. *Chem. Med. Chem.* **3**: 946–953.
10. Gorrochategui, E., J. Jaumot, and R. Tauler. 2015. A protocol for LC-MS metabolomic data processing using chemometric tools. *Protoc. Exch.*
11. Schonlau, M.. 2004. Visualizing non-hierarchical and hierarchical cluster analyses with clustergrams. *Comput. Stat.* **19**: 95–111.
12. Geeraert L., G.P. Mannaerts and P.P. van Veldhoven. 1997. Conversion of dihydroceramide into ceramide involvement of a desaturase. *Biochem. J.* **327**: 125–32.
13. Idkowiak-Baldys J., A. Apraiz, L. Li, M. Rahmaniyan, C.J. Clarke, J.M. Kravka, A. Asumendi, Y.A. Hannun. 2010. Dihydroceramide desaturase activity is modulated by oxidative stress. *Biochem. J.* **427**: 265–74.

14. Schiffmann S., J. Sandner, R. Schmidt, K. Birod, I. Wobst, H. Schmidt, C. Angioni, G. Geisslinger, S. Grösch. 2009. The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis. *J. Lipid. Res.* **50**: 32–40.
15. Signorelli P., J.M. Munoz-Olaya, V. Gagliostro, J. Casas, R. Ghidoni, G. Fabriàs. 2009. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer. Lett.* **282**: 238–43.
16. Jiang Q., X. Rao, C.Y. Kim, H. Freiser, Q. Zhang, Z. Jiang, G. Li. 2012. Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide. *Int. J. Cancer.* **130**: 685–93.
17. Casasampere M., Y.F. Ordoñez, J. Casas, G. Fabrias. 2017. Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta.* **1861**: 264-75.
18. Nakamura M.T., T.Y. Nara. 2004. Structure, Function and Dietary Regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ Desaturases. *Annu. Rev. Nutr.* **24**: 345–76.
19. Zhang X.H., B. Huang, S.K. Choi, J.S. Seo. 2012. Anti-obesity effect of resveratrol-amplified grape skin extracts on 3T3-L1 adipocytes differentiation. *Nutr. Res. Pract.* **6**: 286–93.
20. Shin E.S., H.H Lee, S.Y Cho, H.W Park, S.J. Lee, T.R. Lee. 2007. Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *J. Nutr.* **137**: 1127–31.
21. Fabrias G., J. Muñoz-Olaya, F. Cingolani, P. Signorelli, J. Casas, V. Gagliostro, R. Ghidoni. 2012. Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: Debutant players in the sphingolipid arena. *Prog. Lipid. Res.* **51**: 82–94.
22. Ryter S.W., S.M. Cloonan, A.M.K. Choi. 2013. Autophagy: a critical regulator of cellular metabolism and homeostasis. *Mol. Cell.* **36**: 7-16
23. Rohwer N., T. Cramer. 2011. Hypoxia-mediated drug resistance: novel insights on the functional interaction of HIFs and cell death pathways. *Drug. Resist.* **14**: 191-201
24. Huang S., F.A. Sinicrope. 2010. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. *Autophagy* **6**: 256–69.

Supplementary Material

Chemometric evaluation of glioma cell lipidoma in response to proautophagic compounds

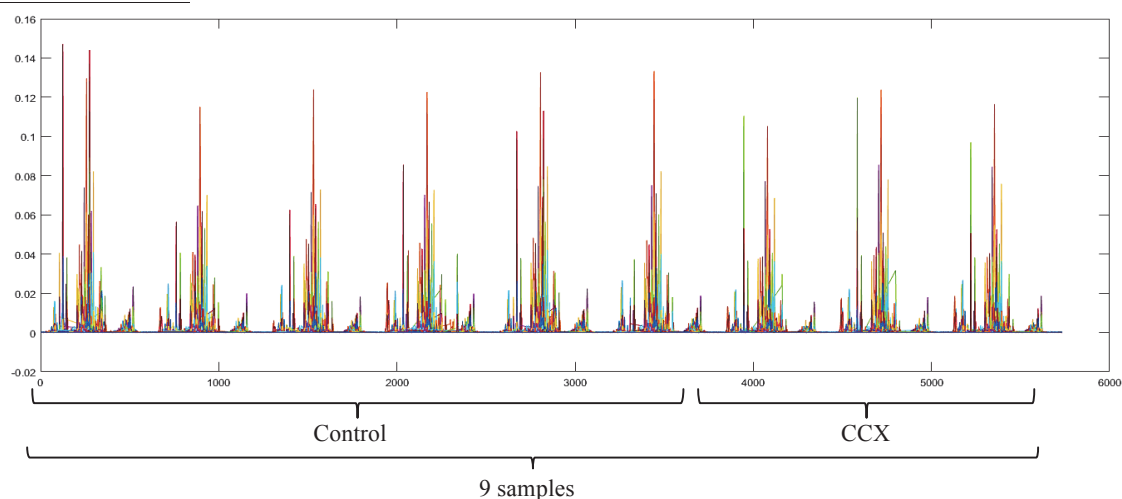
Mireia Casasampere¹, Eva Gorrochategui², Romà Tauler², Gemma Fabriàs¹, Josefina Casas¹

(1) Department of Biomedical Chemistry, Institute of Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC), Jordi Girona 18-26, Barcelona, 08034, Catalonia, Spain.

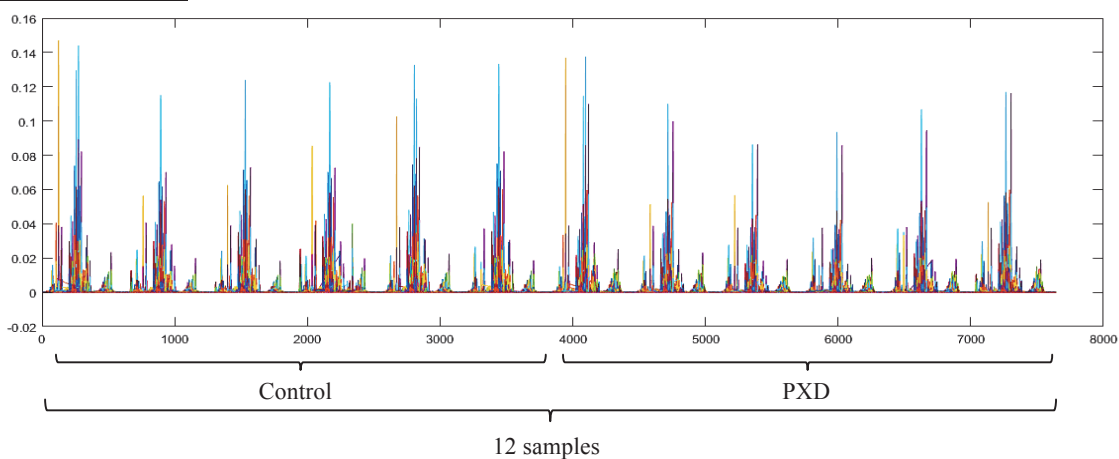
(2) Department of Environmental Chemistry, Institute of Environmental Assessment and Water Research (IDAEA), Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Jordi Girona 18-26, Barcelona, 08034, Catalonia, Spain.

Figure S1. Augmented LC-MS data matrices of control, CCX-exposed, PXD-exposed, RV-exposed, GTE-exposed and XM462-exposed cells.

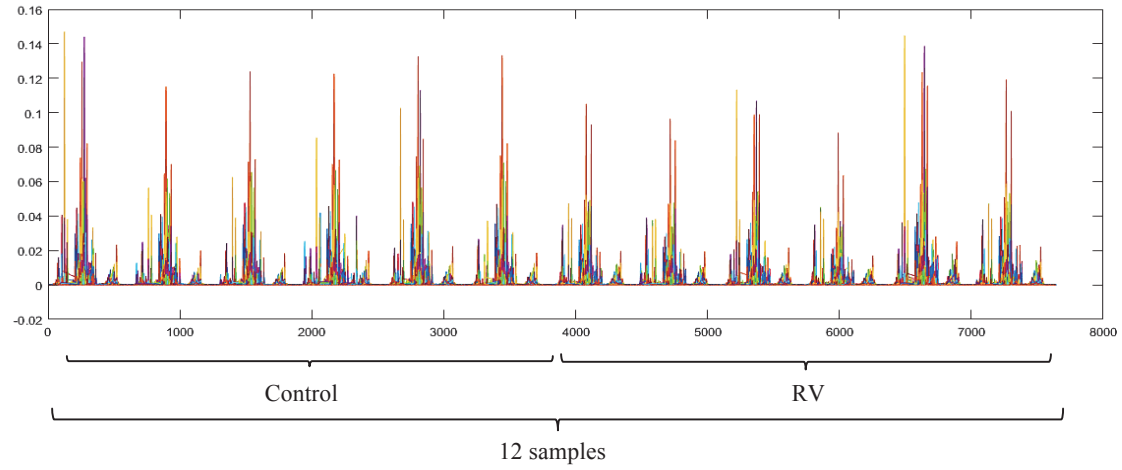
Control and CCX:



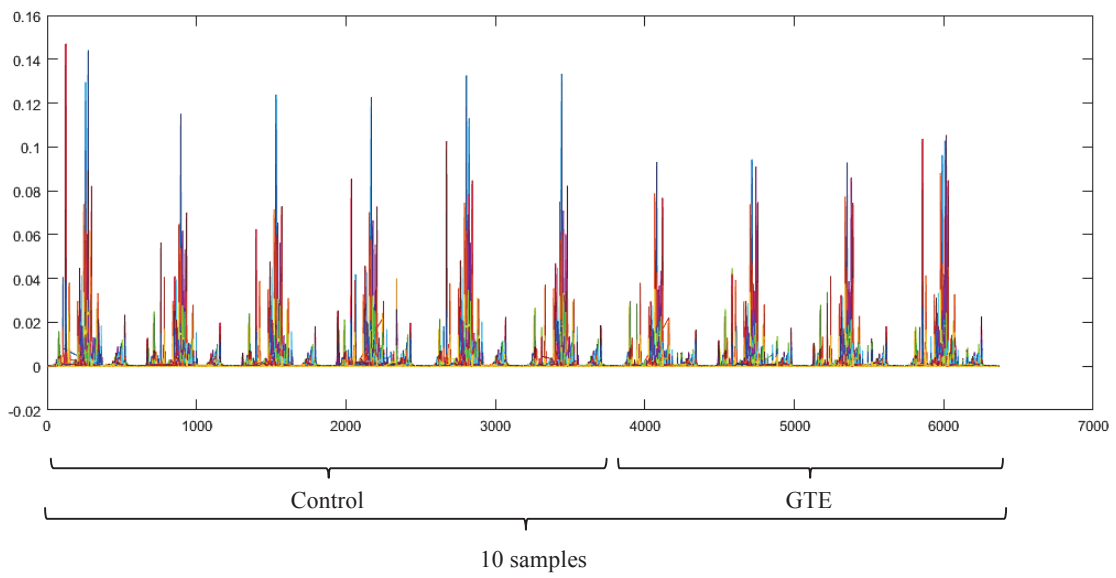
Control and PXD:



Control and RV:



Control and GTE:



Control and XM462:

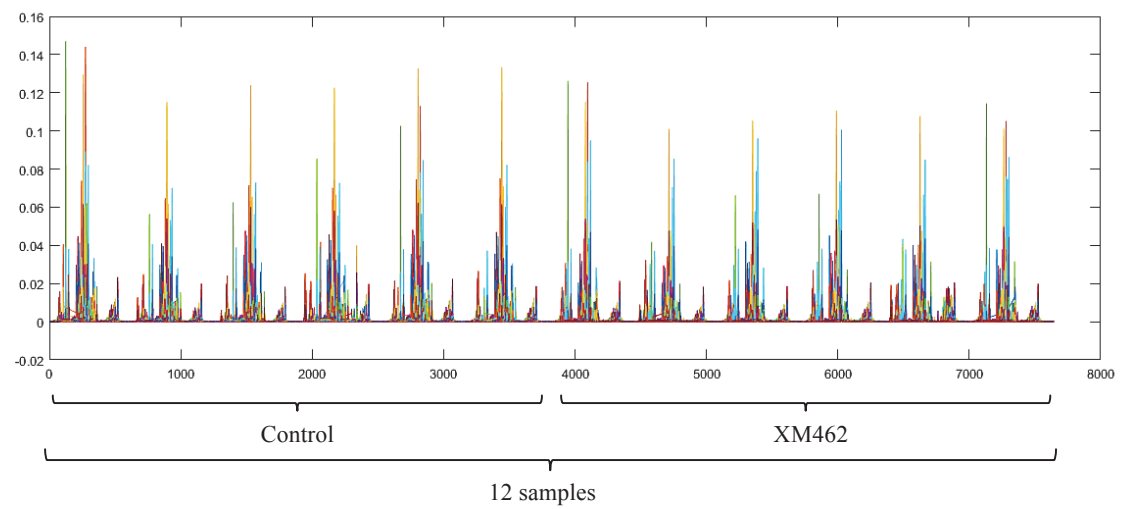
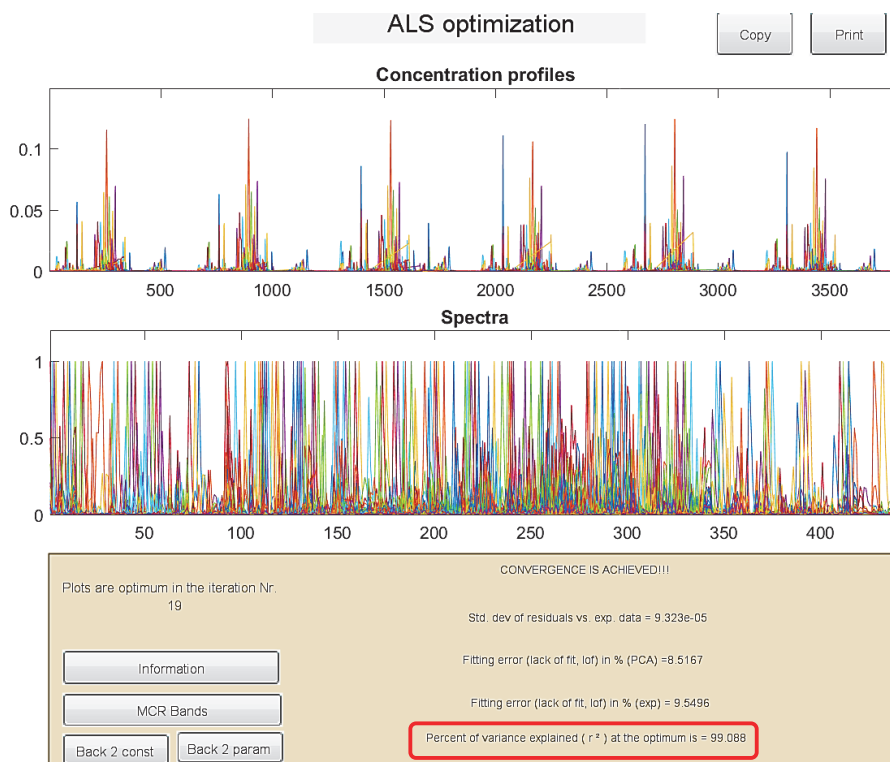
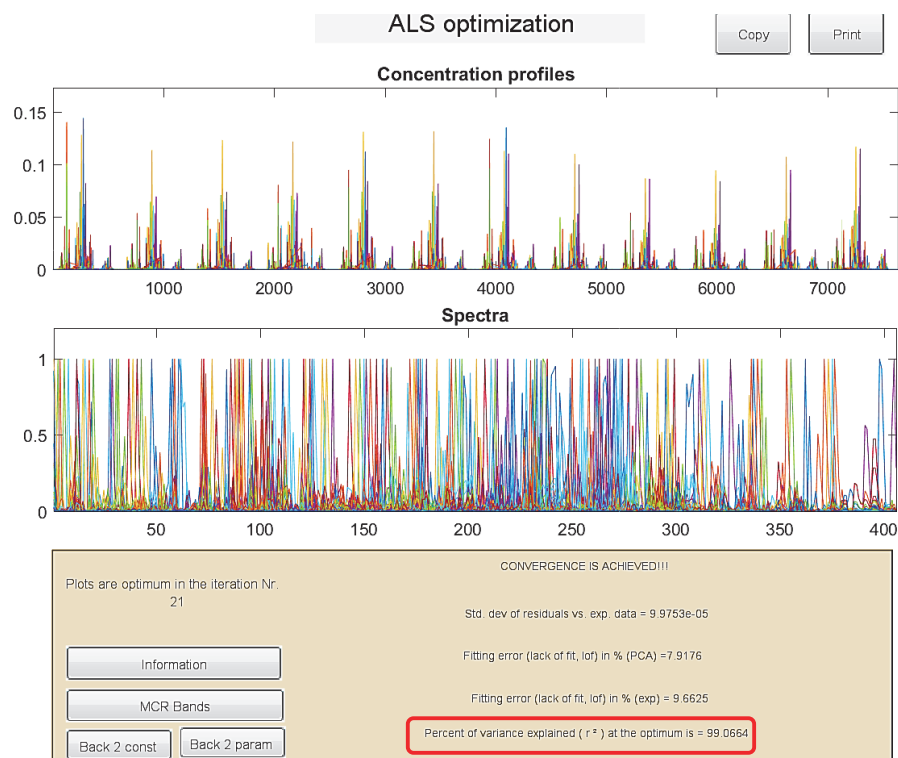


Figure S2. Output of the 5 MCR-ALS analyses showing purest elution and mass spectra profiles.

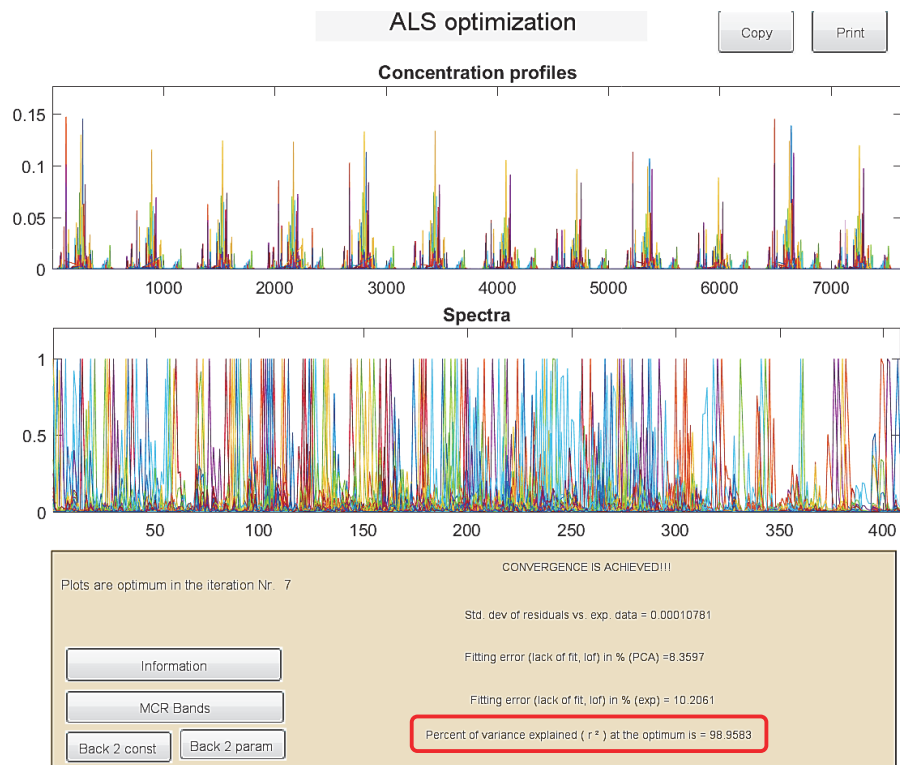
Control and CCX: Using **150 components**. 98.6933% of variance explained.



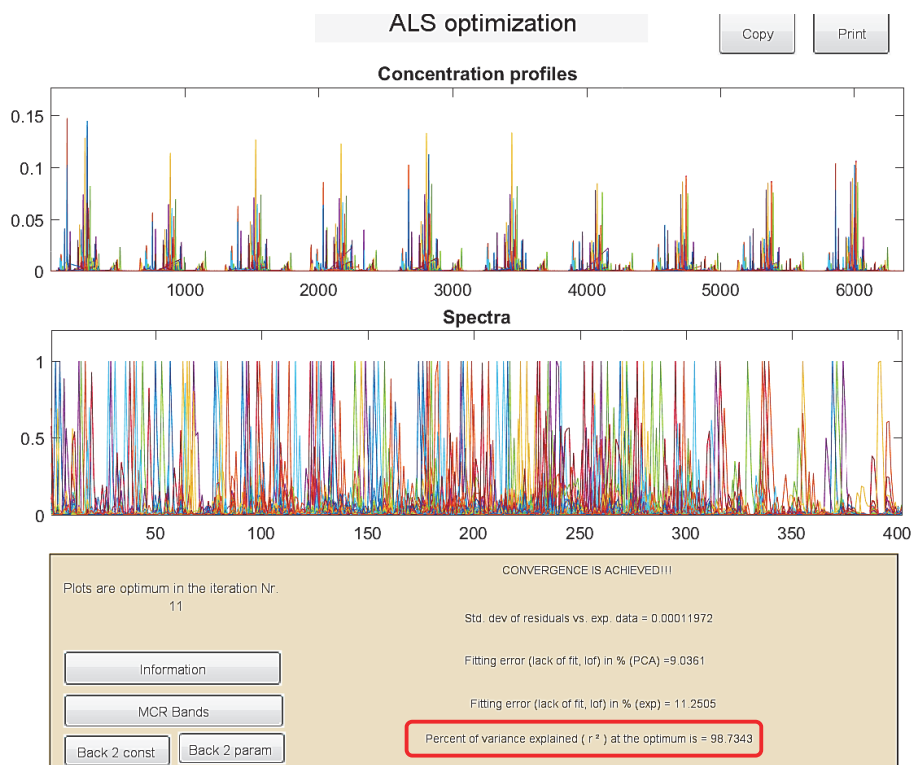
Control and PXD: Using **120 components**. 99.0664% of variance explained.



Control and RV: Using **120 components**. 98.9583% of variance explained.



Control and GTE: Using **100 components**. 98.7343% of variance explained.



Control and XM462: Using **95 components**. 98.8064% of variance explained.

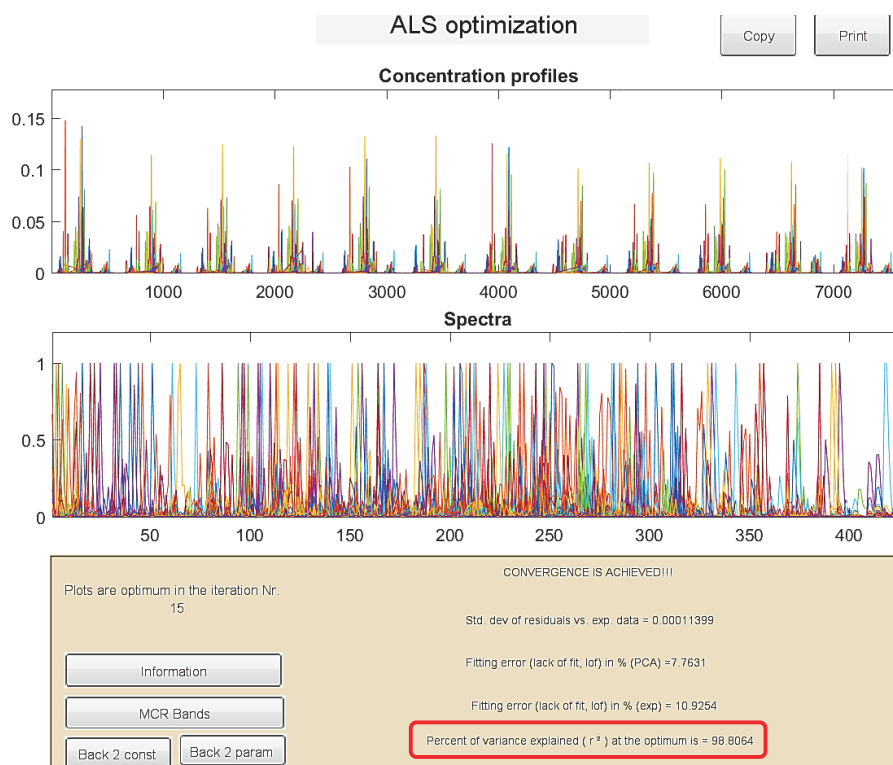
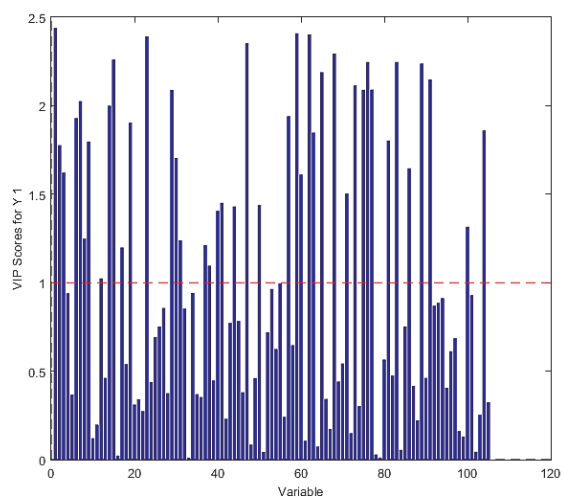
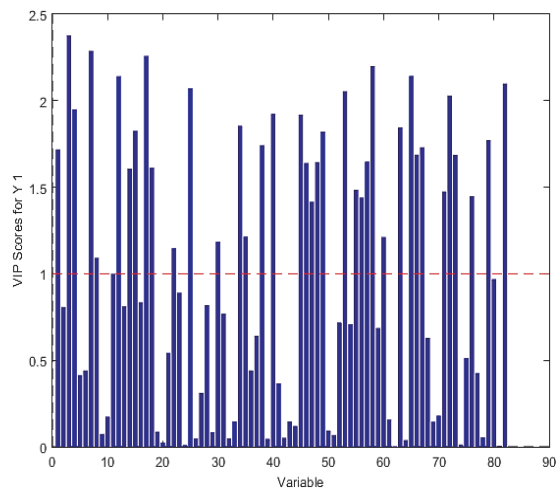


Figure S3. Variables importance in projection (VIP scores) obtained from five PLS-DA models (see Figure 3 in the manuscript). Horizontal red line in VIP plots indicate a threshold value of 1.

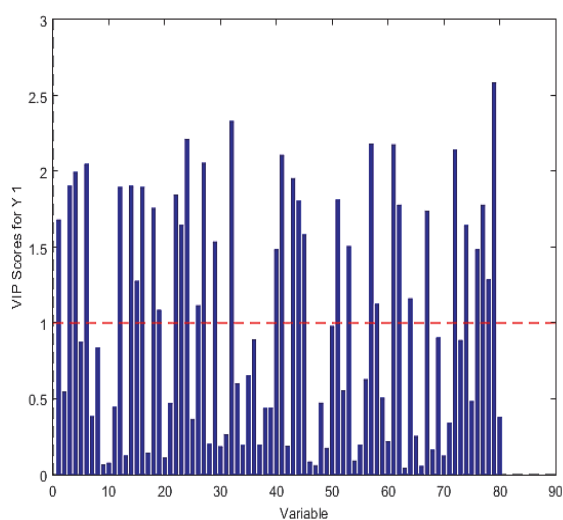
Control and CCX:



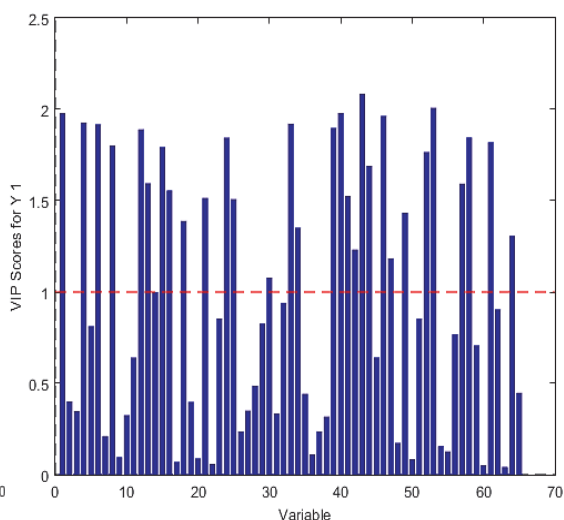
Control and PXD:



Control and RV:



Control and GTE:



Control and XM462:

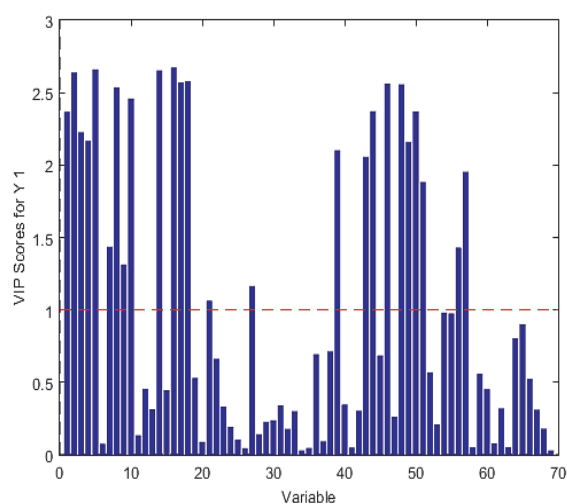


Table S1. Potential biomarkers for lipid disruption in T98G cells exposed to CCX, PXD, RV, GTE and XM462. Lipid species in stressed samples showing significant down- or up- regulation respect to controls were determined by PLS-DA analyses ($VIP > 1$) and further two-sample Student's t -Test ($P < 0.05$).

Lipid specie	Lipid classification	Fold change	p -values	Up (+) or down (-) regulation
CCX				
PC 32:0	Glycerophospholipid	1.15	0.00832	+
PC 32:1	Glycerophospholipid	1.24	0.00311	-
PC 34:0	Glycerophospholipid	1.28	0.00318	-
PC 34:1	Glycerophospholipid	1.16	0.00349	-
PC 34:2	Glycerophospholipid	1.32	0.00065	-
PC 36:2	Glycerophospholipid	1.26	0.00139	-
PC 38:3	Glycerophospholipid	2.16	0.00002	+
PC 38:6	Glycerophospholipid	1.30	0.01540	-
PC 40:4	Glycerophospholipid	4.93	0.000003	+
PC 40:5	Glycerophospholipid	1.47	0.01700	+
PC 40:7	Glycerophospholipid	1.94	0.00035	-
Dimer of PC 34:1	Glycerophospholipid	1.57	0.00235	-

Plasmalogen PC 34:1	Glycerophospholipid	1.14	0.04040	-
Plasmalogen PC 36:2	Glycerophospholipid	1.72	0.00004	-
Plasmalogen PC 38:4	Glycerophospholipid	2.13	0.00505	+
Plasmalogen PC 38:6	Glycerophospholipid	1.57	0.00033	+
Plasmalogen PC 40:5	Glycerophospholipid	3.31	0.00310	+
Lyso PC 18:0	Glycerophospholipid	1.37	0.0314	+
Lyso PC 18:2	Glycerophospholipid	1.40	0.00668	+
PE 36:2	Glycerophospholipid	1.51	0.00309	+
Plasmalogen PE 40:5	Glycerophospholipid	1.55	0.00034	-
Plasmalogen PE 40:6	Glycerophospholipid	2.08	$3 \cdot 10^{-7}$	-
PG 36:1	Glycerophospholipid	2.09	$8 \cdot 10^{-7}$	+
TAG 50:1	Glycerolipid	1.44	0.00034	+
TAG 50:2	Glycerolipid	1.26	0.01680	-
TAG 52:1	Glycerolipid	1.66	0.00011	-
SM 16:0	Sphingolipid	1.38	0.00079	-
SM 22:0	Sphingolipid	1.55	0.01280	-
SM 24:0	Sphingolipid	1.87	0.00168	-
SM 24:1	Sphingolipid	1.34	0.00003	-
dhSM 16:0	Sphingolipid	1.73	0.00135	-
dhCer 16:0	Sphingolipid	2.37	0.00006	+
GldhCer 16:0	Sphingolipid	1.62	0.00211	+
Colic acid	Sterol lipids	1.20	0.01070	+

PXD

PC 32:0	Glycerophospholipid	1.54	0.000007	-
PC 32:1	Glycerophospholipid	1.22	0.02930	-
PC 32:2	Glycerophospholipid	1.34	0.00096	-
PC 34:1	Glycerophospholipid	1.25	0.00207	-
PC 34:2	Glycerophospholipid	1.67	0.00002	-
PC 36:2	Glycerophospholipid	1.42	0.00051	-
PC 38:4	Glycerophospholipid	1.97	0.00065	+
PC 38:6	Glycerophospholipid	1.52	0.00061	-
PC 40:4	Glycerophospholipid	2.34	0.00008	+
PC 40:5	Glycerophospholipid	1.45	0.02580	+
PC dimer 34:1	Glycerophospholipid	1.80	0.00195	-
PC dimer 36:1	Glycerophospholipid	2.16	0.00737	+
Plasmalogen PC 34:0	Glycerophospholipid	1.53	0.00173	-
Plasmalogen PC 34:1	Glycerophospholipid	1.55	0.00003	-
Plasmalogen PC 36:4	Glycerophospholipid	1.19	0.01920	-
Plasmalogen PC 38:6	Glycerophospholipid	1.40	0.00300	-
Lyso PC 18:0	Glycerophospholipid	2.24	0.00107	+
Lyso PC 18:2	Glycerophospholipid	1.62	0.00289	+
PE 36:2	Glycerophospholipid	1.42	0.00152	-
PE 40:6	Glycerophospholipid	1.77	0.00011	-
Plasmalogen PE 40:7	Glycerophospholipid	1.26	0.00755	-
TAG 47:1	Glycerolipid	1.40	0.00232	+
TAG 48:0	Glycerolipid	1.56	0.02010	+
TAG 50:0	Glycerolipid	2.67	0.00022	+
TAG 50:1	Glycerolipid	1.38	0.00410	+
TAG 52:0	Glycerolipid	2.19	0.00848	+
TAG 52:1	Glycerolipid	2.04	0.00102	+
TAG 54:1	Glycerolipid	1.24	0.00018	+
TAG 54:4	Glycerolipid	3.36	0.00235	+
SM 16:0	Sphingolipid	1.34	0.00011	-
SM 24:1	Sphingolipid	1.31	0.00340	-
dhSM 24:0	Sphingolipid	3.82	0.00303	+
LacCer 24:1	Sphingolipid	1.46	0.00120	-
dhCer 24:0	Sphingolipid	3.56	0.00026	+

RV				
PC 30:1	Glycerophospholipid	1.42	0.00368	-
PC 32:0	Glycerophospholipid	1.41	0.00091	-
PC 32:2	Glycerophospholipid	1.66	0.00237	-
PC 34:1	Glycerophospholipid	1.27	0.00315	-
PC 34:2	Glycerophospholipid	1.57	0.00036	-
PC 35:0	Glycerophospholipid	1.94	0.00184	-
PC 36:2	Glycerophospholipid	1.48	0.00053	-
PC 38:2	Glycerophospholipid	1.90	0.00427	+
PC 38:5	Glycerophospholipid	1.37	0.00510	-
PC 38:6	Glycerophospholipid	1.59	0.00071	-
Plasmalogen PC 32:1	Glycerophospholipid	1.73	0.00021	+
Plasmalogen PC 34:1	Glycerophospholipid	1.19	0.03340	-
Lyso plasm PC 18:0	Glycerophospholipid	1.20	0.00148	-
Lyso PC 18:0	Glycerophospholipid	2.35	0.00097	+
Lyso PC 18:2	Glycerophospholipid	1.78	0.00165	+
PE 40:6	Glycerophospholipid	1.48	0.00182	-
Plasmalogen PE 38:6	Glycerophospholipid	1.52	0.02880	-
Plasmalogen PE 40:5	Glycerophospholipid	1.56	0.00781	-
Dimer of PC 34:1	Glycerophospholipid	1.51	0.01580	-
TAG 48:0	Glycerolipid	1.49	0.00635	+
TAG 50:0	Glycerolipid	2.63	0.00049	+
TAG 50:1	Glycerolipid	1.30	0.00340	+
TAG 52:0	Glycerolipid	1.89	0.00745	+
TAG 52:1	Glycerolipid	1.57	0.00051	+
SM 16:0	Sphingolipid	1.30	0.01020	-
SM 24:0	Sphingolipid	1.33	0.00096	-
SM 24:1	Sphingolipid	1.61	0.01620	+
dhSM 16:0	Sphingolipid	2.00	0.00178	+
dhSM 24:0	Sphingolipid	4.93	0.00003	+
LacCer 24:0	Sphingolipid	1.27	0.00694	-
dhCer 24:0	Sphingolipid	3.84	0.00016	+
LacdhCer 22:0	Sphingolipid	3.13	0.00031	+
Cholesterol sulfate	Sterol lipids	1.56	0.02430	+

GTE				
PC 32:1	Glycerophospholipid	1.39	0.00009	-
PC 34:1	Glycerophospholipid	2.44	0.00004	-
PC 34:2	Glycerophospholipid	1.58	0.000009	-
PC 36:2	Glycerophospholipid	1.54	0.000007	-
PC 36:3	Glycerophospholipid	1.39	0.00005	-
PC 38:2	Glycerophospholipid	1.25	0.00494	-
PC 38:4	Glycerophospholipid	1.60	0.000003	+
PC 38:6	Glycerophospholipid	1.47	0.00035	-
PC 40:4	Glycerophospholipid	6.23	0.00089	+
PC 40:5	Glycerophospholipid	4.98	0.00166	+
PC 40:6	Glycerophospholipid	1.22	0.00680	+
Plasmalogen PC 32:0	Glycerophospholipid	1.41	0.00132	-
Plasmalogen PC 34:0	Glycerophospholipid	1.46	0.02030	-
Plasmalogen PC 34:1	Glycerophospholipid	1.45	0.00009	-
Plasmalogen PC 38:6	Glycerophospholipid	1.72	0.01180	+
Lyso PC 18:0	Glycerophospholipid	1.60	0.00399	+
PE 36:2	Glycerophospholipid	1.71	0.00009	+
PE 40:6	Glycerophospholipid	1.44	0.00347	+
Plasmalogen PE 40:7	Glycerophospholipid	1.60	0.000002	-
γ -TE	Glycerophospholipid	1.93	0.00001	+
Dimer γ -TE	Glycerophospholipid	20.62	$6 \cdot 10^{-7}$	+
PG 34:1	Glycerophospholipid	2.89	$8 \cdot 10^{-12}$	+
PG 36:1	Glycerophospholipid	1.72	0.01070	+
TAG 50:1	Glycerolipid	1.35	0.00174	-

TAG 50:2	Glycerolipid	1.21	0.00169	-
SM 16:0	Sphingolipid	1.57	0.00002	-
SM 24:1	Sphingolipid	1.18	0.00091	-
dhSM 16:0	Sphingolipid	2.03	0.00020	+
XM462				
PC 32:0	Glycerophospholipid	1.96	$7 \cdot 10^{-9}$	-
PC 34:0	Glycerophospholipid	1.69	0.00815	+
PC 34:1	Glycerophospholipid	1.26	0.00001	-
PC 34:2	Glycerophospholipid	1.62	$4 \cdot 10^{-7}$	-
PC 36:1	Glycerophospholipid	1.30	0.00009	+
PC 36:2	Glycerophospholipid	1.28	0.00010	-
PC 36:4	Glycerophospholipid	1.57	$2 \cdot 10^{-7}$	-
PC 38:5	Glycerophospholipid	1.61	$9 \cdot 10^{-6}$	-
PC 38:6	Glycerophospholipid	1.49	$9 \cdot 10^{-6}$	-
Plasmalogen PC 34:1	Glycerophospholipid	1.14	0.03840	+
Plasmalogen PC 36:4	Glycerophospholipid	1.26	0.08800	-
Dimer of PC 34:1	Glycerophospholipid	1.63	0.00056	-
PG 36:1	Glycerophospholipid	2.35	0.00011	+
SM 16:0	Sphingolipid	2.62	$3 \cdot 10^{-9}$	-
SM 24:0	Sphingolipid	2.02	$2 \cdot 10^{-10}$	-
SM 24:1	Sphingolipid	8.07	$2 \cdot 10^{-7}$	-
LacCer 24:0	Sphingolipid	1.76	0.00024	-

Table S2. Elemental composition of glycerophospholipid and glycerolipid species found in T98G cells, calculated by mass accuracy within error of 10 ppm, with atom constraints and with $-0.5 \leq \text{DBE} \leq 15.0$. DBE: double-bond equivalent. Elemental composition of PC, Plasmalogen PC, Lyso PC, Lyso Plasmalogen PC, PE, SM, dhSM, Cer, dhCer, LacCer, LacdhCer, GdhCer and sterol species refer to the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions whereas PG and TAG species refer to ammonium adducts $[\text{M} + \text{NH}_4]^+$. Lipid species were detected under ESI (+) using an UHPLC system coupled to a TOF analyzer with an Acquity UPLC BEH C_8 column (1.7 μm particle size, 100 mm x 2.1 mm).

GLYCEROPHOSPHOLIPIDS						
Lipid subclass	Lipid specie	Measured mass (Da)	Elemental composition	Calculated mass (Da)	Error (ppm)	DBE
PC						
	30:1	704.5230	$\text{C}_{38}\text{H}_{75}\text{NO}_8\text{P}$	704.5230	0.0	2.5
	32:0	734.5734	$\text{C}_{40}\text{H}_{81}\text{NO}_8\text{P}$	734.5694	5.4	1.5
	32:1	732.5600	$\text{C}_{40}\text{H}_{79}\text{NO}_8\text{P}$	732.5538	8.5	2.5
	32:2	730.5451	$\text{C}_{40}\text{H}_{77}\text{NO}_8\text{P}$	730.5387	8.8	3.5
	34:0	762.6013	$\text{C}_{42}\text{H}_{85}\text{NO}_8\text{P}$	762.6007	0.8	1.5
	34:1	760.5915	$\text{C}_{42}\text{H}_{83}\text{NO}_8\text{P}$	760.5851	8.4	2.5
	34:2	758.5770	$\text{C}_{42}\text{H}_{81}\text{NO}_8\text{P}$	758.5694	10.0	3.5
	35:0	776.6090	$\text{C}_{43}\text{H}_{87}\text{NO}_8\text{P}$	776.6169	10.0	1.5
	36:1	788.6145	$\text{C}_{44}\text{H}_{87}\text{NO}_8\text{P}$	788.6164	-2.4	2.5
	36:2	786.6005	$\text{C}_{44}\text{H}_{85}\text{NO}_8\text{P}$	786.6007	-0.3	3.5
	36:3	784.5800	$\text{C}_{44}\text{H}_{83}\text{NO}_8\text{P}$	784.5851	-6.5	4.5
	36:4	782.5711	$\text{C}_{44}\text{H}_{81}\text{NO}_8\text{P}$	782.5694	2.2	5.5
	38:2	814.6400	$\text{C}_{46}\text{H}_{89}\text{NO}_8\text{P}$	814.6320	9.8	3.5
	38:3	812.6177	$\text{C}_{46}\text{H}_{87}\text{NO}_8\text{P}$	812.6164	-5.8	4.5

38:4	810.5974	C ₄₆ H ₈₅ NO ₈ P	810.6007	-4.1	5.5
38:5	808.5861	C ₄₆ H ₈₃ NO ₈ P	808.5851	1.2	6.5
38:6	806.5683	C ₄₆ H ₈₁ NO ₈ P	806.5694	-1.4	7.5
40:4	838.6290	C ₄₈ H ₈₉ NO ₈ P	838.6320	-3.6	5.5
40:5	836.6080	C ₄₈ H ₈₇ NO ₈ P	836.6164	-10.0	6.5
40:6	834.5975	C ₄₈ H ₈₅ NO ₈ P	834.6013	-4.6	7.5
40:7	832.5817	C ₄₈ H ₈₃ NO ₈ P	832.5856	-4.7	8.5
Plasmalogen PC					
32:0	720.5840	C ₄₀ H ₈₃ NO ₇ P	720.5907	-9.3	0.5
32:1	718.5771	C ₄₀ H ₈₁ NO ₇ P	718.5751	2.8	1.5
34:0	748.6150	C ₄₂ H ₈₇ NO ₇ P	748.6220	-9.4	0.5
34:1	746.5993	C ₄₂ H ₈₅ NO ₇ P	746.6064	-9.5	1.5
36:2	772.6140	C ₄₄ H ₈₇ NO ₇ P	772.6215	-9.7	2.5
36:4	768.5833	C ₄₄ H ₈₃ NO ₇ P	768.5907	-9.6	4.5
38:4	796.6140	C ₄₆ H ₈₇ NO ₇ P	796.6220	-10.0	4.5
38:6	792.5850	C ₄₆ H ₈₃ NO ₇ P	792.5907	-7.2	6.5
40:5	822.6295	C ₄₈ H ₈₉ NO ₇ P	822.6377	-10.0	5.5
Lyso PC					
18:0	524.3671	C ₂₆ H ₅₅ NO ₇ P	524.3711	7.6	0.5
18:2	520.3394	C ₂₆ H ₅₁ NO ₇ P	520.3403	-1.7	2.5
Lyso plasmalogen PC					
18:0	510.3868	C ₂₆ H ₅₇ NO ₆ P	510.3918	-9.8	-0.5
PE					
36:2	744.5600	C ₄₁ H ₇₉ NO ₈ P	744.5543	7.7	3.5
40:6	790.5441	C ₄₅ H ₇₇ NO ₈ P	790.5387	6.8	8.5
Plasmalogen PE					
38:6	750.6057	C ₄₃ H ₇₇ NO ₇ P	750.5436	0.3	6.5
40:5	778.5699	C ₄₅ H ₈₁ NO ₇ P	778.5747	-6.2	5.5
40:7	774.5497	C ₄₅ H ₇₇ NO ₇ P	774.5438	7.6	7.5
PG					
34:1	766.5634	C ₄₀ H ₈₁ NO ₁₀ P	766.5598	9.8	1.5
36:1	794.5949	C ₄₂ H ₈₅ NO ₁₀ P	794.5949	0.6	6.5
GLYCEROLIPIDS					
TAG					
47:1	796.7382	C ₄₉ H ₉₈ NO ₆	796.7394	-1.5	2.5
48:0	824.7682	C ₅₁ H ₁₀₂ NO ₆	824.7707	-3.0	1.5
50:0	852.7984	C ₅₃ H ₁₀₆ NO ₆	852.8020	-4.2	1.5
50:1	850.7836	C ₅₃ H ₁₀₄ NO ₆	850.7858	-2.6	2.5
50:2	848.7687	C ₅₃ H ₁₀₂ NO ₆	848.7702	-1.8	3.5
52:0	880.8301	C ₅₅ H ₁₁₀ NO ₆	880.8333	-3.6	1.5
52:1	878.8143	C ₅₅ H ₁₀₈ NO ₆	878.8171	-3.2	2.5
54:1	906.8446	C ₅₇ H ₁₁₂ NO ₆	906.8489	-4.7	2.5
54:4	900.7956	C ₅₇ H ₁₀₆ NO ₆	900.8015	-6.5	5.5

SPHINGOLIPIDS						
SM						
	16:0	703.5699	C ₃₉ H ₈₀ N ₂ O ₆ P	703.5749	-7.1	1.5
	22:0	787.6668	C ₄₅ H ₉₂ N ₂ O ₆ P	787.6688	-2.5	1.5
	24:0	815.6940	C ₄₇ H ₉₆ N ₂ O ₆ P	815.7001	-7.5	1.5
	24:1	813.6824	C ₄₇ H ₉₄ N ₂ O ₆ P	813.6844	-2.5	2.5
dhSM						
	16:0	705.5859	C ₃₉ H ₈₂ N ₂ O ₆ P	705.5911	-7.4	0.5
	24:0	817.7094	C ₄₇ H ₉₈ N ₂ O ₆ P	817.7162	-8.3	0.5
dhCer						
	16:0	540.5334	C ₃₄ H ₇₀ NO ₃	540.5356	-4.1	0.5
	24:0	652.6566	C ₄₂ H ₈₆ NO ₃	652.6608	-6.4	0.5
LacCer						
	24:0	974.7430	C ₅₄ H ₁₀₄ NO ₁₃	974.7508	-8.0	3.5
	24:1	972.7320	C ₅₄ H ₁₀₂ NO ₁₃	972.7351	-3.2	4.5
LacdhCer						
	22:0	976.7572	C ₅₄ H ₁₀₆ NO ₁₃	976.7659	-8.9	2.5
Glc dhCer						
	16:0	700.5728	C ₄₀ H ₈₀ NO ₈	700.5727	-7.6	2.5
STEROL LIPIDS						
	Colic acid	391.2822	C ₂₄ H ₃₉ O ₄	391.2848	0.3	5.5
	Cholesterol sulphate	465.3057	C ₂₈ H ₄₆ ClO ₃	465.3034	0.4	8.5

Table S3. Elemental composition of XM462 and γ -tocotrienol and some of their metabolic forms found in T98MG cells, calculated by mass accuracy within error of 10 ppm, with atom constraints and with $-0.5 \leq \text{DBE} \leq 15.0$. DBE: double-bond equivalent. Elemental composition of these species refer to the $[\text{M}+\text{H}]^+$ ions.

GLYCEROPHOSPHOLIPIDS					
Compound	Measured mass (Da)	Elemental composition	Calculated mass (Da)	Error (ppm)	DBE
γ -TE	411.3232	C ₂₈ H ₄₂ O ₂	411.3241	-7.3	4.5
γ -TE Dimer	819.6128	C ₅₆ H ₈₃ O ₄	819.6147	2.6	6.1
XM462	446.3656	C ₂₅ H ₅₁ NO ₃ S	446.3668	-2.4	1.8
O-XM462	462.3597	C ₂₅ H ₅₁ NO ₂₃ S	462.3602	-1.4	2.3
GlcXM462	608.4172	C ₃₁ H ₆₁ NO ₈ S	608.4196	1.6	7.2

RESULTATS ADDICIONALS CAPÍTOL 3

Elecció del model cel·lular per l'estudi

Introducció

El primer punt decisiu en un estudi d'aquestes característiques és l'elecció del model cel·lular escaient per estudiar la hipòtesi plantejada. En el procés d'elecció es va treballar amb diversos models cel·lulars humans tumorals de càncer de mama i de glioma. Concretament tres línies cel·lulars de càncer de mama: les MCF-7 amb receptors d'estrògens i les MDA-MB-231 i MDA-MB-468, cap de les dues amb receptors d'estrògens però amb diferent agressivitat. Les MDA-MB-231 són molt invasives mentre que les MDA-MB-468 ho són poc i tenen PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat 3-fosfatasa) mutada. PTEN és una fosfatasa supressora de tumors que antagonitza la via de senyalització PI3KC1/Akt. També s'empraran dues línies de glioma humà: les U87MG i les T98G que es diferencien per la seva agressivitat. Les U87MG provenen d'un astrocitoma, és a dir un tumor primari que apareix en el parènquima cerebral però que poques vegades produeix metàstasi. D'altra banda les T98G són un glioblastoma multiforme també conegut com astrocitoma de grau IV, el tumor més comú però també el més maligne entre les neoplàsies de la glia. Existeixen diverses alteracions genètiques associades amb la formació i la progressió dels gliomes com ara mutacions o canvis en la expressió gènica. Les alteracions genètiques més comunes recauen en el receptor del factor de creixement epidèrmic (EGFR), PTEN, p53 o p16. p16 és una proteïna supressora que codifica pel gen *CDKN2A* i exerceix un paper essencial en la regulació del cicle cel·lular alentint la progressió de G₁ a la fase S. El rerefons genètic de línies cel·lulars estudiades es recullen en la taula 2. La informació s'ha extret de Cobanoglu i col., 2016²⁴⁹, Banerjee i col., 2016²⁵⁰ i Marzec i col., 2015²⁵¹.

	MCF-7	MDA-MB-231	MDA-MB-468	T98G	U87MG
ERs	WT	Supressió	Supressió	-	-
PTEN	WT	WT	Mutació	Mutació	Mutació
p53	WT	Mutació	Mutació	Mutació	WT
EGFR	-	-	-	WT	Mutació
p16	-	-	-	Supressió	Supressió

Taula 2: Mutacions genètiques en les línies cel·lulars MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T98G i U87MG. EGFR, receptor del factor de creixement epidèrmic; ERs, receptors d'estrògens; WT, "wild-type" o no mutada; -, no és conegut

Materials i mètodes

Materials:

Juntament amb els materials descrits en l'article 4 presentat en el capítol 3, es va emprar la RNAsa adquirida a Roche i el iodur de propidi de Sigma-Aldrich. El *kit* de

detecció d'apoptosi "Annexin V-FITC Early Apoptosis Detection Kit" es va comprar a Cell Signaling.

Cultiu cel·lular:

Les línies cel·lulars MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T98G i U87MG es van cultivar a 37°C, 5% de CO₂ en DMEM amb un alt percentatge de glucosa i suplementat amb un 10% de sèrum fetal boví i un 1% de penicil·lina i estreptomina.

Viabilitat cel·lular:

La viabilitat cel·lular es va analitzar amb el mètode de la SRB seguint la metodologia descrita en l'article 4 presentat en el capítol 3.

Anàlisi del cicle cel·lular:

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous a una densitat de 1×10^5 cèl·lules/ml (1 ml/pou). Després de 24 h es van incubar les cèl·lules amb els compostos o etanol com a control durant 24 h més. Després d'aquest temps, el medi es va retirar, es va rentar amb 400 µl de PBS-EDTA 1% BSA i es van recollir les cèl·lules amb 400 µl de Tripsina-EDTA 1% BSA i 600 µl de medi. Les cèl·lules es van centrifugar a 400 g durant 3 min i el pellet es va rentar dos cops amb 400 µl de PBS-EDTA 1% BSA. Les cèl·lules es van fixar amb 9.5 ml d'etanol 70% i 0.5 ml de PBS durant tota la nit a -20°C. Les cèl·lules fixades es van centrifugar, rentar amb PBS-EDTA 1% BSA i incubar amb RNasa (10 µg/ml) i iodur de propidi (0.1 mg/ml en PBS) durant 2h a 37°C. Les cèl·lules tenyides s'analitzen utilitzant un citòmetre de flux Guava Easy-Cyte™. L'anàlisi de les dades es va realitzar amb el programa Multicycle AV.

Anàlisi de l'apoptosi:

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous a una densitat de 1×10^5 cèl·lules/ml (1 ml/pou). Després de 24 h es van incubar les cèl·lules amb els compostos o etanol com a control durant 24 h més. Com a control positiu d'inducció d'apoptosi es va utilitzar la CerC8 10 µM. Després d'aquest temps, el medi es va recollir en un falcon i el pou es va rentar amb 400 µl de PBS-EDTA 1% BSA que es va tornar a recollir en el mateix falcon. Es van recollir les cèl·lules amb 400 µl de Tripsina-EDTA 1% BSA i 600 µl de medi que es va unir al medi ja recollit. Tot el material recollit es va centrifugar a 400 g durant 3 min i el pellet es va rentar dos cops amb 400 µl de PBS-EDTA 1% BSA. El pellet cel·lular es va ressuspensar en 100 µl del tampó d'unió a Annexin i es va addicionar 5 µl d'Alexa Fluor® 488 Annexin V i 1 µl de iodur de propidi (0.1 mg/ml en PBS). La barreja es va incubar 15 min a temperatura ambient. En el moment de l'anàlisi es van afegir 300 µl del tampó d'unió a Annexin i barrejar la mescla amb el vòrtex suaument. Finalment les cèl·lules tenyides es van analitzar utilitzant un citòmetre de flux Guava Easy-Cyte™.

Anàlisi del lipidoma:

La composició d'esfingolípids es va analitzar per UPLC-TOF seguint la metodologia descrita en l'article 4 presentat en el capítol 3.

Anàlisi de l'autofàgia:

L'autofàgia es va determinar quantificant els nivells del marcador d'autofàgia LC3-II tant per citometria de flux com per Western Blot. Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous a una densitat de 1×10^5 cèl·lules/ml (1 ml/pou) i es van deixar 24 h. En la determinació de la LC3-II per citometria de flux les cèl·lules es van incubar amb els compostos o etanol com a control durant 24 h més. 2 h abans de recollir les cèl·lules, es van incubar amb cloroquina 20 μ M. Després d'aquest temps, el medi es va retirar, es van rentar els pous amb 400 μ l de PBS i es van recollir les cèl·lules amb 400 μ l de Tripsina-EDTA i 600 μ l de medi. Les cèl·lules es van centrifugar a 200 g durant 5 min i el pellet es va rentar dos cops amb 400 μ l de PBS. Es va descartar el sobrenedant i es va ressuspèndre el pellet cel·lular amb 100 μ l d'una solució de saponina adequada (0.1-0.2% en PBS). Es va afegir 600 μ l de PBS i centrifugar a 200 g durant 5 min. Es va descartar el sobrenedant i es va incubar el pellet amb l'anticòs anti-LC3 1:20 en 0.01% de saponina durant 20 min a temperatura ambient. Es va tornar a afegir 600 μ l de PBS i centrifugar a 200 g durant 5 min. Es va descartar el sobrenedant i es va incubar amb l'anticòs secundari anti-ratolí 1:20 en 0.01% de saponina durant 20 min a temperatura ambient i en la foscor. Finalment es va tornar a centrifugar a 200 g durant 5 min, es va ressuspèndre el pellet en PBS i es van analitzar les mostres utilitzant un citòmetre de flux Guava Easy-CyteTM. La determinació de la LC3-II per Western Blot es va realitzar seguint la metodologia descrita en l'article 4 presentat en el capítol 3.

Resultats

El CCX, PXD i RV alteren la viabilitat cel·lular:

En primer lloc es va analitzar l'activitat citotòxica del CCX, PXD i RV en les diferents línies cel·lulars, valorant la viabilitat cel·lular amb l'assaig SRB i calculant el valor IC_{50} (figura 33). Els compostos utilitzats en aquest estudi afecten la viabilitat cel·lular en les línies cel·lulars treballades en diferent grau. En general les cinc línies cel·lulars es van comportar de manera similar, sent el CCX el producte que presentava una toxicitat més elevada amb IC_{50} de 69 μ M (MCF-7), 92 μ M (MDA-MB-231), 58 μ M (MDA-MB-468), 98 μ M (T98G) i 125 μ M (U87MG). Sembla ser que les línies de càncer de mama MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468 eren més sensibles als compostos estudiats, amb valors de IC_{50} més baixos, que les de glioma. Així, el PXD va mostrar valors de IC_{50} de 125 μ M (MCF-7), 119 μ M (MDA-MB-231) i 66 μ M (MDA-MB-468). Mentre que el RV presentava valors IC_{50} de 191 μ M (MCF-7), 238 μ M (MDA-MB-231) i 108 μ M (MDA-MB-468). Per contra el PXD i RV en les línies de glioma van resultar ser poc eficaços en reduir la viabilitat cel·lular amb valors de IC_{50} per sobre de 200 μ M en ambdues línies cel·lulars.

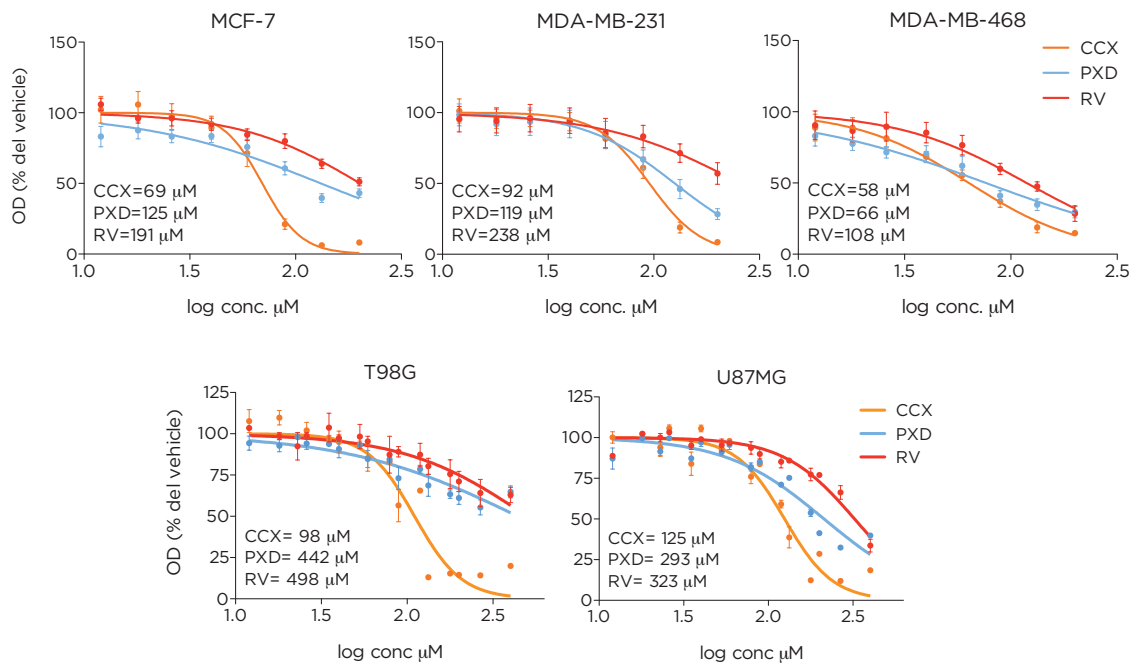


Figura 33: Efecte dels compostos sobre la viabilitat cel·lular. Les cèl·lules MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T98G i U87MG es van incubar amb el CCX, PXD i RV durant 24 h i la viabilitat cel·lular es va determinar amb l'assaig de la SRB. L'ajustament de les corbes dosi resposta a una equació sigmoïdal de pendent variable va permetre calcular els valors IC₅₀ detallats en la figura. Les dades es van obtenir a partir de quatre experiments amb triplicats

El CCX, PXD i RV aturen el cicle cel·lular:

L'efecte descrit en la viabilitat cel·lular corresponia a una disminució de la proliferació cel·lular. Per comprovar el mecanisme per el qual els compostos inhibien la proliferació cel·lular, es va examinar el cicle cel·lular després de 24 h de tractament amb CCX, PXD i RV per citometria de flux en totes les línies cel·lulars (figura 34). Es va escollir treballar amb concentracions dels compostos pròximes a la IC₂₅ calculades a partir de les corbes sigmoïdals, que oferien el màxim efecte sobre les cèl·lules sense alterar la seva viabilitat.

Com es pot observar en la distribució cel·lular, en la línia MCF-7 en comparació amb el control, els tres compostos, però sobretot el PXD, provocaven una aturada significativa del cicle cel·lular en la fase G₂/M. Aquest efecte també es va repetir en les MDA-MB-231 amb el PXD i RV. En les MDA-MB-468, el PXD també va provocar una acumulació de cèl·lules en la fase G₂/M, però en canvi el CCX ho feia en la fase S i el RV semblava no provocar cap efecte sobre el cicle cel·lular. Les línies de glioma presentaven més diferències entre tractaments. El CCX en les T98G aturava el cicle cel·lular en G₁, en canvi en les U87MG no provocava canvis significatius. El PXD tal com passava en les cèl·lules de càncer de mama causava una clara acumulació en la fase G₂/M en ambdues línies de glioma. Aquest efecte també s'observava amb el RV en les U87MG, mentre que en les T98MG les cèl·lules s'acumulaven en G₁.

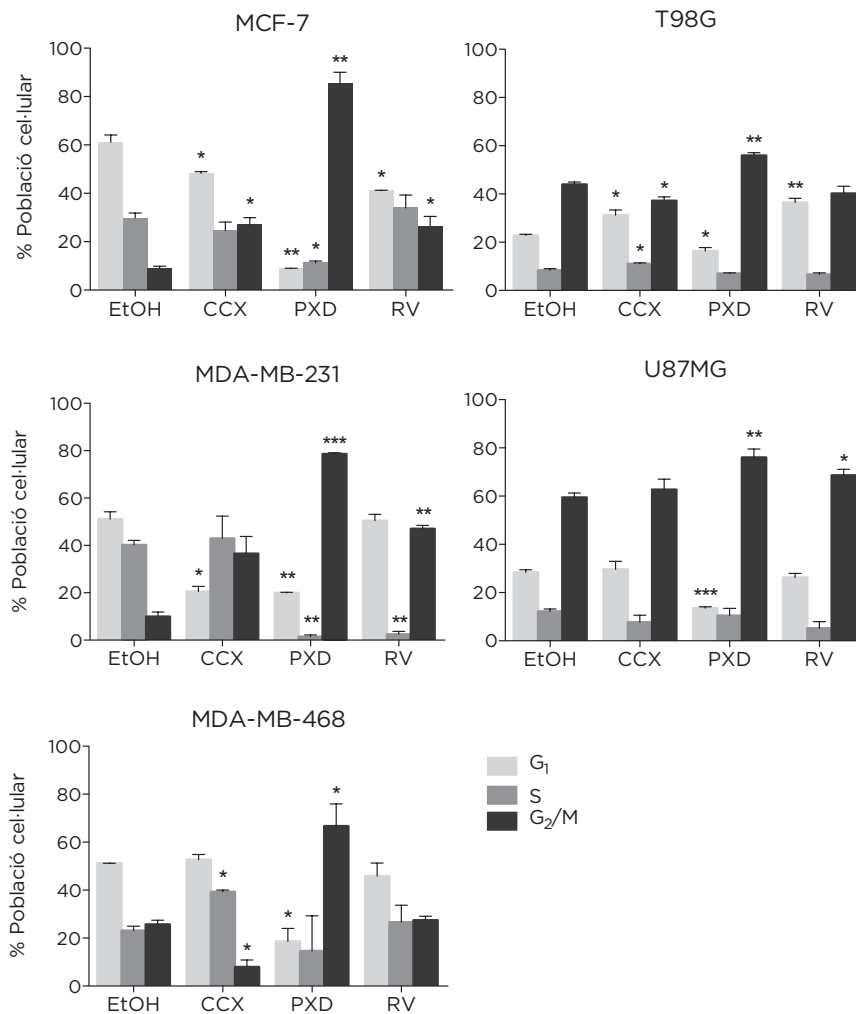


Figura 34: Efecte dels compostos sobre el cicle cel·lular. Es representa la quantificació relativa del número de cèl·lules en cada una de les fases del cicle cel·lular. Les cèl·lules MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T98G i U87MG es van incubar amb el CCX, PXD i RV a la concentració IC₂₅ corresponent durant 24 h i es compara amb l'etanol com a control. Es van analitzar les cèl·lules incubades amb iodur de propidi en el citòmetre de flux. Les dades corresponen a les mitjanes ±SD de tres experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa respecte el control amb EtOH (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, prova *t* de Student de dues cues per dades independents)

Es detecta apoptosi en MCF-7 i MDA-MB-231:

Per acabar de caracteritzar l'efecte del CCX, PXD i RV en les línies de càncer de mama es va analitzar la inducció d'apoptosi en les concentracions IC₅₀ i IC₂₅ corresponents a cada compost i línia cel·lular (figura 35). En funció de la fluorescència del iodur de propidi i l'Annexin V analitzada per citometria de flux, les cèl·lules es distribueixen entre cèl·lules vives, mortes i cèl·lules en apoptosi primerenca o tardana. L'apoptosi inicial i tardana es va induir amb la *N*-hexanoïlesfingosina (CerC6), que es va utilitzar com a control positiu de la resposta apoptòtica¹⁶⁹. No obstant, només es va assolir l'efecte esperat en la línia MDA-MB-231, ja que la CerC6 en les condicions de l'assaig en les cèl·lules MCF-7 va resultar ser massa tòxica, mentre que en les MDA-MB-468 no va induir cap resposta.

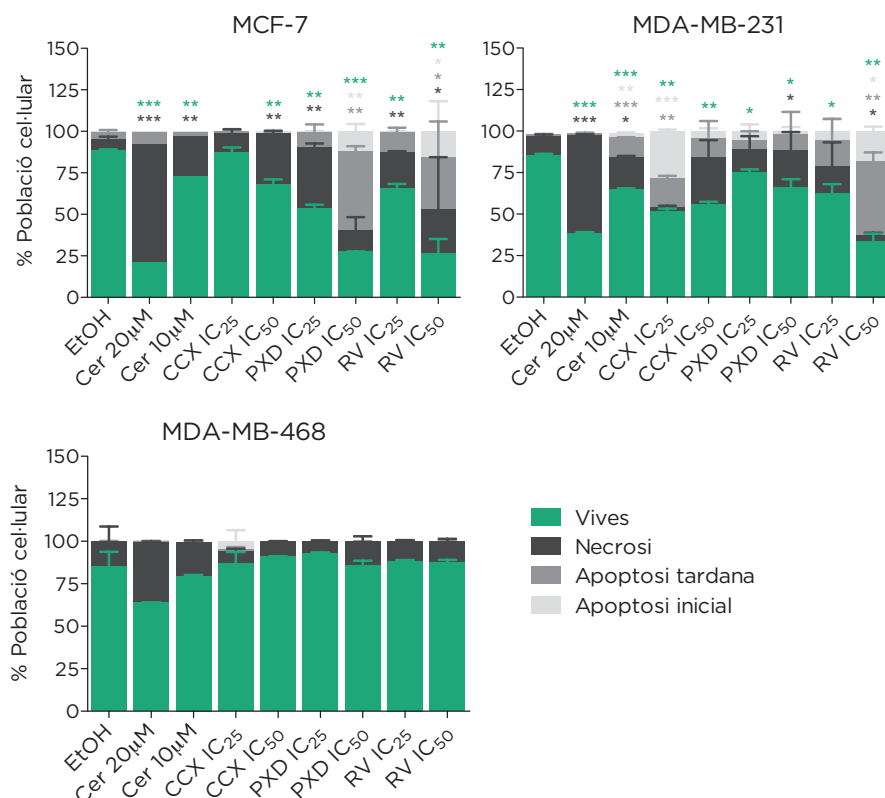


Figura 35: Efecte dels compostos sobre la inducció d'apoptosi. Les cèl·lules MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468 es van incubar amb el CCX, PXD i RV a la concentració IC₅₀ i IC₂₅ durant 24 h. Les cèl·lules es van analitzar per citometria de flux després d'una tinció amb iodur de propidi/Annexin V. Es representa el percentatge de cèl·lules vives, en apoptosi inicial, en apoptosi tardana o en necrosi. Es comparen amb un control negatiu que és l'etanol i un control positiu d'inducció d'apoptosi, la CerC6. Les dades corresponen a les mitjanes ±SD de dos experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa respecte el control amb EtOH. Els colors dels asteriscs corresponen amb la llegenda de la figura (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, prova t de Student de dues cues per dades independents)

Sobre l'efecte dels compostos, en les cèl·lules MCF-7 incubades amb PXD i RV a les concentracions més elevades es va observar apoptosi tant inicial com tardana. Amb CCX, en canvi, mentre que a concentracions baixes no hi havia alteració de la viabilitat cel·lular, a la IC₅₀ es detectava necrosi. En les MDA-MB-231 es va detectar apoptosi amb la IC₂₅ de CCX i a concentracions elevades de RV. Mentre que en la resta de condicions provades les cèl·lules presentaven les característiques pròpies de la necrosi. Finalment en les cèl·lules MDA-MB-468 no es va detectar apoptosi en cap condició, incloent el control positiu amb CerC6.

El CCX, PXD i RV provoquen una acumulació de dhCer:

Tenint en compte la hipòtesi del treball en que els compostos actuen inhibint la Des1, es va comprovar el seu efecte analitzant la composició d'esfingolípids després d'incubar durant 24 h amb concentracions no tòxiques de CCX, PXD i RV mitjançant UPLC-TOF. Gràcies als estàndards interns, l'anàlisi va permetre quantificar cada espècie d'esfingolípids, observant un major efecte sobre els dihidroesfingolípids, i en especial les dhCer (figura 36). En totes les línies cel·lulars i amb els tres compostos es

va veure una acumulació significativa de dhCer respecte el control amb EtOH, com a conseqüència de la inhibició de l'enzim Des1. Altres dihidroesfingolípidis com les dhSM o les lactosildihidroceramida (LacdhCer) també van augmentar amb la incubació de CCX, PXD i RV (dades no mostrades) tot i que l'efecte va ser més destacat en les dhCer. En canvi, els esfingolípidis derivats de la So (Cer, SM o LacCer) no van variar de manera significativa respecte els controls (dades no mostrades). Cal remarcar que en general, en les cèl·lules T98G i U87MG l'efecte dels compostos en l'acumulació de dhCer va ser més accentuat arribant a assolir més de 1000 pmols de dhCer per milió de cèl·lules. En canvi en les línies de mama i sobretot amb el CCX, l'efecte sobre les dhCer va ser molt més atenuat.

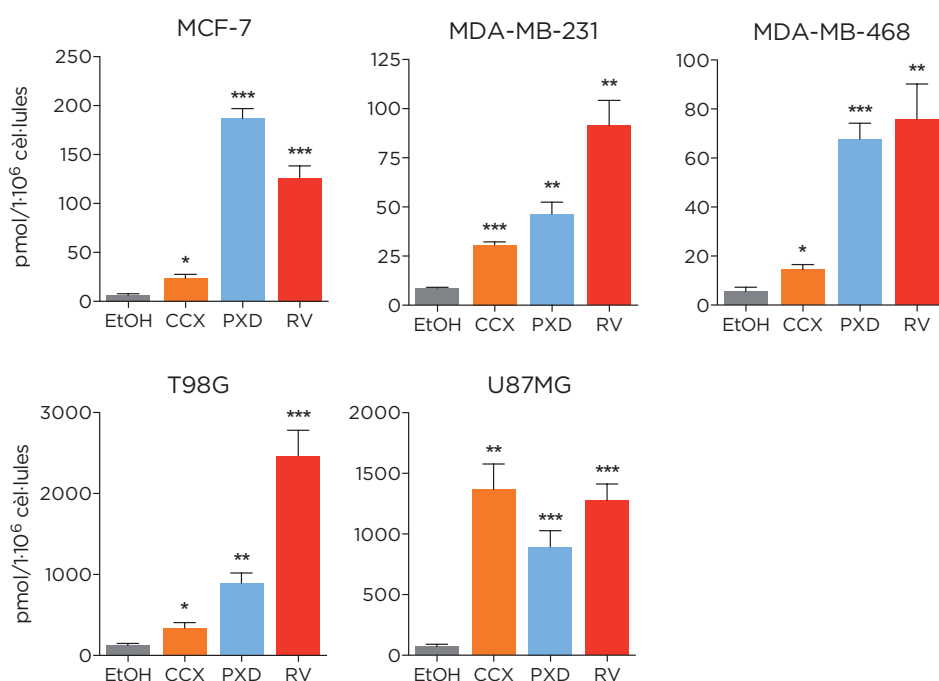


Figura 36: Efecte del CCX, PXD i RV sobre les dhCer. Les cèl·lules MCF-7, MDA-MB-231, MDA-MB-468, T98G i U87MG es van incubar amb els compostos a la concentració IC₂₅ corresponent durant 24 h. L'anàlisi dels lípids es va dur a terme per UPLC-TOF. Es representen els pmols/1x10⁶ cèl·lules de dhCer per cada tractament. Les dades corresponen a les mitjanes ±SD de tres experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa respecte el control amb EtOH (*P<0.05, **P<0.01, ***P<0.001, prova *t* de Student de dues cues per dades independents)

El CCX, PXD i RV indueixen autofàgia en T98G i U87MG:

Degut a que diversos estudis recolzen que les dhCer estan involucrades en la inducció d'autofàgia, es va estudiar la capacitat del CCX, PXD i RV d'induir autofàgia en les mateixes condicions on es veia una acumulació de dhCer. Es va determinar la inducció d'autofàgia mesurant l'acumulació de la proteïna LC3-II per citometria de flux en el cas de les línies de mama i amb Western Blot amb les cèl·lules de glioma. Es va utilitzar la cloroquina o els inhibidors de proteases E64D i Pepstatina A per bloquejar l'últim pas de l'autofàgia i així determinar el flux autofàgic. En les MCF-7 i les MDA-MB-231 es va utilitzar com a control positiu d'inducció d'autofàgia el benzil isotiocianat (BITC)²⁵². Després de la incubació amb CCX, PXD i RV durant 24 h,

únicament es veu un augment dels nivells de LC3-II amb BITC. Per altra banda, en les MDA-MB-468 no es va detectar autofàgia, ni tant sols amb el control positiu (figura 37). L'addició de cloroquina no va provocar un efecte diferenciat respecte els tractaments sense aquest inhibidor lisosomal (dades no mostrades), el que demostra que cap dels compostos en les condicions estudiades provoquen una inducció del flux autofàgic en les línies de càncer de mama.

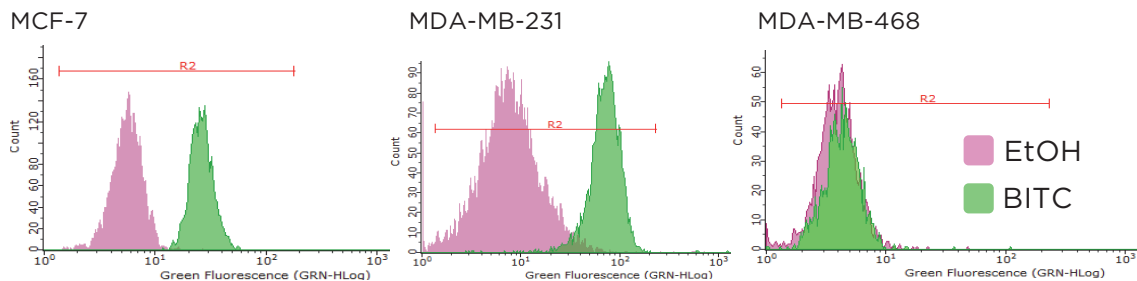


Figura 37: Efecte del CCX, PXD i RV sobre la inducció d'autofàgia. Les cèl·lules MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468 es van tractar amb BITC durant 24 h i amb cloroquina les últimes 2 h d'incubació. Les cèl·lules es van processar i analitzar per citometria de flux després de les incubacions amb els anticossos anti-LC3 i anti-ratolí/FITC. Es mostren els histogrames representatius del mesurament de la fluorescència, on el pic rosa correspon al control amb etanol i el pic verd és el control positiu amb BITC.

En les cèl·lules de glioma es va comprovar la inducció d'autofàgia analitzant el flux de LC3-II amb l'addició o absència dels PI E64D i Pepstatina A. L'anàlisi per Western Blot de la proteïna LC3-II en les T98G i U87MG incubades amb CCX, PXD i RV va mostrar un augment dels nivells del marcador d'autofàgia respecte el control amb EtOH. Aquest increment dels nivells de LC3-II es va intensificar amb la presència de PI, demostrant que tant el CCX, PXD com RV provoquen una activació del flux autofàgic en les línies T98G i U87MG (figura 38).

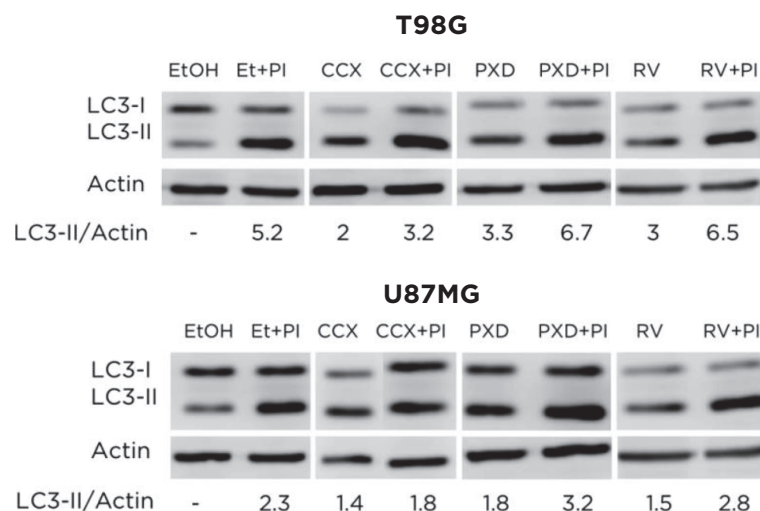


Figura 38: Efecte del CCX, PXD i RV sobre el flux d'autofàgia. Les cèl·lules T98G i U87MG es van tractar amb els compostos a la concentració IC₂₅ corresponent durant 24 h amb o sense la preincubació de 2 h dels PI (E64D i Pepstatin A). Es mostren imatges de Western Blot d'un experiment representatiu. Els valors numèrics corresponen als canvis en LC3-II/actina respecte el control (EtOH).

RESULTATS ADDICIONALS CAPÍTOL 3

Anàlisi de l'efecte de ROS en T98G i U87MG

Introducció

Per determinar els nivells de ROS cel·lulars es va utilitzar el diacetat de 2,7-diclorodihidrofluoresceïna (H_2DCFDA). Aquest sensor és retingut dins la cèl·lula i s'oxida fàcilment en presència de ROS a 2,7-diclorofluoresceïna (DCF) que emet fluorescència²⁵³. Per tant la disminució de fluorescència comparada amb un control positiu que generi ROS, en aquest cas H_2O_2 , indicarà la capacitat antioxidant dels compostos. El PXD i el RV ja són reconeguts components amb activitat antioxidant, però l'objectiu en aquest estudi va ser analitzar l'efecte del CCX, PXD i RV sobre els nivells de ROS i la seva repercussió en els nivells d'esfingolípid.

Materials i mètodes

Materials:

Juntament amb els materials descrits en l'article 4 presentat en el capítol 3, es va emprar el sensor H_2DCFDA adquirit a Sigma-Aldrich.

Determinació nivells de ROS:

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 96 pous a una densitat de 6.5×10^4 cèl·lules/ml (100 μ l/pou) i es van deixar 24 h. Passat aquest temps es va afegir el sensor H_2DCFDA 25 μ M (10 μ l/pou juntament amb el CCX, PXD i RV en un banc de dilucions partint de la IC_{50} com a concentració màxima). Es va incubar la placa 1 h a 37°C i 5% de CO_2 . Es va aspirar el medi, afegir l'agent oxidant, en aquest cas H_2O_2 , i incubar les cèl·lules 1 h més a 37°C i 5% de CO_2 . Finalment es va llegir la fluorescència en un espectrofotòmetre en una longitud d'excitació i emissió de 485 i 516 nm respectivament.

Anàlisi del lipidoma:

Les cèl·lules es van sembrar en plaques de 6 pous a una densitat de 2.5×10^5 cèl·lules/ml (1 ml/pou) i es van deixar 24 h. Es van incubar les cèl·lules amb el sensor H_2DCFDA 25 μ M (100 μ l/pou) juntament amb el CCX i PXD a la concentració IC_{25} durant 1 h. Es va aspirar el medi, afegir H_2O_2 i incubar les cèl·lules 1 h més. Després d'aquest temps, el medi es va retirar, es va rentar amb 400 μ l de PBS i van recollir les cèl·lules amb 400 μ l de Tripsina-EDTA i 600 μ l de medi. La composició d'esfingolípid es va analitzar per UPLC-TOF seguint la metodologia descrita en l'article 4 presentat en el capítol 3.

Resultats

El PXD i el RV, però no el CCX tenen un efecte antioxidant:

Es va analitzar l'efecte antioxidant del CCX, PXD i RV en les cèl·lules T98G i U87MG mesurant la reducció de ROS mitjançant el sensor fluorescent H_2DCFDA . Es va utilitzar H_2O_2 com agent oxidant a una concentració de 30 μ M en el cas de les T98G i

15 μM en les U87MG. Aquestes concentracions corresponen a la resposta màxima en generació de ROS per cada una de les línies cel·lulars sense que s'observi toxicitat (resultats no mostrats). Com es pot veure en la figura 39, només el PXD i RV van ser capaços de reduir les ROS generades amb la incubació amb H_2O_2 , tal com s'esperava deguda a la seva naturalesa antioxidant.

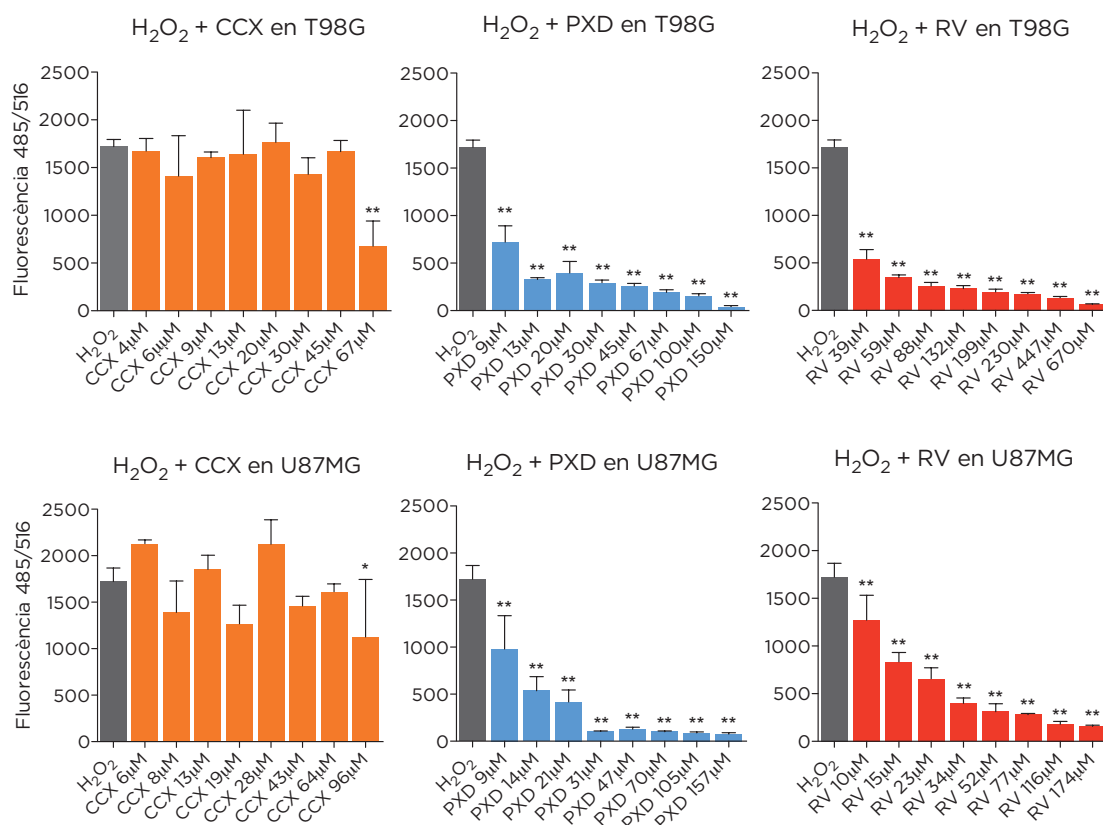


Figura 39: Efecte del CCX, PXD i RV sobre la reducció de ROS. Les cèl·lules T98G i U87MG es van incubar amb H_2O_2 juntament amb els compostos a diferents concentracions i el sensor de ROS, H_2DCFDA . La quantitat de fluorescència emesa pel H_2DCFDA equival als nivells de ROS. Es mesura la fluorescència en una longitud d'excitació i emissió de 485 i 516 nm respectivament. Les dades corresponen a les mitjanes \pm SD de dos experiments amb triplicats. Els asteriscs indiquen una diferència significativa respecte l' H_2O_2 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$, prova *t* de Student de dues cues per dades independents)

Entre el PXD i el RV l'efecte antioxidant més acusat va ser amb PXD, ja que va arribar a reduir la fluorescència, i per tant els nivells de ROS, al voltant dels valors del control de fluorescència basal i ho va fer a unes concentracions més baixes que el RV. Amb el CCX, excepte a la concentració més elevada assajada, no es va reduir la fluorescència del sensor i per tant significa que no s'han reduït les ROS. Aquest comportament s'observa en ambdós models cel·lulars.

Les ROS provoquen un augment de dhCer:

S'escull el CCX i el PXD (l'antioxidant que ha resultat ser més eficaç en la reducció de ROS) per analitzar l'efecte en el lipidoma i relacionar els nivells de ROS amb el metabolisme dels esfingolípids. Degut al poc temps d'incubació, només 1 h, només es va veure alteració dels esfingolípids en les dhCer i no en altres espècies més

complexes (dades no mostrades). El que es va observar, representat en la figura 40, és que a part de l'efecte ja conegut del CCX i PXD en augmentar les dhCer (tot i que amb 1 h d'incubació l'efecte era molt més atenuat de l'efecte observat a 24 h), també es veia acumulació de dhCer en les cèl·lules incubades amb H₂O₂. A més, aquest augment de dhCer s'intensificava al coincubar el H₂O₂ amb CCX o PXD, sobretot en el cas del tractament amb CCX.

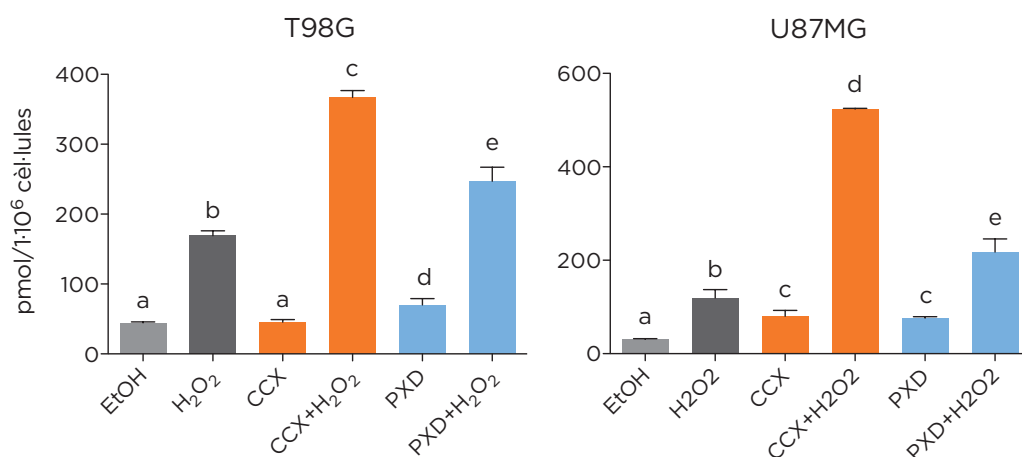


Figura 40: Efecte del CCX i PXD sobre les dhCer. Les cèl·lules T98G i U87MG es van incubar a la concentració IC₂₅ corresponent juntament amb el sensor de ROS, H₂DCFDA, i l'H₂O₂ com agent oxidant.. L'anàlisi dels lípids es va dur a terme per UPLC-TOF. Es representen els pmols/1x10⁶ cèl·lules de dhCer per cada tractament. Les dades corresponen a les mitjanes ±SD de dos experiments amb triplicats i es van analitzar per one-way ANOVA seguit d'un test de comparació múltiple de Bonferroni si en l'ANOVA P<0.05. Les lletres sobre cada barra indiquen diferència significativa entre els grups (P<0.05).

RESUM DELS RESULTATS

La majoria d'assajos descrits per a la determinació de l'activitat CDasa i S1PL impedeixen l'aplicació de procediments HTS. Tenint en compte aquesta mancança metodològica, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser determinar l'habilitat de les CDases alcalines per hidrolitzar els substrats fluorogènics RBM14. D'entrada es va determinar l'activitat CDasa en diferents models cel·lulars mesurant la fluorescència alliberada pels substrats RBM14 quan són hidrolitzats. En el cas de les CDases alcalines, es va treballar en microsomes de llisats cel·lulars on les diferents ACERs estaven sobreexpressades o silenciades. Prèviament es van comprovar els fenotips amb anàlisis del mRNA per qPCR, determinant la proteïna per Western Blot i analitzant l'esfingolipidoma per UPLC-TOF.

En primer lloc es va estudiar la capacitat d'hidròlisi dels substrats RBM14 en la línia cel·lular de ratolí MEF que no tenen el gen *ASAH2* que codifica per la NC. Tots els substrats RBM14, sobretot el RBM14C14 i el RBM14C16, van ser hidrolitzats tant en llisats a pH bàsic com en cèl·lules intactes.

Seguidament es van preparar microsomes de la línia cel·lular HCT116 que havia estat transfectada de manera estable amb un shRNA contra l'ACER3. Es van detectar activitats enzimàtiques més baixes amb el RBM14C10, RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16 en les cèl·lules silenciades respecte a les control. Per confirmar la hidròlisi dels compostos RBM14 per part de l'ACER3 també es va fer l'assaig en cèl·lules HEK293T que sobreexpressaven aquesta CDasa. En aquest cas es va observar una activitat enzimàtica més elevada amb els compostos RBM14C10, RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16 en les cèl·lules que sobreexpressaven l'ACER3, en comparació amb les cèl·lules control que havien estat tractades únicament amb l'agent de transfecció. En analitzar els microsomes de les cèl·lules HeLa ACER2-TET-ON i ACER1-TET-ON que sobreexpressaven l'ACER2 i l'ACER1 respectivament en presència de tetraciclina, no s'observà diferència en l'activitat enzimàtica emprant els compostos RBM14C10, RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16.

En la determinació de l'activitat S1PL també es reflecteixen les mancances metodològiques observades en el cas de les CDases. Tot i que s'han descrit múltiples aproximacions per determinar la seva activitat enzimàtica, en la majoria d'elles no és possible aplicar procediments HTS. El substrat fluorogènic RBM13 va suposar una millora en aquest aspecte, però no es pot utilitzar en cèl·lules intactes a causa de que no pot travessar la membrana plasmàtica. Amb l'objectiu de millorar la incorporació dins les cèl·lules dels substrats fluorogènics RBM13, i els seus anàlegs millorats RBM77 i RBM148, es va decidir encapsular els compostos en liposomes catiònics. El gen *Sgpl1* de ratolí que codifica per la S1PL es va sobreexpressar en cèl·lules HEK293T i aquestes es van incubar amb els substrats lliures i encapsulats en liposomes catiònics. Es van provar diferents concentracions dels substrats RBM13, RBM77 i RBM148 encapsulats en liposomes. Després de 3 h d'incubació es va mesurar la fluorescència de la umbel·liferona alliberada. En les incubacions realitzades amb els substrats lliures, sense ser encapsulats, no s'observà fluorescència ja que no poden travessar la membrana cel·lular. No obstant, una

vegada encapsulats es va detectar fluorescència i aquesta va resultar ser dependent de la concentració dels liposomes i, tal com s'esperava, era més elevada en les cèl·lules que sobreexpressaven la S1PL en comparació amb les cèl·lules només tractades amb l'agent de transfecció (control). En comparació amb el RBM13, els substrats RBM77 i sobretot el RBM148 van ser una millora en termes de sensibilitat amb una senyal més elevada. També es va verificar la utilitat del RBM148 encapsulat en liposomes com a substrat de S1PL en les cèl·lules MEF que no sobreexpressaven l'enzim. La fluorescència era específica ja que era més elevada en les cèl·lules SGPL1^{+/+} que les SGPL1^{+/-} i no es va detectar senyal en les SGPL1^{-/-}. Degut a que l'aplicació principal dels substrats fluorogènics era descobrir nous inhibidors selectius de la S1PL, es va comprovar l'eficiència de la metodologia emprant el substrat RBM148 encapsulat en liposomes amb els inhibidors 3c i els compostos 87 i 89, que van resultar actius en les cèl·lules HEK293T i MEF.

Finalment l'últim objectiu plantejat tracta d'esbrinar la relació existent entre els enzims del metabolisme dels esfingolípid, els seus productes i l'autofàgia. Concretament es va aprofundir en les dhCer i la seva implicació en el destí cel·lular, ja sigui la mort o la supervivència. Es va examinar la capacitat de diferents inhibidors de Des1 (CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462) per acumular dhCer, estimular l'autofàgia i el seu efecte en la viabilitat cel·lular en dues línies de glioma humà, les T98G i les U87MG.

En primer lloc es va comprovar analitzant la composició dels esfingolípid per UPLC-TOF, que en les cèl·lules T98G i U87MG el tractament amb CCX, PXD, RV i γ -TE a una concentració pròxima a la IC₂₅ durant 24 h provocava un increment de dihidroesfingolípid, sobretot de dhCer. La determinació de l'activitat Des1 es va dur a terme per HPLC acoblada a un detector de fluorescència tant en llistats cel·lulars com en cèl·lules intactes després de ser incubades amb els compostos, i es va observar que tots els compostos causaven una reducció de l'activitat Des1. Com a control positiu d'inhibició directa de Des1 es va utilitzar el compost XM462. Es van analitzar els nivells relatius de mRNA de Des1 i d'altres transcrits involucrats en la via de biosíntesi *de novo* de la Cer per qPCR. Tots els compostos provocaven un augment de l'expressió d'enzims de la via, com és el cas de la SPT o les CerS. D'altra banda, únicament el γ -TE va modificar els nivells de mRNA de Des1.

Per valorar l'impacte que aquests compostos tenien sobre la resta del lipidoma de les cèl·lules de glioma T98G es realitzà una anàlisi per quimiometria dels cromatogrames obtinguts per UPLC-TOF, d'extractes lipídics de cèl·lules tractades amb el CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462. S'emprà les eines MCR-ALS (resolució de corbes per mínims quadrats alternats) per resoldre grups de dades que coelueixen i PLS-DA (anàlisi discriminant amb mínims parcials quadrats) per a la identificació de possibles biomarcadors. Els resultats obtinguts van indicar que, a més de variacions en el contingut cel·lular dels dihidroesfingolípid comentat prèviament, es va observar en els tractaments amb els compostos, un increment de la quantitat de fosfolípid, si bé amb una disminució relativa de fosfolípid que contenen grups acil poliinsaturats.

Per contra, només en el cas dels tractaments amb PXD i RV es va obtenir un augment dels triacilglicerols (TAG).

Les anàlisis de Western Blot van mostrar que en les cèl·lules tractades amb els compostos en les mateixes condicions en les que s'havia analitzat l'esfingolipidoma, hi havia un increment dels nivells de LC3-II i p62 respecte els controls. Aquest increment s'intensificava en presència d'inhibidors de proteases. També es va demostrar la capacitat dels compostos per induir autofàgia analitzant per immunoflorescència la formació dels autofagosomes.

Amb l'objectiu de corroborar el paper de les dhCer en la inducció d'autofàgia, es va analitzar l'efecte d'inhibir la producció de dhCer sobre els nivells de LC3-II. La incubació amb miriocina (inhibidor de la SPT) va evitar l'acumulació de dhCer, i tot i que es van reduir els nivells de LC3-II, encara hi havia inducció d'autofàgia en absència de dhCer. Així mateix es va detectar inducció d'autofàgia per part dels compostos en el model cel·lular U87DND, una línia cel·lular incapaç d'acumular dhCer. Quan es va silenciar de manera estable el gen *ATG5*, essencial per la inducció d'autofàgia en les U87DND, els compostos eren menys tòxics. A més la toxicitat dels compostos en les U87DND control (sense l'*ATG5* silenciada) disminuïa en afegir dhCer exògenes. Concretament les cèl·lules es van tractar amb PXD en presència o absència de dhCerC8 deuterades (d2dhCerC8), un anàleg de dhCer que al tenir una dessaturació més lenta que la dhCer natural, provoca una acumulació de dhCer.

Per demostrar la hipòtesi de que les dhCer són protectores a través de la inducció d'autofàgia, es van mesurar els nivells de LC3-II en les U87DND incubades amb d2dhCerC8. El tractament amb d2dhCerC8 va provocar un augment dels nivells de LC3-II i aquests incrementaven amb els inhibidors de proteases, indicant l'activació del flux autofàgic. D'altra banda quan es va inhibir l'autofàgia amb 3MA en les cèl·lules U87, amb nivells normals de dhCer, els compostos eren més tòxics.

DISCUSSIÓ

Els esfingolípid, a més de servir com a base estructural de les membranes cel·lulars, regulen múltiples vies de senyalització implicades en diversos processos fisiològics i fisiopatològics, entre ells l'autofàgia. És per això que els enzims del metabolisme dels esfingolípid s'han convertit en prometedores dianes terapèutiques. Entre aquests enzims destaquen la **Des1**, les **CDases** i la **S1PL** que participen directament en el control de l'homeòstasi cel·lular mantenint l'equilibri entre la dhCer, la citotòxica Cer²⁸ i la protectora S1P⁵¹, i per tant tenen un paper clau en la regulació del destí cel·lular cap a supervivència o mort.

Tot i que s'han descrit mètodes per determinar l'activitat CDasa i S1PL, la recerca de nous moduladors enzimàtics a gran escala requereix tècniques HTS. Actualment en la bibliografia aquestes metodologies són escasses. És per aquest motiu que en el primer bloc d'aquesta tesi es valida l'ús de substrats fluorogènics per analitzar l'activitat dels enzims CDasa i S1PL, en el capítols 1 i 2 respectivament.

El paper de l'autofàgia en el destí cel·lular és controvertit. En conseqüència, l'ús d'inductors o inhibidors d'autofàgia per propòsits terapèutics requereix una recerca més exhaustiva a nivell molecular. Així doncs en el segon bloc d'aquesta tesi, en el capítol 3, s'estudia la relació existent entre els dihidroesfingolípid i l'autofàgia, i la seva implicació en el destí cel·lular.

Capítol 1

Determinació de l'activitat ACER3 utilitzant aminodiols fluorogènics cumarínics

Les CDases són amidohidrolases que catalitzen la hidròlisi de les Cer o dhCer per generar un àcid gras i So o Sa, respectivament. Existeixen cinc CDases humanes codificades per cinc gens diferents. Segons els seu pH òptim d'activitat es poden classificar en àcida (AC), neutra (NC) i tres alcalines (ACER1, ACER2 i ACER3). Cada CDasa té una distribució en teixits, localització subcel·lular i especificitat de substrat diferent.

Degut a la validació de les CDases com a dianes terapèutiques s'ha impulsat el desenvolupament de noves metodologies per determinar la seva activitat enzimàtica. Inicialment es van desenvolupar com a substrats de les CDases, Cer marcades radioactivament¹¹⁵ o unides a fluoròfors, com NBD¹¹⁶, BODIPY¹¹⁷, lisaminarodamina¹¹⁷ o Nile Red²⁵⁴. Malgrat l'avantatge d'aquests substrats fluorescents sobre els mètodes radioactius, no són metodologies aptes per aproximacions HTS. Per contra, els substrats fluorogènics si que ho són, ja que no requereixen separació cromatogràfica. El nostre grup va descriure la síntesi i aplicació dels substrats fluorogènics RBM14 per determinar l'activitat CDasa¹²¹. Els RBM14 són anàlegs cumarínics de Cer amb diferents longituds de la cadena alifàtica. Els RBM14 són hidrolitzats per les CDases i el grup aminodiol resultant s'oxida químicament a un aldehyd. Seguidament una β -eliminació espontània fa que s'alliberi la umbel·liferona fluorescent.

Els compostos RBM14 van ser descrits inicialment com a substrats de l'AC. La finalitat d'aquest primer capítol és determinar si les ACERs també tenen l'habilitat per hidrolitzar els substrats fluorogènics RBM14.

Per assolir aquest objectiu, es van utilitzar diferents línies cel·lulars on les ACERs estaven sobreexpressades o silenciades. Prèviament es van comprovar els fenotips amb anàlisis del mRNA per qPCR, determinant la proteïna per Western Blot i analitzant l'esfingolipidoma per UPLC-TOF. Primerament es va treballar amb la línia cel·lular de fibroblasts de ratolí MEF que no tenen el gen *ASAH2* que codifica per la NC (^{-/-}MEF). Tots els substrats RBM14, sobretot el RBM14C14 i el RBM14C16, van ser hidrolitzats tant en llistats a pH bàsic com en cèl·lules intactes. Això suggereix que com a mínim una de les tres ACERs és capaç d'hidrolitzar els substrats RBM14. Quan es van analitzar els nivells de mRNA de les ACERs en les cèl·lules ^{-/-}MEF, es va observar la presència gairebé exclusiva de l'ACER3. Corroborant aquesta característica, s'ha descrit que l'ACER3 és la CDasa alcalina més activa en una gran varietat de models cel·lulars i es troba altament expressada en cèl·lules de fibroblast¹¹⁴.

Seguidament es van preparar microsomes de la línia cel·lular HCT116 que havia estat transfectada de manera estable amb un shRNA contra l'ACER3. Tal com s'esperava, en comparació amb les cèl·lules control, les HCT116 shACER3 tenien uns nivells de So i Sa més baixos. Respecte als nivells de Cer, no mostraven un augment molt elevat respecte al control, però sí que es veien augmentats els nivells d'esfingolípid més complexos derivats de la Cer com les GlcCer i les LacCer. Això s'explicaria pel fet que, per evitar acumular Cer citotòxiques, s'incrementa el metabolisme d'aquestes molècules cap a lípids complexos. Es van detectar nivells més baixos de fluorescència amb el RBM14C10, RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16 en microsomes de cèl·lules HCT116 shACER3 respecte al control. Els resultats suggereixen que l'ACER3 és capaç d'hidrolitzar els substrats RBM14. Per corroborar-ho també es va fer l'assaig en cèl·lules HEK293T que sobreexpressaven l'ACER3. Es va alliberar una fluorescència més elevada dels compostos RBM14C10, RBM14C12, RBM14C14 i RBM14C16 en les cèl·lules que sobreexpressaven l'ACER3, en comparació amb les cèl·lules control que havien estat tractades únicament amb l'agent de transfecció. Per tant aquesta diferència d'activitat ens demostra que l'ACER3 és capaç d'hidrolitzar els substrats RBM14.

En incubar els compostos RBM14 amb els microsomes de les cèl·lules HeLa ACER2-TET-ON i ACER1-TET-ON que sobreexpressaven l'ACER2 i l'ACER1 respectivament, es va detectar menys fluorescència respecte als controls en presència de tetraciclina. Això indica que aquestes ACERs no tenen la capacitat d'hidrolitzar els substrats RBM14. El fet de que els nivells de fluorescència disminuïssin, podria indicar que la sobreexpressió de l'ACER1 o l'ACER2 provoca una davallada de l'activitat d'altres CDases. Tenint en compte que l'assaig es fa a pH bàsic i que l'ACER3 hidrolitza els RBM14, seria aquesta CDasa la que estaria alterada. Tot i que s'ha descrit que el *knockdown* d'ACER3 provoca un augment en l'expressió d'ACER2¹¹⁴,

no s'ha publicat que la sobreexpressió d'una ACER afecti l'expressió d'una altra CDasa. A més, l'anàlisi dels nivells de mRNA per qPCR no mostren una disminució de l'expressió d'ACER3 en les HeLa TET-ON ACER1 o en les HeLa TET-ON ACER2 (resultats no mostrats). Una possibilitat és que hi hagi una inhibició de l'enzim, provocat per l'excés de So/Sa generat en sobreexpressar l'ACER1 o l'ACER2. En tot cas, els resultats indiquen que ni l'ACER1 ni l'ACER2 poden hidrolitzar els substrats RBM14.

La incapacitat d'hidrolitzar els RBM14 per part de l'ACER1 i l'ACER2 es podria explicar per la seva restrictiva especificitat de substrat. Mentre que l'ACER3 pot hidrolitzar amb la mateixa eficiència Cer, dhCer i fitoceramides¹¹⁴; l'ACER1 i l'ACER2 són més selectives per la base esfingoide⁹¹ i utilitzen preferentment les Cer com a substrat¹¹¹. Tenint en compte que els compostos RBM14 presenten una modificació en la cadena esfingoide, potser és suficient per alterar la seva afinitat per l'enzim. Una altra possibilitat, en relació a la longitud de la cadena alifàtica del RBM14, és que l'ACER1 i l'ACER2 tenen preferència per Cer de cadena molt llargues (>C18)^{109,112}, mentre que l'ACER3 prefereix Cer de cadena llarga, però no de cadena molt llarga¹¹⁴, i per tant explicaria perquè l'ACER3 té més afinitat pels substrats RBM14 (C10-C16). Resultats no publicats del grup emprant nous compostos RBM14 (RBM14C18:1, RBM14C22:1 i RBM14C24:1) corroboren que l'ACER3 no té afinitat per Cer de cadena alifàtica tant llarga. En comparació amb el RBM14C16, la hidròlisi d'aquests nous substrats va ser menor. No obstant, tot i que l'ACER1 i l'ACER2 si que tenen preferència per Cer de cadena molt llarga, els nous compostos RBM14 tampoc van resultar ser bons substrats per aquestes CDases.

En resum, a més de l'AC i la NC, de totes les CDases alcalines, s'ha demostrat que només l'ACER3, i no l'ACER1 ni l'ACER2, pot hidrolitzar els substrats RBM14, preferentment de cadena llarga. Malgrat que la selectivitat dels substrats per les CDases pot dependre de la longitud de la cadena alifàtica, cap RBM14 va presentar especificitat per un enzim en particular. Tot i la manca d'especificitat, els substrats RBM14 són una eina prometedora per l'aplicació de tècniques HTS destinades a la recerca de nous inhibidors selectius d'ACER3, que actualment no se'n coneix cap.

Capítol 2

Determinació de l'activitat S1PL en cèl·lules intactes utilitzant sensors fluorogènics encapsulats en liposomes catiónics

La S1PL és un enzim dependent de piridoxal 5'-fosfat clau en el metabolisme dels esfingolípids que catalitza la degradació irreversible de S1P i dhS1P a hexadecenal o hexadecanal, respectivament, i PEA. El paper clau de la S1P en la supervivència cel·lular, obra una línia de recerca per intentar trobar inhibidors de la S1PL que permetin augmentar els nivells de S1P intracel·lulars. Per tal d'aconseguir aquest objectiu és imprescindible el desenvolupament de tècniques HTS per mesurar l'activitat S1PL.

S'han descrit diverses metodologies per mesurar l'activitat S1PL utilitzant substrats radioactius¹²⁷, fluorescents^{140,141} o mesurant per GC/MS o LC/MS derivats dels aldehids formats^{142,143,255,256}. Cada assaig té els seus avantatges i inconvenients, però en general són metodologies laborioses, cares i que no permeten aproximacions HTS. En un treball previ del nostre grup es va descriure un anàleg cumarínic de la dhS1P com a substrat de la S1PL, el RBM13¹⁴⁴. Una vegada la S1PL catalitza la degradació del substrat, l'aldehid cumarínic resultant pateix una β -eliminació espontània a pH neutre o alcalí que fa que s'alliberi el producte fluorescent, la umbel·liferona. El gran avantatge d'aquest assaig és que no necessita separació de productes, i per tant permet realitzar assajos HTS. El RBM13 va suposar una millora en aquest aspecte, però la seva incapacitat per travessar la membrana plasmàtica impedeix el seu ús en estudis amb cèl·lules vives. L'objectiu plantejat és millorar la incorporació dels substrats fluorogènics RBM13, i els seus anàlegs millorats RBM77 i RBM148, dins la cèl·lula per poder analitzar l'activitat enzimàtica de la S1PL en cèl·lules intactes.

Inicialment, es va descriure el compost RBM13¹⁴⁴ que és hidrolitzat per la S1PL recombinant bacteriana i humana²⁵⁶, i és bon substrat en llistats cel·lulars¹⁴⁴. No obstant, els seus paràmetres cinètics per la S1PL són modestos. Es va suggerir que anàlegs del RBM13 en què l'anell de cumarina es trobés més lluny del lloc d'acció de la S1PL podrien ser millors substrats que el RBM13. En base a aquesta hipòtesi, es van sintetitzar i caracteritzar bioquímicament les sondes RBM77 i RBM148. Aquests nous compostos van demostrar ser bon substrats de la hS1PL. Els paràmetres cinètics van millorar respecte el RBM13 amb unes V_{max} més elevades, sobretot amb el RBM148, i amb unes K_M menors, especialment amb el compost RBM77. En general, en termes de la relació V_{max}/K_M , el RBM77 era el millor substrat, amb una relació V_{max}/K_M quasi 40 vegades més alta que el RBM13. Finalment els valors de IC_{50} pel control positiu d'inhibició de la S1PL $3c$ ²⁵⁷, utilitzant el RBM77 i RBM148 com a substrats, van ser comparables amb els valors obtinguts amb el RBM13. Aquests resultats confirmen la fiabilitat dels nous substrats fluorogènics de la S1PL.

Degut a que la S1PL és un enzim amb una expressió relativament baixa en condicions normals, va sorgir la necessitat de trobar un model cel·lular on l'enzim es trobés expressat en nivells adequats per poder analitzar de manera correcta la seva activitat enzimàtica. Es va decidir intentar sobreexpressar el gen *Sgp11* de ratolí que codifica per la S1PL en les línies cel·lulars HEK293T, T98G i HeLa, però únicament les cèl·lules HEK293T van ser transfectades amb èxit en les condicions utilitzades, i per tant va ser aquesta la línia cel·lular escollida per continuar amb els futurs experiments.

Una vegada es va verificar la sobreexpressió de la S1PL en les cèl·lules HEK293T, els compostos RBM13 i els seus anàlegs RBM77 i RBM148 es van provar en llistats cel·lulars com a substrats fluorogènics. Tal com passava en els estudis amb la hS1PL, les sondes RBM77 i, sobretot RBM148 van resultar ser millors substrats que el RBM13, obtenint una senyal de fluorescència més elevada respecte la senyal basal. A més amb el nous substrats fluorogènics va ser possible mesurar l'activitat S1PL en llistats

de cèl·lules que no sobreexpressaven l'enzim. Es va estudiar la hidròlisi del RBM13 i del RBM148 en les cèl·lules de fibroblasts de ratolí MEF $SGPL1^{+/+}$, $SGPL1^{+/-}$ i $SGPL1^{-/-}$. Tal com s'esperava, emprant el substrat RBM148, es va observar més fluorescència en les $SGPL1^{+/+}$ que les $SGPL1^{+/-}$, i no es va detectar senyal en les $SGPL1^{-/-}$. Aquests resultats demostren que en termes de sensibilitat el RBM148 és el millor substrat, ja que amb el RBM13, en les condicions emprades, només es va detectar la seva hidròlisi en llistats de les cèl·lules $SGPL1^{+/+}$.

El grup fosfat present en els compostos RBM13, RBM77 i RBM148, i les seves estructures lipídiques, obstaculitzen la seva difusió a través de la membrana plasmàtica. Això impedeix l'ús dels substrats per mesurar l'activitat S1PL en cèl·lules intactes. Per tal d'evitar aquest inconvenient, es va decidir que l'encapsulació en liposomes catiònics podria ser una alternativa adequada.

La formulació dels liposomes va consistir en una barreja 1:1 de PC i DOTAP, on aquest darrer aporta la càrrega neta positiva²³⁵. Aquests liposomes catiònics són atrets per les càrregues negatives de la membrana cel·lular i són transferits posteriorment als compartiments endosomals. Una vegada en l'endosoma, a causa de la repulsió entre càrregues, les membranes es desestabilitzen, es trenquen i s'allibera el contingut del liposoma en el citoplasma²⁴³.

Es va decidir utilitzar la tècnica de deshidratació i hidratació per la preparació dels liposomes. L'aparença de les vesícules es veurà influenciada per la seva composició, concentració, temperatura i sonicació. Degut a que és pràcticament impossible reproduir les condicions de sonicació, és molt difícil obtenir liposomes idèntics cada vegada que es prepara un nova dissolució de substrat encapsulat. A més degut a que el grau de curvatura de les membranes dels liposomes és molt elevat, són estructures inestables que poden tornar a fusionar-se de manera espontània generant vesícules més grans durant llargs períodes de emmagatzematge²³⁸.

La quantitat de producte encapsulat juntament amb la mida de la vesícula, són les dues consideracions més importants en la caracterització d'un liposoma com a portador de molècules. En aquest cas es van generar liposomes amb un diàmetre entre 100 i 200 nm, és a dir vesícules SUV²³⁹. La quantitat de substrat dins de la vesícula és defineix com EE. La determinació de l'EE requereix la separació dels liposomes del substrat no encapsulat. Degut a que la ultracentrifugació és incapaç de sedimentar liposomes menors de 200 nm de diàmetre, es va escollir la ultrafiltració centrífuga com a metodologia de separació de liposomes²⁵⁸. Aquesta tècnica es basa en el principi en que el substrat no encapsulat travessa el filtre, mentre que els liposomes amb un diàmetre major que el porus del filtre, es queden retinguts. L'inconvenient d'utilitzar la tècnica de deshidratació i hidratació per la preparació dels liposomes és la seva baixa EE i l'alta heterogeneïtat de mida de les vesícules obtingudes. Una EE reduïda és un dels majors obstacles per aconseguir l'èxit en l'aplicació dels liposomes com a transportadors de molècules. En el nostre cas l'EE calculada pels substrats fluorogènics va ser al voltant de 65%. Tenint en compte que

quan més petita és la mida dels liposomes menor és la seva EE, l'eficiència obtinguda és satisfactòria.

El gen *Sgpl1* de ratolí que codifica per la S1PL es va sobreexpressar en cèl·lules HEK293T i es van incubar amb els substrats lliures i encapsulats en liposomes. Es van provar diferents dilucions d'una solució de liposomes 3.5 mM de lípid total generats a partir d'unes solucions 1 o 2 mM de RBM13, RBM77 i RBM148. Prèviament es va comprovar la citotoxicitat dels liposomes, i es va decidir que la màxima concentració emprada de liposomes fos 1 mM, i per consegüent 0.58 mM de substrat. En les incubacions realitzades amb els substrats lliures, sense ser encapsulats, no s'observà fluorescència ja que no podien travessar la membrana cel·lular. No obstant, una vegada encapsulats es va detectar fluorescència i aquesta va resultar ser dependent de la concentració dels liposomes i, tal com s'esperava, era més elevada en les cèl·lules que sobreexpressaven la S1PL. Això demostra que un cop encapsulats els substrats en liposomes catiònics, poden ser alliberats a dins la cèl·lula, interactuar amb l'enzim S1PL i finalment ser hidrolitzats i alliberar umbel·liferona fluorescent. De la mateixa manera que passava també en llistats cel·lulars, amb el substrat RBM148 s'obtenen valors de fluorescència més elevats. També es va verificar la utilitat del RBM148 encapsulat en liposomes com a substrat de S1PL en les cèl·lules MEF que no sobreexpressen l'enzim. En comparació amb el substrat lliure que no es va detectar fluorescència, amb els liposomes catiònics, el substrat va ser hidrolitzat per la S1PL. La fluorescència era específica ja que era més elevada en les cèl·lules *SGPL1^{+/+}* que les *SGPL1^{+/-}*, i no es va detectar senyal en les *SGPL1^{-/-}*.

A diferència del RBM13 i RBM148, amb el substrat RBM77, l'alliberació de la umbel·liferona requereix l'ús d'una dissolució de KOH en lloc del tampó glicina utilitzat amb els altres substrats. Aquest requisit dificultava la mesura de l'activitat en cèl·lules vives, ja que aquestes condicions alcalines afectaven l'estabilitat cel·lular i no permetien una lectura òptima de la fluorescència. Per aquest motiu, tot i no assolir els màxims de fluorescència que es podien obtenir amb el RBM77, es va utilitzar el tampó glicina per alliberar la umbel·liferona. Tenint en compte les limitacions del RBM77, el millor substrat fluorogènic per mesurar l'activitat S1PL en cèl·lules intactes és el RBM148.

El reactiu de transfecció escollit per la sobreexpressió de la S1PL va ser la Lipofectamina 2000[®]. Es tracta d'un lípid catiònic que forma complexos amb les molècules d'àcids nucleics carregades negativament perquè puguin superar la repulsió electrostàtica de la membrana plasmàtica i internar-se dins la cèl·lula. Per descartar que la incorporació dels substrats fos degut a la presència de la Lipofectamina 2000[®], es va analitzar l'activitat S1PL en cèl·lules HEK293T amb o sense l'agent de transfecció. No es va observar diferències en la fluorescència i per tant es confirma que la Lipofectamina 2000[®] no actua com a portador del substrat.

Tot i que no tot el substrat estigui encapsulat, els liposomes també poden ajudar a permeabilitzar la membrana plasmàtica. S'ha descrit que els liposomes a part de ser

endocitats, també poden fusionar-se amb la membrana plasmàtica formant part de l'estructura cel·lular. En aquestes regions on es troben els lípids del liposoma la membrana és més fluida que la resta de membrana plasmàtica, i per tant pot ajudar a la difusió de molècules a dins la cèl·lula²⁵⁹. Per tal de rebutjar aquesta hipòtesi es van incubar juntament liposomes buits i substrat lliure. No es va observar fluorescència i per tant es demostra que la incorporació del substrat dins del liposoma és indispensable pel seu transport a l'interior cel·lular.

La permeabilitat de la membrana plasmàtica al RBM148 encapsulat en liposomes es va determinar per UPLC-TOF. Després de l'extracció lipídica es va quantificar el RBM148, la seva forma desfosforilada, RBM148(-P), i la umbel·liferona. Els liposomes en HBSS van resultar ser força estables, però en presència de cèl·lules, la major part de la sonda es troba en la seva forma desfosforilada. Malauradament, sense el fosfat el compost deixa d'actuar com a substrat de la S1PL. No obstant, en l'interior cel·lular es va detectar RBM148, demostrant que l'encapsulació en liposomes ha permès la incorporació del substrat dins la cèl·lula. La umbel·liferona degut a la seva capacitat de travessar la membrana plasmàtica, va ser detectada únicament en l'espai extracel·lular. A més, els nivells d'umbel·liferona més elevats van coincidir en les cèl·lules on la S1PL estava sobreexpressada.

L'aplicació principal dels substrats fluorogènics encapsulats en liposomes és la recerca de nous inhibidors enzimàtics en cèl·lules intactes. Es va comprovar l'eficiència de la metodologia amb l'inhibidor 3c, que va resultar actiu en les cèl·lules HEK293T. Seguidament també es va determinar l'efecte dels inhibidors 89 i 87, molècules anàlogues a la S1P i So respectivament, que tenen un grup azido enlloc del grup amino natural²⁵⁶, en les cèl·lules SGPL1^{+/+}. Ambdós compostos van resultar ser inhibidors de la S1PL en cèl·lules intactes.

En definitiva aquests resultats demostren la validació dels substrats fluorogènics encapsulats en liposomes com a una nova metodologia per analitzar l'activitat S1PL compatible amb les aproximacions HTS. En comparació amb el RBM13, el RBM77 i sobretot el RBM148 van resultar ser una millora en termes de sensibilitat amb una senyal de fluorescència més elevada, sent el RBM148 el substrat més idoni per tal de determinar l'activitat S1PL en cèl·lules intactes.

Capítol 3

Validació del paper de les dhCer en la inducció d'autofàgia i la seva repercussió en el destí cel·lular

La Des1 és l'últim enzim de la via de biosíntesi *de novo* de la Cer i catalitza la inserció d'un doble enllaç en la dhCer. Gràcies a estudis on l'activitat de Des1 es troba reduïda, ja sigui utilitzant models cel·lulars *knockout* pel gen *DES1*²⁶⁰ o inhibidors farmacològics de l'enzim⁴⁴, s'ha demostrat el paper de les dhCer en múltiples processos cel·lulars.

L'autofàgia va ser una de les primeres respostes biològiques assignades a les dhCer³⁹, però la seva implicació en la mort cel·lular o en la supervivència continua sent controvertida. Són pocs els estudis que descriuen la repercussió de l'augment de dhCer en el destí cel·lular. En algun d'ells es descriu que les dhCer afavoreixen la supervivència cel·lular contra agents citotòxics⁴³, mentre que en altres treballs l'acumulació de dhCer comporta la mort. Per exemple, emprant diferents models cel·lulars, el CCX⁴⁹, γ -TE⁸⁵ i THC⁴⁶ han demostrat induir autofàgia citotòxica per un increment de dhCer.

Davant la disparitat d'informació sobre el paper de les dhCer en l'autofàgia, els resultats presentats en el capítol 3 es plantegen amb l'objectiu d'establir una correlació entre els nivells de dhCer, la inducció d'autofàgia i el destí cel·lular. Per aconseguir aquest objectiu, es van utilitzar compostos i eines farmacològiques que havien demostrat disminuir l'activitat Des1 i estaven descrits com inductors d'autofàgia. Aquest estudi es va dur a terme en col·laboració amb la Yadira Ordóñez emprant les línies cel·lulars de glioma humà T98G i U87MG. Els compostos estudiats van ser el CCX, PXD, RV, γ -T, γ -TE i l'inhibidor directe de Des1 XM462.

Diversos fàrmacs i productes naturals han resultat ser inhibidors de Des1 i inductors d'autofàgia, com és el cas dels compostos estudiats en aquest capítol. Tot i que s'ha descrit que el CCX⁴⁹, RV⁴⁴, γ -T⁸⁴, γ -TE⁸⁵ augmenten els nivells de dhCer, la seva capacitat per inhibir Des1 no ha estat examinada per assajos enzimàtics, excepte amb el CCX. Aquests estudis suggereixen una relació entre l'autofàgia induïda pels compostos i la inhibició de Des1, però aquesta connexió no ha estat investigada en profunditat. El PXD és un anàleg de la genisteïna, una isoflavona descrita com a inductora d'autofàgia²⁶¹. No obstant, la capacitat d'induir autofàgia per part del PXD no ha estat investigada. A més, tot i que la seva estructura fenòlica fa pensar que podria ser un inhibidor de Des1⁶⁷, tampoc s'ha estudiat aquest efecte. Finalment, es va utilitzar com a control positiu d'inhibició enzimàtica el XM462, un inhibidor directe de Des1 que provoca una acumulació intracel·lular de dhCer⁸⁹. Juntament amb el GT11 va ser dissenyat de manera racional per actuar específicament en el centre actiu de Des1⁸⁷, i ambdós són utilitzats per esbrinar les funcions biològiques de les dhCer^{43,44}.

L'elecció de les línies cel·lulars és un primer pas crític en qualsevol projecte d'investigació. En el procés d'elecció es va treballar amb diversos models cel·lulars humans tumorals de càncer de mama, les MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468, i de glioma, les T98G i U87MG. En base a la hipòtesi plantejada l'objectiu era trobar línies cel·lulars on els compostos estudiats causessin acumulació de dhCer i inducció d'autofàgia, per tal de poder investigar la relació entre els dos processos.

El primer que es va observar és que el CCX, PXD i RV afectaven la viabilitat cel·lular de manera similar en totes les línies cel·lulars estudiades, sent el CCX el producte que presentava una toxicitat més elevada. No obstant, la disminució de la viabilitat cel·lular no sempre implica toxicitat, sinó que podria tractar-se d'una disminució de la proliferació, és a dir, alteració del cicle cel·lular. L'aturada del cicle cel·lular és un

mecanisme que en condicions no aptes per la proliferació pot augmentar l'índex de supervivència. És per això que va estretament lligat a l'autofàgia. En efecte, en totes les línies cel·lulars estudiades, exceptuant algunes condicions puntuals, els compostos van induir aturada del cicle cel·lular. En base a la hipòtesi de que el CCX, PXD i RV són inhibidors de Des1, aquests resultats concorden amb l'efecte descrit de les dhCer en inhibir el cicle cel·lular⁴⁷.

Coincidint amb que les línies de càncer de mama eren més sensibles al CCX, PXD i RV que les de glioma, es va detectar inducció d'apoptosi en les MCF-7 i MDA-MB-231 després d'una incubació amb els compostos. L'efecte del RV i el CCX en l'activació de l'apoptosi ja havia estat descrit en altres línies cel·lulars tot i que no estava relacionat amb l'acumulació de dhCer^{169,216}. Generalment l'autofàgia i l'apoptosi són mecanismes excloents¹⁶⁸, malgrat que en algunes condicions particulars, formen part del mateix procés cel·lular. La prolongació d'un estímul autofàgic pot acabar en mort apoptòtica⁸³. En conseqüència no es va detectar activació del flux d'autofàgia amb cap compost en les cèl·lules de càncer de mama. En les cèl·lules MDA-MB-468 els compostos estudiats aturaven el cicle cel·lular però no activaven ni l'apoptosi ni l'autofàgia en les condicions treballades. Cal destacar que en les línies de càncer de mama, l'acumulació de dhCer deguda a la inhibició de Des1 va ser molt més atenuada en comparació amb les cèl·lules de glioma. Segurament aquest el motiu per el qual el CCX, PXD i RV no van induir autofàgia en les cèl·lules MCF-7, MDA-MB-231 i MDA-MB-468. Tenint en compte els resultats exposats i en base a la hipòtesi plantejada, es va decidir seguir la investigació únicament amb les línies de glioma T98G i U87MG.

L'enzim Des1, com altres dessaturases, per exercir la seva acció catalítica requereix poder reductor NAD(P)H i una cadena de transport d'electrons amb l'oxigen com a acceptor final⁶⁹. És degut a aquesta dependència, que les ROS inhibeixen de manera indirecta Des1 alterant l'estat redox. Per exemple, el tractament amb H₂O₂, amb la conseqüent generació de ROS, incrementa els nivells de dhCer degut a una forta inhibició de l'enzim Des1⁷¹. A part de l'estrès oxidatiu, també s'ha descrit la inhibició de Des1 per part d'antioxidants com el RV⁴⁴ o el glutatió²⁶². Això implica que no només la inducció de ROS, sinó qualsevol canvi en l'estat redox cel·lular, pot modular l'activitat Des1⁷¹.

El RV actua com un *scavenger* de radicals lliures, com l'hidroxil ([•]OH) o el superòxid ([•]O₂⁻), i també com a un potent antioxidant per la seva capacitat de promoure l'activitat de diversos enzims antioxidants²⁶³. Les isoflavones també són capaces de neutralitzar radicals lliures. Entre les isoflavones, la genisteïna (anàleg natural del PXD) té la major capacitat antioxidant. La genisteïna tal com passa amb el RV, elimina radicals lliures nocius però també incrementa l'activitat dels enzims antioxidants²⁶⁴. L'objectiu d'aquests enzims com ara la superòxid dismutasa (SOD), catalasa, NADPH oxidasa, glutatió reductasa i glutatió peroxidasa, és protegir les cèl·lules contra els efectes nocius de les ROS. L'habilitat dels polifenols (com el RV i el PXD) per actuar com a antioxidants depèn de les propietats redox dels seus grups hidroxil i del seu potencial de deslocalització electrònica²¹³.

En les línies cel·lulars T98G i U87MG tal com s'esperava degut a la seva naturalesa antioxidant, el RV i el PXD, i no el CCX, redueixen els nivells de ROS generades amb la incubació amb H₂O₂. Amb l'objectiu d'estudiar l'efecte de ROS sobre l'activitat Des1, es van analitzar els nivells de dhCer en presència de H₂O₂ com agent oxidant juntament amb PXD o CCX. Només es van analitzar les dhCer, ja que a temps tant curts d'incubació (1 h), no es van apreciar diferències en la resta d'esfingolípids més complexes. En vista dels resultats presentats, sembla que l'augment de ROS i l'acumulació de dhCer poden ser processos independents (figura 41). Tant la generació de ROS (H₂O₂), la reducció de ROS (PXD i RV) o el fet de no alterar l'estat oxidatiu (CCX), provocaven un augment dels nivells de dhCer. Això suggereix que la via per la qual H₂O₂ inhibeix Des1 és independent de la via per la qual ho fan el PXD, RV i CCX. Per aquesta raó al incubar juntament PXD amb H₂O₂ i CCX amb H₂O₂ es va observar un augment de dhCer més elevat que els tractaments per separat.

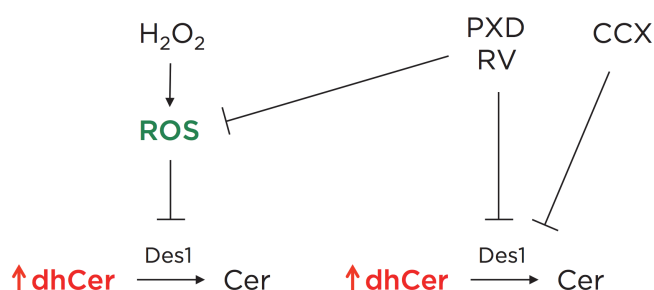


Figura 41. Mecanisme d'acció hipotètic de CCX, PXD, RV i ROS en la inhibició de Des1

El PXD paral·lelament de la inhibició sobre Des1 redueix les ROS i per tant disminueix l'efecte de H₂O₂ sobre Des1. D'altra banda el CCX al no intervenir en el procés oxidatiu, en el tractament amb H₂O₂ es va aconseguir acumular dhCer per les dues vies, a través de les ROS (H₂O₂) i la via independent de ROS (CCX). És per aquest motiu que en incubar PXD amb H₂O₂ els nivells de dhCer no van ser tant elevats com amb la incubació de H₂O₂ amb CCX.

Tal com indicava la hipòtesi, tots els DIPACS estudiats, exceptuant el γ -T, provocaven una acumulació de dihidroesfingolípids, sobretot dhCer en les cèl·lules de T98G i U87MG. Tot i que els resultats suggereixen una inhibició de Des1, només amb el CCX està descrita l'acció sobre Des1 mitjançant assajos enzimàtics, amb una IC₅₀ al voltant de 80 μ M⁴⁹. L'assaig enzimàtic de Des1 va mostrar que el CCX, PXD i RV reduïen l'activitat Des1 en llistats cel·lulars i en cèl·lules intactes sense alterar l'expressió gènica de *DES1*. En les condicions emprades, els DIPACS no alteraven l'activitat d'altres enzims clau del metabolisme dels esfingolípids, com ara les CDases o la S1PL (resultats no mostrats). Això demostra que aquests compostos actuen de manera directa sobre l'enzim o bé interactuant amb la cadena de transport d'electrons associada a Des1⁶⁷. D'altra banda el γ -TE només va reduir l'activitat Des1 en cèl·lules intactes alterant la seva expressió gènica. En analitzar altres transcrits involucrats en la via de biosíntesi de novo de la Cer, es va observar que el CCX, PXD, RV i γ -TE provocaven un augment de l'expressió d'altres enzims de la via com la SPT

o les CerS. Aquests resultats demostren que els DIPACS provocaven un augment de dhCer tant per la inhibició de Des1 com per l'estimulació de la via de biosíntesi *de novo* dels esfingolípid.

Per valorar l'impacte que els DIPACS tenien sobre la resta del lipidoma es realitzà una anàlisi per quimiometria dels cromatogrames obtinguts per UPLC-TOF, d'extractes lipídics de cèl·lules T98G tractades amb el CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462. S'emprà les eines MCR-ALS²⁶⁵ per resoldre grups de dades que coelueixen i PLS-DA per a la identificació de possibles biomarcadors²⁶⁶. Com era d'esperar, entre els lípids alterats pels tractaments, es van observar modificacions en els esfingolípid. En concret, es va observar un augment en els nivells de dihidroesfingolípid i/o una disminució dels esfingolípid insaturats, que confirma l'efecte inhibitori dels compostos estudiats sobre Des1. A més d'aquestes variacions en el contingut cel·lular dels esfingolípid, es va observar en els tractaments amb CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 un increment de la quantitat de fosfolípid, si bé amb una disminució relativa de fosfolípid que contenen grups acil poliinsaturats. Finalment, només en el cas dels tractaments amb PXD i RV es va observar un augment dels TAG.

En els humans existeixen tres dessaturases d'àcids grassos, $\Delta 9$ o estearoil-CoA dessaturasa, $\Delta 6$ i $\Delta 5$ ²⁶⁷. Aquestes dessaturases introdueixen un doble enllaç en posicions específiques dels àcids grassos, en C9, C6 i C5 respectivament. Els resultats obtinguts en l'anàlisi quimiomètric suggereixen una inhibició per part dels DIPACS de les dessaturases d'àcids grassos. Recolzant aquesta hipòtesi, es coneix que el RV i la genisteïna (anàleg natural del PXD) inhibeixen l'expressió gènica de la estearoil-CoA dessaturasa^{268,269}. Aquests enzims, tal com passa amb la Des1, depenen de la cadena de transport d'electrons, són modulables per l'estat redox cel·lular⁶⁷ i per tant també són susceptibles a la inhibició pels compostos estudiats.

Tot i que les dhCer inicialment es van considerar intermediaris de les Cer, actualment són moltes les evidències que demostren que són elements clau per diverses vies de senyalització cel·lular, entre elles l'autofàgia. Mesurar els nivells d'expressió de la proteïna LC3 segueix sent el principal mètode per estudiar l'autofàgia. Tot i que la LC3-I es troba en el citosol, la forma LC3-II està associada als autofagosomes, per la qual cosa és un indicador de la iniciació de l'autofàgia²⁷⁰. Generalment la determinació dels nivells de LC3-II es realitza per Western Blot. Els nivells de LC3-I en general es mantenen estables durant l'autofàgia, ara bé, poden disminuir si la lipidació a LC3-II és excessiva o el reciclatge de la LC3-II per acció de l'Atg4 no és suficient. Els nivells de la LC3-II tampoc són constants durant el procés de l'autofàgia. Si bé en la iniciació del procés la LC3-II s'acumula en els autofagosomes, al final en el lisosoma es degrada juntament amb el contingut de la vesícula. És per això que per determinar de manera correcta els nivells d'autofàgia és imprescindible l'ús d'inhibidors de la degradació lisosomal²⁷¹. Si en presència d'inhibidors de proteases, els nivells de LC3-II augmenten respecte l'absència dels inhibidors, es pot afirmar que existeix una inducció del flux d'autofàgia. Ara bé, si el flux autofàgic està inhibit, els nivells de LC3-II no augmentaran tot i el bloqueig lisosomal.

El receptor p62 es pot utilitzar també per determinar l'autofàgia. La proteïna p62 pot estar present en la seva forma soluble en el citosol o associada a proteïnes marcades amb ubiquitina. Per tant no només és específica de l'autofàgia, sinó també de la degradació de proteïnes en els proteosomes. Així i tot, si es vol mesurar per determinar el flux autofàgic, és imprescindible l'ús d'inhibidors lisosomals per evitar la seva degradació. Existeixen altres mètodes independents de Western Blot per analitzar l'autofàgia. La visualització dels autofagosomes per immunodetecció de la LC3 (LC3 puncta) en cèl·lules fixades o en teixits, és un mètode altament utilitzat tot i que cada vegada menys acceptat. El motiu determinant és que la quantificació dels nivells de LC3 estàtics com analitzar l'autofàgia per LC3 puncta, és una determinació incompleta i errònia del procés autofàgic.

En les mateixes condicions en que el CCX, PXD, RV i γ -TE disminueixen l'activitat Des1 amb la consegüent acumulació de dhCer, es va detectar activació del flux autofàgic en les cèl·lules de glioma T98G i U87MG. Aquest flux d'autofàgia es pot observar en l'acumulació de LC3-II i p62 que s'incrementa en presència d'inhibidors de proteases, i en la formació d'autofagosomes (LC3 puncta). Resultats similars, és a dir augment de dhCer i inducció d'autofàgia, es van obtenir amb el control positiu d'inhibició de Des1 XM462. A més, el γ -T no va induir autofàgia, com tampoc era capaç d'inhibir Des1 i promoure l'acumulació de dhCer. Aquests resultats recolzen que les dhCer participen en la inducció del flux d'autofàgia.

El tractament amb miriocina (inhibidor de la SPT), al bloquejar el primer pas de la biosíntesi *de novo* de la Cer, evita l'acumulació de dhCer per part dels DIPACS. Amb la incubació amb miriocina, tot i que es van reduir els nivells de LC3-II, encara hi havia inducció d'autofàgia en absència de dhCer. Aquest no és el cas del CCX, que la incubació amb miriocina evita l'acumulació de dhCer, però en canvi no afecta a la inducció d'autofàgia. També es va treballar amb la línia cel·lular U87DND, unes cèl·lules incapaces d'acumular dhCer degut a la baixa expressió de diversos enzims de la via de la biosíntesi *de novo* dels esfingolípid. El CCX, PXD, RV i γ -TE també activaven l'autofàgia en aquesta línia cel·lular. Aquestes dues aproximacions experimentals demostren que els DIPACS són capaços d'estimular l'autofàgia independentment de la generació de dhCer i per tant que les dhCer no són un requisit estrictament necessari per la inducció d'autofàgia.

Amb l'objectiu d'estudiar el destí de les cèl·lules en autofàgia, es va silenciar de manera estable el gen *ATG5*, necessari per la inducció d'autofàgia, en les cèl·lules U87DND (U87DND-shAtg5). Tot i l'existència d'una via alternativa d'autofàgia independent d'Atg5 i Atg7¹⁵⁹, l'abordatge més correcte per demostrar el paper de l'autofàgia en un determinat procés cel·lular és el silenciament d'aquests gens. Diversos estudis mostren les dificultats associades en inhibir la Beclin 1 i els reptes que suposa interpretar els resultats. La Beclin 1 presenta efectes paradoxals en l'autofàgia ja que tot i ser una coneguda inductora d'autofàgia, la seva interacció amb Bcl-2 provoca la inhibició de la fusió entre l'autofagosoma i el lisosoma, i per tant provoca una aturada del procés autofàgic²⁷². Degut als efectes contradictoris de

Beclin 1, es va decidir silenciar de manera estable l'ATG5. Es va comprovar el fenotip de la línia U87DND-shAtg5 analitzant per Western Blot el flux de LC3-II. Es va detectar una disminució de l'autofàgia en comparació amb el control (U87DND-shC) tot i que encara hi havia una autofàgia basal. Això pot ser degut a que el silenciament gènic no és complet i encara hi ha una mínima expressió d'ATG5, però també podria ser degut a una activació de l'autofàgia alternativa¹⁵⁹.

En relació al destí cel·lular, el CCX, PXD i RV van resultar ser menys tòxics en les cèl·lules U87DND-shAtg5. Això suggereix que la via d'inducció d'autofàgia independent de dhCer és citotòxica. Altrament, la sensibilitat de les U87DND-shC i les U87DND-shAtg5 al γ -TE va ser similar, això implica que en les condicions emprades, la toxicitat del γ -TE no està relacionada amb la inducció d'autofàgia independent de dhCer. Corroborant el paper citoprotector de les dhCer, la toxicitat del PXD en les cèl·lules U87DND-shC va disminuir en afegir precursors de dhCer exògens (d2dhCer8). Aquest efecte però, no es va observar en les cèl·lules U87DND-shAtg5 on l'autofàgia està inhibida. Per demostrar la hipòtesi de que les dhCer són protectores a través de la inducció d'autofàgia, es va comprovar que les d2dhCer8 activaven el flux autofàgic en les cèl·lules U87DND. Això explica perquè les d2dhCer8 no alteren la viabilitat cel·lular en les cèl·lules U87DND-shAtg5, ja que no és possible activar l'autofàgia protectora.

D'altra banda quan es va inhibir l'autofàgia amb 3MA en les cèl·lules U87MG, cèl·lules amb la capacitat d'acumular dhCer, els DIPACS eren més tòxics. Aquest resultat recolza que la via d'inducció d'autofàgia dependent de dhCer és un mecanisme de supervivència cel·lular. Les limitacions de la 3MA en inhibir l'autofàgia són conegudes²⁷³. La 3MA principalment és un inhibidor de les cinases PI3KC3 com Vps34, que indueix l'autofàgia a través del complex amb Beclin 1, i per tant inhibidors de PI3KC3 com la 3MA suprimeixen l'autofàgia. No obstant, també s'ha descrit que la 3MA pot inhibir les cinases PI3KC1²⁷⁴. La via de regulació PI3KC1/Akt/mTOR és la principal via d'inhibició de l'autofàgia i com a conseqüència de la inhibició de la PI3KC1, es promou l'autofàgia (figura 42).

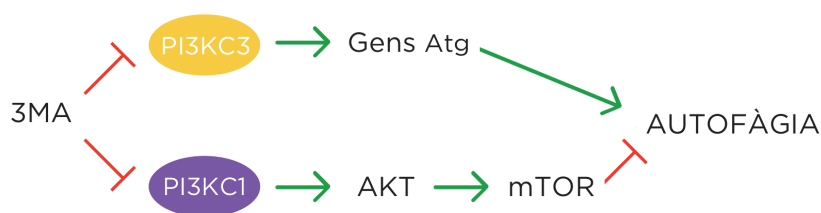


Figura 42. Efecte dual de la 3MA en l'autofàgia

A més les cinases PI3KC3 també regulen altres processos com l'endocitosis²⁷⁵. És per això que la 3MA no afecta específicament l'autofàgia. A més, la via alternativa d'autofàgia és independent de Vps34, i per tant insensible a la 3MA. En base aquesta informació, seria adequat corroborar els resultats obtinguts amb la 3MA en cèl·lules

U87MG que tinguin silenciats de manera estable algun gen essencial per la inducció d'autofàgia com *ATG5* o *ATG7*.

Amb relació a l'efecte dels DIPACS sobre la viabilitat cel·lular, existeixen diferències entre els compostos, malgrat tots ells induïxen una acumulació de dhCer. Una possibilitat és que aquestes diferències podrien dependre de les espècies de dhCer *N*-acilades generades en resposta al tractament de cada compost. En el cas dels compostos menys tòxics, el PXD i el RV, s'observa una preferència per l'acumulació de dhCer C24:0. En canvi, el γ -TE i el CCX que presenten una toxicitat més elevada, provoquen una acumulació més abundant de dhCer C16 i C24:1. Això suggereix que les dhCer C24:0 tenen un paper citoprotector en les cèl·lules de glioma, malgrat que s'ha descrit que un increment selectiu de dhCer C22:0 i C24:0 induïxen autofàgia citotòxica en línies cel·lulars de leucèmia limfoblàstica aguda de cèl·lules T⁴⁸.

Una altra possibilitat per explicar les diferències en la toxicitat dels DIPACS és que el destí cel·lular de l'autofàgia depengui de la relació dhCer/Cer enlloc de l'augment absolut dels nivells de dhCer. El PXD i RV, que són els compostos menys tòxics, en les cèl·lules U87MG provocaven una disminució de la relació dhCer/Cer per les espècies de cadena curta (sobretot dhCer/Cer C18), en comparació amb el γ -TE i el CCX, que presenten una toxicitat més elevada. Aquesta teoria recentment ha explicat els efectes observats amb l'inhibidor de Des1 THC⁴⁶.

Els mecanismes moleculars implicats en la inducció d'autofàgia pels DIPACS no ha estat objecte d'estudi en aquesta tesi. No obstant, si que gràcies als resultats obtinguts, es pot afirmar que existeix una via d'inducció d'autofàgia dependent de l'acumulació de dhCer i una altra via alternativa independent de dhCer. Possiblement la via dependent de dhCer està implicada en l'estrès del ER⁴³. Les dhCer, com les Cer, es generen en el ER, i increments en la relació dhCer/Cer en aquest orgànu, fa que augmenti la rigidesa de la seva membrana i s'alteri la seva funcionalitat. Això pot arribar a desencadenar l'estrès del ER. La resposta UPR és la principal via de senyalització de l'estrès del ER. La UPR, com el seu nom indica, s'activa en resposta a una acumulació de proteïnes mal plegades o desplegadas en el lumen del ER. L'activació d'aquesta via té dos objectius ben diferenciats: activar la via de producció de xaperones involucrades en el correcte plegament de les proteïnes; o per altra banda si no s'aconsegueix el primer propòsit, o l'anomalia persisteix, la UPR és un potent estímul d'autofàgia. Les tres vies de senyalització que conformen la UPR estan iniciades per tres proteïnes associades a la membrana del ER: PERK ("PKR-like eIF2 α quinase"), ATF6 (activador del factor de transcripció 6) i IRE1 ("inositol requiring enzyme 1"), totes tres es troben normalment inactivades per la xaperona BiP. Al ésser reclamades per la UPR, PERK i ATF6 s'alliberen de BiP, s'activen i actuen com a inductors d'autofàgia. Per contra, IRE1 actua com a regulador negatiu de l'autofàgia. La forma activa de PERK activa la transcripció de LC3 i Atg5²⁷⁶ i induïx positivament el factor de transcripció NF- κ B que entre altres proteïnes regula la Beclin 1, inductora d'autofàgia¹⁸⁰. Encara que l'objectiu predominant de l'estrès del ER és la inducció de l'autofàgia, més que la seva inhibició, és possible que IRE1 actuï

per esmorteir l'autofàgia excessiva per acció de la via PERK o ATF6. Una altra via d'activació de l'autofàgia dependent de dhCer podria ser la via que inclou les proteïnes PI3KC1/Akt/mTOR. Es coneix que la Cer és un supressor d'Akt i per tant interfereix en la via de senyalització de PI3KC1/Akt/mTOR amb la conseqüent inducció d'autofàgia¹⁶³. No obstant, en el mateix estudi van descriure que aquest mecanisme activat per les Cer C2 no s'activava amb les dhCer C2¹⁶³.

Els resultats obtinguts amb la incubació dels DIPACS amb la miriocina i els assajos en les cèl·lules U87DND demostren l'existència d'una via d'inducció d'autofàgia independent de dhCer. Juntament amb la via PI3KC1/Akt/mTOR, la via AMPK és el principal mecanisme de regulació de l'autofàgia. L'activació d'AMPK està generalment controlada per la CaMKK ("Ca²⁺ calmodulin dependent kinase kinase"), una cinasa dependent de calci²⁷⁷. El Ca²⁺ és un potent ió de senyalització intracel·lular que exerceix un paper essencial en múltiples processos, com per exemple l'autofàgia. Es pot estimular l'autofàgia a través d'un increment de la concentració de Ca²⁺ en el citosol que resulta en l'activació de CaMKK²⁷⁸. En relació al possible mecanisme dels DIPACS en l'autofàgia, s'ha demostrat que el RV indueix autofàgia a través de l'augment de Ca²⁺ intracel·lular que comporta l'activació de CaMKK, AMPK i per tant la conseqüent activació d'autofàgia²⁷⁹. També s'ha descrit que el CCX incrementa l'alliberació de Ca²⁺ del ER en cèl·lules de càncer de pròstata²⁸⁰ i per tant podria induir l'autofàgia a través d'aquesta via.

Un altre mecanisme per el qual els DIPACS podrien activar l'autofàgia independentment de la generació de dhCer està relacionat amb els nivells de ROS intracel·lulars. Les ROS regulen l'autofàgia a través de mecanismes transcripcionals. En certes condicions com l'escassetat de nutrients i la hipòxia, les ROS es poden acumular i estimular factors de transcripció que regulen gens de proteïnes autofàgiques com per exemple LC3 o p62²⁸¹. Aquest podria ser el cas del CCX, degut a la seva capacitat de generar ROS²⁸². També és el cas del RV, que a part de la seva acció antioxidant, pot provocar l'acumulació de ROS en funció de la concentració i tipus cel·lular²⁸³. Un antioxidant no és sinó un agent redox (reducció/oxidació) i per tant pot també actuar com a oxidant en certes condicions²¹³.

En resum, en aquest capítol s'han presentat evidències experimentals que demostren que en les línies cel·lulars de glioma T98G i U87MG, el CCX, PDX, RV, γ -TE i XM462 indueixen l'autofàgia simultàniament a l'acumulació de dhCer a causa de l'estimulació de la biosíntesi *de novo* de les Cer i la disminució de l'activitat Des1. No obstant, l'activació de l'autofàgia per part dels DIPACS també s'indueix en condicions on no augmenten els nivells de dhCer. Aquest fet indica que altres factors a més de les dhCer estan implicats en l'activació de l'autofàgia provocada pels inhibidors de Des1. En base dels resultats presentats en aquesta tesi i de la literatura existent, proposem que els inhibidors de Des1 estudiats indueixen ambdues vies d'inducció d'autofàgia dependent i independent de dhCer, i és l'equilibri entre elles el que influeix en el destí cel·lular, sent l'autofàgia dependent de dhCer una via de supervivència cel·lular (figura 43).

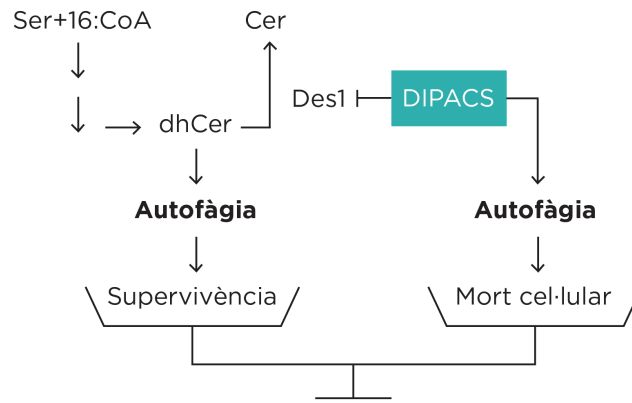


Figura 43. Mecanisme d'acció hipotètic dels compostos estudiats en aquesta tesi (DIPACS) en l'autofàgia i la seva repercussió en el destí cel·lular

El fet que la inducció de l'autofàgia comporti la mort o la supervivència de la cèl·lula després d'una exposició amb els inhibidors de Des1 probablement dependrà del tipus de cèl·lula, del context cel·lular, de l'agent desencadenant i/o de la presència o absència de dianes en la via de senyalització²⁸⁴. En la via dependent de dhCer també influirà la localització subcel·lular de les dhCer, la composició de la seva cadena de l'àcid gras i possiblement la relació entre les espècies de dhCer i Cer (dhCer/Cer).

Rellevància de l'estudi

La validació dels esfingolípids com a reguladors de múltiples vies de senyalització cel·lular ha impulsat la recerca sobre els enzims implicats en el seu metabolisme. En els dos primers capítols d'aquesta tesi s'han presentat noves metodologies per estudiar els enzims CDasa i S1PL. Els resultats posen en relleu la utilitat dels substrats fluorogènics RBM14 i RBM148 en assajos HTS. Aquesta aplicació és útil pel diagnòstic de patologies associades a aquests enzims, i també per a la identificació de nous inhibidors selectius que podrien portar al descobriment de futurs fàrmacs.

Múltiples evidències indiquen l'existència d'una relació entre el metabolisme dels esfingolípids i l'autofàgia. No obstant el paper de l'autofàgia en el destí cel·lular segueix sent incert, i per tant és necessari estudiar en profunditat els mecanismes moleculars implicats en el procés per tal de poder implantar l'ús de moduladors de l'autofàgia en la teràpia. En el capítol 3 d'aquesta tesi s'ha demostrat la implicació de les dhCer en la inducció de l'autofàgia citoprotectora per part de compostos inhibidors de l'enzim Des1. És per això que la capacitat de les cèl·lules per biosintetitzar dhCer s'ha de tenir en compte en les teràpies emprant moduladors d'autofàgia. En definitiva els resultats presentats en aquesta tesi recolzen la concepció dels enzims del metabolisme dels esfingolípids com a dianes terapèutiques. Ja sigui gràcies al desenvolupament de noves metodologies que permetin la identificació de nous inhibidors enzimàtics selectius, com per la demostració de la seva implicació en el destí cel·lular de l'autofàgia.

CONCLUSIONS

A continuació es descriuen les conclusions extretes dels diferents estudis que s'han presentat en els capítols d'aquesta tesi:

Capítol 1

Determinació de l'activitat ACER3 utilitzant aminodiols fluorogènics cumarínics

- 1** A part de l'AC i la NC, els compostos RBM14 són substrats de l'ACER3, però no són hidrolitzats per les CDases alcalines ACER1 i ACER2
- 2** Els substrats RBM14 de cadena llarga, sobretot el RBM14C16, són els millors substrats per l'ACER3
- 3** Malgrat que la selectivitat dels substrats per les CDases pot dependre de la longitud de la cadena alifàtica, cap RBM14 presenta especificitat per una CDasa en particular
- 4** Els substrats RBM14 són una eina prometedora adaptable a formats HTS destinats al diagnòstic d'activitats CDasa anòmales i a la recerca de moduladors enzimàtics de l'AC, la NC i l'ACER3

Capítol 2

Determinació de l'activitat S1PL en cèl·lules intactes utilitzant sensors fluorogènics encapsulats en liposomes catiónics

- 1** En termes de sensibilitat i en base als paràmetres cinètics V_{max} i K_M , els nous sensors RBM77 i RBM148 són millors substrats per a l'enzim S1PL que el seu predecessor RBM13
- 2** Gràcies a l'encapsulació dels substrats RBM13, RBM77 i RBM148 en liposomes catiónics, s'aconsegueix la seva incorporació a través de la membrana plasmàtica i estan disponibles per ser substrats de la S1PL en cèl·lules intactes
- 3** Tenint en compte les limitacions del compost RBM77, en referència a la necessitat d'utilitzar una dissolució etanòlica de KOH per tal d'obtenir la màxima formació d'umbel·liferona a partir de l'aldehid que es genera, el millor substrat fluorogènic per mesurar l'activitat S1PL en cèl·lules intactes és el RBM148
- 4** L'ús de substrats fluorogènics encapsulats en liposomes catiónics és una metodologia adaptable a formats HTS destinats a la identificació de nous inhibidors selectius de la S1PL en cèl·lules intactes

Capítol 3

Paper de les dhCer en la inducció d'autofàgia i en el destí cel·lular

- 1** Els compostos CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462, però no el γ -T, produeixen una acumulació de dihidroesfingolípids, sobretot dhCer, mitjançant la inhibició de l'enzim Des1 juntament amb l'estimulació de la biosíntesi *de novo* de la Cer en les línies cel·lulars T98G i U87MG
- 2** Els compostos CCX, PXD, RV i XM462, en les cèl·lules T98G i U87MG, inhibeixen la Des1 actuant de manera directa sobre l'enzim o bé interactuant amb la cadena de transport d'electrons associada a la Des1. D'altra banda el γ -TE inhibeix Des1 alterant l'expressió gènica de l'enzim
- 3** El CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 produeixen una disminució relativa de fosfolípids que contenen grups acil poliinsaturats, suggerint la inhibició de la dessaturació d'àcids grassos en la línia cel·lular T98G
- 4** Els compostos CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462, però no el γ -T, indueixen el flux d'autofàgia en les línies cel·lulars T98G i U87MG. L'activació d'autofàgia en les cèl·lules U87DND, incapaces d'acumular dhCer degut a la baixa expressió de diversos enzims de la via de la biosíntesi *de novo* dels esfingolípids, demostra que les dhCer no són un requisit imprescindible per a la inducció d'autofàgia
- 5** Els compostos CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 activen l'autofàgia dependent i independent de dhCer en les línies cel·lulars T98G i U87MG
- 6** La via d'autofàgia dependent de dhCer induïda pels compostos CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 és un mecanisme de supervivència cel·lular
- 7** La via d'autofàgia independent de dhCer induïda pels compostos CCX, PXD i RV provoca la mort cel·lular. Per contra, en la citotoxicitat del γ -TE no participa l'autofàgia independent de dhCer en les condicions experimentals emprades
- 8** Proposem que els compostos CCX, PXD, RV, γ -TE i XM462 activen les vies d'inducció d'autofàgia dependent i independent de dhCer, i és l'equilibri entre elles el que condiciona el destí cel·lular. Altres factors implicats són el tipus i el context cel·lular, l'agent desencadenant i/o la presència de dianes en la via de senyalització. En la via dependent de dhCer també influirà la localització subcel·lular de les dhCer, la composició de la seva cadena alifàtica i possiblement la relació entre dhCer/Cer

BIBLIOGRAFIA

- 1 Thudichum J. *A treatise on the chemical constitution of the brain*. Bailliere Tindall and Cox: London, 1884.
- 2 Futerman AH, Hannun YA. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep* 2004; 5: 777-82.
- 3 Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 139-50.
- 4 Merrill AH. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem Rev* 2011; 111: 6387-422.
- 5 Merrill AH. De novo sphingolipid biosynthesis: a necessary, but dangerous, pathway. *J Biol Chem* 2002; 277: 25843-6.
- 6 Zhao L, Spassieva S, Gable K, Gupta SD, Shi LY, Wang J, Bielawski J, Hicks WL, Krebs MP, Naggert J, Hannun YA, Dunn TM, Nishina PM. Elevation of 20-carbon long chain bases due to a mutation in serine palmitoyltransferase small subunit b results in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci* 2015; 112: 12962-7.
- 7 Pewzner-Jung Y, Ben-Dor S, Futerman AH. When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J Biol Chem* 2006; 281: 25001-5.
- 8 Yamaji T, Kumagai K, Tomishige N, Hanada K. Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life* 2008; 60: 511-8.
- 9 Tafesse FG, Ternes P, Holthuis JCM. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J Biol Chem* 2006; 281: 29421-5.
- 10 Jeckel D, Karrenbauer A, Burger KN, van Meer G, Wieland F. Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J Cell Biol* 1992; 117: 259-67.
- 11 Bornancin F. Ceramide kinase: The first decade. *Cell Signal* 2011; 23: 999-1008.
- 12 Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 2016-26.
- 13 Bandhuvula P, Saba JD. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol Med* 2007; 13: 210-7.
- 14 Marchesini N, Hannun YA. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol* 2004; 82: 27-44.
- 15 Gillard BK, Clement RG, Marcus DM. Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids de novo and recycling pathways. *Glycobiology* 1998; 8:885-90.
- 16 Mencarelli C, Martinez-Martinez P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell Mol Life Sci* 2013; 70: 181-203.
- 17 Morad SAF, Cabot MC. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat Rev Cancer* 2013; 13: 51-65.
- 18 Michel C, van Echten-Deckert G. Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett* 1997; 416: 153-5.
- 19 Fukasawa M, Nishijima M, Hanada K. Genetic evidence for ATP-dependent endoplasmic reticulum-to-Golgi apparatus trafficking of ceramide for sphingomyelin synthesis in Chinese hamster ovary cells. *J Cell Biol* 1999; 144: 673-85.
- 20 Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M, Nishijima M. Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* 2003; 426: 803-9.
- 21 D'Angelo G, Polishchuk E, Di Tullio G, Santoro M, Di Campli A, Godi A, West G, Bielawski J, Chuang CC, van der Spoel AC, Platt FM, Hannun YA, Polishchuk R, Mattjus P, De Matteis MA. Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* 2007; 449: 62-7.

- 22 Eckford PDW, Sharom FJ. The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem J* 2005; 389: 517-26.
- 23 Sugiura M, Kono K, Liu H, Shimizugawa T, Minekura H, Spiegel S, Kohama T. Ceramide kinase, a novel lipid kinase. Molecular cloning and functional characterization. *J Biol Chem* 2002; 277: 23294-300.
- 24 Cocco L, Maraldi NM, Manzoli FA, Gilmour RS, Lang A. Phospholipid interactions in rat liver nuclear matrix. *Biochem Biophys Res Commun* 1980; 96: 890-8.
- 25 Hait NC, Allegood J, Maceyka M, Strub GM, Harikumar KB, Singh SK, Luo C, Marmorstein R, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate. *Science* 2009; 325: 1254-7.
- 26 Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J* 2004; 382: 527-33.
- 27 Rodriguez-Cuenca S, Barbarroja N, Vidal-Puig A. Dihydroceramide desaturase 1, the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1851: 40-50.
- 28 Saddoughi SA, Song P, Ogretmen B. Roles of bioactive sphingolipids in cancer biology and therapeutics. *Subcell Biochem* 2008; 49: 413-40.
- 29 Merrill AH, Sullards MC, Allegood JC, Kelly S, Wang E. Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Methods* 2005; 36: 207-24.
- 30 Cingolani F, Futerman AH, Casas J. Ceramide synthases in biomedical research. *Chem Phys Lipids* 2015; 197: 25-32.
- 31 Grösch S, Schiffmann S, Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog Lipid Res* 2012; 51: 50-62.
- 32 Thevissen K, Francois I, Winderickx J, Pannecouque C, Cammue B. Ceramide Involvement in Apoptosis and Apoptotic Diseases. *Mini-Reviews Med Chem* 2006; 6: 699-709.
- 33 Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 604-16.
- 34 Ogretmen B, Kravetska JM, Schady D, Usta J, Hannun YA, Obeid LM. Molecular mechanisms of ceramide-mediated telomerase inhibition in the A549 human lung adenocarcinoma cell line. *J Biol Chem* 2001; 276: 32506-14.
- 35 Chalfant CE, Rathman K, Pinkerman RL, Wood RE, Obeid LM, Ogretmen B, Hannun YA. De novo ceramide regulates the alternative splicing of caspase 9 and Bcl-x in A549 lung adenocarcinoma cells. Dependence on protein phosphatase-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 12587-95.
- 36 Dbaibo GS, Pushkareva MY, Jayadev S, Schwarz JK, Horowitz JM, Obeid LM, Hannun YA. Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc Natl Acad Sci* 1995; 92: 1347-51.
- 37 Lee JY, Bielawska AE, Obeid LM. Regulation of Cyclin-Dependent Kinase 2 Activity by Ceramide. *Exp Cell Res* 2000; 261: 303-11.
- 38 Stiban J, Fistere D, Colombini M. Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 773-80.
- 39 Zheng W, Kollmeyer J, Symolon H, Momin A, Munter E, Wang E, Kelly S, Allegood JC, Liu Y, Peng Q, Ramaraju H, Sullards MC, Cabot M, Merrill AH. Ceramides and other bioactive sphingolipid backbones in health and disease: Lipidomic analysis, metabolism and roles in membrane structure, dynamics, signaling and autophagy. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1758: 1864-84.

- 40 Hail N, Kim HJ, Lotan R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis* 2006; 11: 1677-94.
- 41 Uyama R, Hong SH, Nakagawa T, Yazawa M, Kadosawa T, Mochizuki M, Tsujimoto H, Nishimura R, Sasaki N. Establishment and characterization of eight feline mammary adenocarcinoma cell lines. *J Vet Med Sci* 2005; 67: 1273-6.
- 42 Siddique MM, Li Y, Chaurasia B, Kaddai VA, Summers SA. Dihydroceramides: From Bit Players to Lead Actors. *J Biol Chem* 2015; 290: 15371-9.
- 43 Gagliostro V, Casas J, Caretti A, Abad JL, Tagliavacca L, Ghidoni R, Fabrias G, Signorelli P. Dihydroceramide delays cell cycle G1/S transition via activation of ER stress and induction of autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2012; 44: 2135-43.
- 44 Signorelli P, Munoz-Olaya JM, Gagliostro V, Casas J, Ghidoni R, Fabriàs G. Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2009; 282: 238-43.
- 45 Noack J, Choi J, Richter K, Kopp-Schneider A, Régnier-Vigouroux A. A sphingosine kinase inhibitor combined with temozolomide induces glioblastoma cell death through accumulation of dihydrosphingosine and dihydroceramide, endoplasmic reticulum stress and autophagy. *Cell Death Dis* 2014; 5: 1-12.
- 46 Hernández-Tiedra S, Fabriàs G, Dávila D, Salanueva ÍJ, Casas J, Montes LR, Antón Z, García-Taboada E, Salazar-Roa M, Lorente M, Nylandsted J, Armstrong J, López-Valero I, McKee CS, Serrano-Puebla A, García-López R, González-Martínez J, Abad JL, Hanada K, Boya P, Goñi F, Guzmán M, Lovat P, Jäättelä M, Alonso A, Velasco G. Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy* 2016; 12: 2213-29.
- 47 Kravetska JM, Li L, Szulc ZM, Bielawski J, Ogretmen B, Hannun YA, Obeid LM, Bielawska A. Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J Biol Chem* 2007; 282: 16718-28.
- 48 Holliday MW, Cox SB, Kang MH, Maurer BJ. C22:0- and C24:0-dihydroceramides confer mixed cytotoxicity in T-cell acute lymphoblastic leukemia cell lines. *PLoS One* 2013; 8: 1-14.
- 49 Schiffmann S, Sandner J, Schmidt R, Birod K, Wobst I, Schmidt H, Angioni C, Geisslinger G, Grösch S. The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis. *J Lipid Res* 2009; 50: 32-40.
- 50 Andreyev AY, Fahy E, Guan Z, Kelly S, Li X, McDonald JG, Milne S, Myers D, Park H, Ryan A, Thompson BM, Wang E, Zhao Y, Brown HA, Merrill AH, Raetz CRH, Russell DW, Subramaniam S, Dennis EA. Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J Lipid Res* 2010; 51: 2785-97.
- 51 Takabe K, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. 'Inside-Out' Signaling of Sphingosine-1-Phosphate: Therapeutic Targets. *Pharmacol Rev* 2008; 60: 181-95.
- 52 Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J Clin Invest* 2000; 106: 951-61.
- 53 Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T, Ghidoni R, Botti J, Codogno P. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* 2006; 281: 8518-27.
- 54 Taha TA, Argraves KM, Obeid LM. Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1682: 48-55.

- 55 Chun J, Hla T, Lynch KR, Spiegel S, Moolenaar WH. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid Receptor Nomenclature. *Pharmacol Rev* 2010; 62: 579–87.
- 56 Rosen H, Gonzalez-Cabrera PJ, Sanna MG, Brown S. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling. *Annu Rev Biochem* 2009; 78: 743–68.
- 57 Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18: 300–7.
- 58 Van Brocklyn JR, Lee MJ, Menzeleev R, Olivera A, Edsall L, Cuvillier O, Thomas DM, Coopman PJ, Thangada S, Liu CH, Hla T, Spiegel S. Dual actions of sphingosine-1-phosphate: extracellular through the Gi-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J Cell Biol* 1998; 142: 229–40.
- 59 Cuvillier O, Levade T. Enzymes of sphingosine metabolism as potential pharmacological targets for therapeutic intervention in cancer. *Pharmacol Res* 2003; 47: 439–45.
- 60 Sugita M, Dulaney JT, Moser HW. Ceramidase deficiency in Farber's disease (lipogranulomatosis). *Science* 1972; 178: 1100–2.
- 61 McGovern MM, Aron A, Brodie SE, Desnick RJ, Wasserstein MP. Natural history of Type A Niemann-Pick disease: Possible endpoints for therapeutic trials. *Neurology* 2006; 66: 228–32.
- 62 Grabowski GA. Gaucher disease and other storage disorders. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr* 2012; 2012: 13–8.
- 63 Pralhada Rao R, Vaidyanathan N, Rengasamy M, Mammen Oommen A, Somaiya N, Jagannath MR. Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human diseases. *J Lipids* 2013; 2013: 1–12.
- 64 Casasampere M, Ordoñez YF, Pou A, Casas J. Inhibitors of dihydroceramide desaturase 1: Therapeutic agents and pharmacological tools to decipher the role of dihydroceramides in cell biology. *Chem Phys Lipids* 2016; 197: 33–44.
- 65 Endo K, Akiyama T, Kobayashi S, Okada M. Degenerative spermatocyte, a novel gene encoding a transmembrane protein required for the initiation of meiosis in *Drosophila* spermatogenesis. *Mol Gen Genet* 1996; 253: 157–65.
- 66 Ternes P, Franke S, Zähringer U, Sperling P, Heinz E. Identification and characterization of a sphingolipid delta 4-desaturase family. *J Biol Chem* 2002; 277: 25512–8.
- 67 Fabrias G, Muñoz-Olaya J, Cingolani F, Signorelli P, Casas J, Gagliostro V, Ghidoni R. Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: Debutant players in the sphingolipid arena. *Prog Lipid Res* 2012; 51: 82–94.
- 68 Beauchamp E, Tekpli X, Marteil G, Lagadic-Gossmann D, Legrand P, Rioux V. N-Myristoylation targets dihydroceramide Δ 4-desaturase 1 to mitochondria: Partial involvement in the apoptotic effect of myristic acid. *Biochimie* 2009; 91: 1411–9.
- 69 Geeraert L, Mannaerts GP, van Veldhoven PP. Conversion of dihydroceramide into ceramide: involvement of a desaturase. *Biochem J* 1997; 327: 125–32.
- 70 Devlin CM, Lahm T, Hubbard WC, Van Demark M, Wang KC, Wu X, Bielawska A, Obeid LM, Ivan M, Petrache I. Dihydroceramide-based response to hypoxia. *J Biol Chem* 2011; 286: 38069–78.
- 71 Idkowiak-Baldys J, Apraiz A, Li L, Rahmaniyan M, Clarke CJ, Kravka JM, Asumendi A, Hannun YA. Dihydroceramide desaturase activity is modulated by oxidative stress. *Biochem J* 2010; 427: 265–74.
- 72 Enomoto A, Omae F, Miyazaki M, Kozutsumi Y, Yubisui T, Suzuki A. Dihydroceramide:sphinganine C-4-hydroxylation requires Des2 hydroxylase and the membrane form of cytochrome b5. *Biochem J* 2006; 397: 289–95.

- 73 Brockman HL, Momsen MM, Brown RE, He L, Chun J, Byun HS, Bittman R. The 4,5-double bond of ceramide regulates its dipole potential, elastic properties, and packing behavior. *Biophys J* 2004; 87: 1722-31.
- 74 Holland WL, Brozinick JT, Wang LP, Hawkins ED, Sargent KM, Liu Y, Narra K, Hoehn KL, Knotts TA, Siesky A, Nelson DH, Karathanasis SK, Fontenot GK, Birnbaum MJ, Summers SA. Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metab* 2007; 5: 167-79.
- 75 Zhang QJ, Holland WL, Wilson L, Tanner JM, Kearns D, Cahoon JM, Pettey D, Losee J, Duncan B, Gale D, Kowalski CA, Deeter N, Nichols A, Deesing M, Arrant C, Ruan T, Boehme C, McCamey DR, Rou J, Ambal K, Narra KK, Summers SA, Abel ED, Symons JD. Ceramide mediates vascular dysfunction in diet-induced obesity by PP2A-mediated dephosphorylation of the eNOS-Akt complex. *Diabetes* 2012; 61: 1848-59.
- 76 Rioux V, Pédrone F, Legrand P. Regulation of mammalian desaturases by myristic acid: N-terminal myristoylation and other modulations. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1811: 1-8.
- 77 Hu W, Ross J, Geng T, Brice SE, Cowart LA. Differential regulation of dihydroceramide desaturase by palmitate versus monounsaturated fatty acids: implications for insulin resistance. *J Biol Chem* 2011; 286: 16596-605.
- 78 Mody N, McIlroy GD. The mechanisms of Fenretinide-mediated anti-cancer activity and prevention of obesity and type-2 diabetes. *Biochem. Pharmacol.* 2014; 91: 277-86.
- 79 Maurer BJ, Melton L, Billups C, Cabot MC, Reynolds CP. Synergistic cytotoxicity in solid tumor cell lines between N-(4-hydroxyphenyl)retinamide and modulators of ceramide metabolism. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92: 1897-909.
- 80 Morales MC, Pérez-Yarza G, Rementería NN, Boyano M-D, Apraiz A, Gómez-Muñoz A, Pérez-Andrés E, Asumendi A. 4-HPR-mediated leukemia cell cytotoxicity is triggered by ceramide-induced mitochondrial oxidative stress and is regulated downstream by Bcl-2. *Free Radic Res* 2007; 41: 591-601.
- 81 Wang H, Maurer BJ, Liu YY, Wang E, Allegood JC, Kelly S, Symolon H, Liu Y, Merrill AH, Rie Gouazé-Andersson V, Yu JY, Giuliano AE, Cabot MC. N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide increases dihydroceramide and synergizes with dimethylsphingosine to enhance cancer cell killing. *Mol Cancer Ther* 2008; 7: 2967-76.
- 82 Rahmaniyan M, Curley RW, Obeid LM, Hannun YA, Kravets JM. Identification of dihydroceramide desaturase as a direct in vitro target for fenretinide. *J Biol Chem* 2011; 286: 24754-64.
- 83 Salazar M, Carracedo A, Salanueva IJ, Hernández-Tiedra S, Lorente M, Egia A, Vázquez P, Blázquez C, Torres S, García S, Nowak J, Fimia GM, Piacentini M, Cecconi F, Pandolfi PP, González-Feria L, Iovanna JL, Guzmán M, Boya P, Velasco G. Cannabinoid action induces autophagy-mediated cell death through stimulation of ER stress in human glioma cells. *J Clin Invest* 2009; 119: 1359-72.
- 84 Jiang Q, Wong J, Fyrist H, Saba JD, Ames BN. Gamma-Tocopherol or combinations of vitamin E forms induce cell death in human prostate cancer cells by interrupting sphingolipid synthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 17825-30.
- 85 Jiang Q, Rao X, Kim CY, Freiser H, Zhang Q, Jiang Z, Li G. Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide. *Int J cancer* 2012; 130: 685-93.
- 86 Cingolani F, Casasampere M, Sanllehi P, Casas J, Bujons J, Fabrias G. Inhibition of dihydroceramide desaturase activity by the sphingosine kinase inhibitor SKI II. *J Lipid Res* 2014; 55: 1711-20.
- 87 Triola G, Fabriàs G, Llebaria A. Synthesis of a Cyclopropene Analogue of Ceramide, a Potent Inhibitor of Dihydroceramide Desaturase. *Angew Chemie Int Ed* 2001; 40: 1960-2.

- 88 Triola G, Fabrias G, Dragusin M, Niederhausen L, Broere R, Llebaria A, van Echten-Deckert G. Specificity of the Dihydroceramide Desaturase Inhibitor N-[(1R,2S)-2-Hydroxy-1-hydroxymethyl-2-(2-tridecyl-1-cyclopropenyl)ethyl] octanamide (GT11) in Primary Cultured Cerebellar Neurons. *Mol Pharmacol* 2004; 66: 1671-8.
- 89 Munoz-Olaya JM, Matabosch X, Bedia C, Egido-Gabás M, Casas J, Llebaria A, Delgado A, Fabriàs G. Synthesis and biological activity of a novel inhibitor of dihydroceramide desaturase. *ChemMedChem* 2008; 3: 946-53.
- 90 Tani M, Igarashi Y, Ito M. Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu. *J Biol Chem* 2005; 280: 36592-600.
- 91 Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta* 2008; 1781: 424-34.
- 92 Mao C, Xu R, Bielawska A, Obeid LM. Cloning of an Alkaline Ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 2000; 275: 6876-84.
- 93 Koch J, Gartner S, Li CM, Quintern LE, Bernardo K, Levran O, Schnabel D, Desnick RJ, Schuchman EH, Sandhoff K. Molecular Cloning and Characterization of a Full-length Complementary DNA Encoding Human Acid Ceramidase. *J Biol Chem* 1996; 271: 33110-5.
- 94 Momoi T, Ben-Yoseph Y, Nadler HL. Substrate-specificities of acid and alkaline ceramidases in fibroblasts from patients with Farber disease and controls. *Biochem J* 1982; 205: 419-25.
- 95 Mao Z, Sun W, Xu R, Novgorodov S, Szulc ZM, Bielawski J, Obeid LM, Mao C. Alkaline ceramidase 2 (ACER2) and its product dihydrosphingosine mediate the cytotoxicity of N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide in tumor cells. *J Biol Chem* 2010; 285: 29078-90.
- 96 He X, Okino N, Dhami R, Dagan A, Gatt S, Schulze H, Sandhoff K, Schuchman EH. Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase. Catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase. *J Biol Chem* 2003; 278: 32978-86.
- 97 Chavez JA, Holland WL, Bär J, Sandhoff K, Summers SA. Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. *J Biol Chem* 2005; 280: 20148-53.
- 98 Huang Y, Tanimukai H, Liu F, Iqbal K, Grundke-Iqbal I, Gong CX. Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain. *Eur J Neurosci* 2004; 20: 3489-97.
- 99 Saad AF, Meacham WD, Bai A, Anelli V, Elojeimy S, Mahdy AEM, Turner LS, Cheng J, Bielawska A, Bielawski J, Keane TE, Obeid LM, Hannun YA, Norris JS, Liu X. The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer Biol Ther* 2007; 6: 1455-60.
- 100 Elojeimy S, Liu X, Mckillop JC, El-Zawahry AM, Holman DH, Cheng JY, Meacham WD, Mahdy AE, Saad AF, Turner LS, Cheng J, Day TA, Dong JY, Bielawska A, Hannun YA, Norris JS. Role of Acid Ceramidase in Resistance to FasL: Therapeutic Approaches Based on Acid Ceramidase Inhibitors and FasL Gene Therapy. *Mol Ther* 2007; 15: 1259-63.
- 101 Musumarra G, Barresi V, Condorelli DF, Scirè S. A Bioinformatic Approach to the Identification of Candidate Genes for the Development of New Cancer Diagnostics. *Biol Chem* 2003; 384: 321-7.
- 102 Eliyahu E, Park JH, Shtraizent N, He X, Schuchman EH. Acid ceramidase is a novel factor required for early embryo survival. *FASEB J* 2007; 21: 1403-9.
- 103 Tani M, Iida H, Ito M. O-glycosylation of mucin-like domain retains the neutral ceramidase on the plasma membranes as a type II integral membrane protein. *J Biol Chem* 2003; 278: 10523-30.

- 104 El Bawab S, Bielawska A, Hannun YA. Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *J Biol Chem* 1999; 274: 27948-55.
- 105 El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ, Hannun YA. Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem* 2000; 275: 21508-13.
- 106 Yoshimura Y, Tani M, Okino N, Iida H, Ito M. Molecular cloning and functional analysis of zebrafish neutral ceramidase. *J Biol Chem* 2004; 279: 44012-22.
- 107 Kono M, Dreier JL, Ellis JM, Allende ML, Kalkofen DN, Sanders KM, Bielawski J, Bielawska A, Hannun YA, Proia RL. Neutral ceramidase encoded by the Asah2 gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids. *J Biol Chem* 2006; 281: 7324-31.
- 108 Choi MS, Anderson MA, Zhang Z, Zimonjic DB, Popescu N, Mukherjee AB. Neutral ceramidase gene: role in regulating ceramide-induced apoptosis. *Gene* 2003; 315: 113-22.
- 109 Sun W, Xu R, Hu W, Jin J, Crellin HA, Bielawski J, Szulc ZM, Thiers BH, Obeid LM, Mao C. Upregulation of the Human Alkaline Ceramidase 1 and Acid Ceramidase Mediates Calcium-Induced Differentiation of Epidermal Keratinocytes. *J Invest Dermatol* 2007; 128: 389-97.
- 110 Houben E, Holleran WM, Yaginuma T, Mao C, Obeid LM, Rogiers V, Takagi Y, Elias PM, Uchida Y. Differentiation-associated expression of ceramidase isoforms in cultured keratinocytes and epidermis. *J Lipid Res* 2006; 47: 1063-70.
- 111 Xu R. Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J* 2006; 20: 1813-25.
- 112 Sun W, Jin J, Xu R, Hu W, Szulc ZM, Bielawski J, Obeid LM, Mao C. Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *J Biol Chem* 2010; 285: 8995-9007.
- 113 Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawska A, Galadari SH, Obeid LM. Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem* 2001; 276: 26577-88.
- 114 Hu W, Xu R, Sun W, Szulc ZM, Bielawski J, Obeid LM, Mao C. Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis. *J Biol Chem* 2010; 285: 7964-76.
- 115 Nikolova-Karakashian M, Merrill AH. Ceramidases. *Methods Enzymol* 2000; 311: 194-201.
- 116 Tani M, Okino N, Mitsutake S, Ito M. Specific and Sensitive Assay for Alkaline and Neutral Ceramidases Involving C12-NBD-Ceramide 1. *J Biochem* 1999; 125: 746-9.
- 117 He X, Li CM, Park JH, Dagan A, Gatt S, Schuchman EH. A Fluorescence-Based High-Performance Liquid Chromatographic Assay to Determine Acid Ceramidase Activity. *Anal Biochem* 1999; 274: 264-9.
- 118 He X, Dagan A, Gatt S, Schuchman EH. Simultaneous quantitative analysis of ceramide and sphingosine in mouse blood by naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde derivatization after hydrolysis with ceramidase. *Anal Biochem* 2005; 340: 113-22.
- 119 Nieuwenhuizen WF, Leeuwen S van, Götz F, Egmond MR. Synthesis of a novel fluorescent ceramide analogue and its use in the characterization of recombinant ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa* PA01. *Chem Phys Lipids* 2002; 114: 181-91.
- 120 Bhabak KP, Hauser A, Redmer S, Banhart S, Heuer D, Arenz C. Development of a novel FRET probe for the real-time determination of ceramidase activity. *Chembiochem* 2013; 14: 1049-52.
- 121 Bedia C, Casas J, Garcia V, Levade T, Fabriàs G. Synthesis of a novel ceramide analogue and its use in a high-throughput fluorogenic assay for ceramidases. *Chembiochem* 2007; 8: 642-8.

- 122 Bedia C, Camacho L, Abad JL, Fabriàs G, Levade T. A simple fluorogenic method for determination of acid ceramidase activity and diagnosis of Farber disease. *J Lipid Res* 2010; 51: 3542-7.
- 123 Saba JD, Nara F, Bielawska A, Garrett S, Hannun YA. The BST1 Gene of *Saccharomyces cerevisiae* encodes the Sphingosine-1-phosphate Lyase. *J Biol Chem* 1997; 272: 26087-90.
- 124 Kumar A, Byun HS, Bittman R, Saba JD. The sphingolipid degradation product trans-2-hexadecenal induces cytoskeletal reorganization and apoptosis in a JNK-dependent manner. *Cell Signal* 2011; 23: 1144-52.
- 125 Van Veldhoven PP, Gijsbers S, Mannaerts GP, Vermeesch JR, Brys V. Human sphingosine-1-phosphate lyase: cDNA cloning, functional expression studies and mapping to chromosome 10q22. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1487: 128-34.
- 126 Bourquin F, Capitani G, Grütter MG. PLP-dependent enzymes as entry and exit gates of sphingolipid metabolism. *Protein Sci* 2011; 20: 1492-508.
- 127 Van Veldhoven PP, Mannaerts GP. Subcellular localization and membrane topology of sphingosine-1-phosphate lyase in rat liver. *J Biol Chem* 1991; 266: 12502-7.
- 128 Stoffel W, LeKim D, Sticht G. Distribution and properties of dihydrosphingosine-1-phosphate aldolase (sphinganine-1-phosphate alkanal-lyase). *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 1969; 350: 1233-41.
- 129 Hayashi T, Rizzuto R, Hajnoczky G, Su TP. MAM: more than just a housekeeper. *Trends Cell Biol* 2009; 19: 81-8.
- 130 Vogel P, Donoviel MS, Read R, Hansen GM, Hazlewood J, Anderson SJ, Sun W, Swaffield J, Oravec T. Incomplete inhibition of sphingosine 1-phosphate lyase modulates immune system function yet prevents early lethality and non-lymphoid lesions. *PLoS One* 2009; 4: 1-15.
- 131 Huwiler A, Pfeilschifter J. Altering the Sphingosine-1-Phosphate/Ceramide Balance: A Promising Approach for Tumor Therapy. *Curr Pharm Des* 2006; 12: 4625-35.
- 132 Schwab SR, Pereira JP, Matloubian M, Xu Y, Huang Y, Cyster JG. Lymphocyte Sequestration Through S1P Lyase Inhibition and Disruption of S1P Gradients. *Science* 2005; 309: 1735-9.
- 133 Rivera J, Proia RL, Olivera A. The alliance of sphingosine-1-phosphate and its receptors in immunity. *Nat Rev Immunol* 2008; 8: 753-63.
- 134 Katsel P, Li C, Haroutunian V. Gene Expression Alterations in the Sphingolipid Metabolism Pathways during Progression of Dementia and Alzheimer's Disease: A Shift Toward Ceramide Accumulation at the Earliest Recognizable Stages of Alzheimer's Disease? *Neurochem Res* 2007; 32: 845-56.
- 135 Serra M, Saba JD. Sphingosine 1 Phosphate Lyase, a Key Regulator of Sphingosine 1-Phosphate Signaling and Function. *Adv Enzyme Regul* 2010; 50: 349-62.
- 136 Sanllehi P, Abad JL, Casas J, Delgado A. Inhibitors of sphingosine-1-phosphate metabolism (sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate lyase). *Chem Phys Lipids* 2016; 197: 69-81.
- 137 Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. Alteration of Lymphocyte Trafficking by Sphingosine-1-Phosphate Receptor Agonists. *Science* 2002; 296: 346-9.
- 138 Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. Lymphocyte egress from thymus and peripheral lymphoid organs is dependent on S1P receptor 1. *Nature* 2004; 427: 355-60.
- 139 Aguilar A, Saba JD. Truth and consequences of sphingosine-1-phosphate lyase. *Adv Biol Regul* 2012; 52: 17-30.

- 140 Bandhuvula P, Fyrst H, Saba JD. A rapid fluorescence assay for sphingosine-1-phosphate lyase enzyme activity. *J Lipid Res* 2007; 48: 2769-78.
- 141 Bandhuvula P, Li Z, Bittman R, Saba JD. Sphingosine 1-phosphate lyase enzyme assay using a BODIPY-labeled substrate. 2009 doi:10.1016/j.bbrc.2009.01.106.
- 142 Berdyshev E V., Goya J, Gorshkova I, Prestwich GD, Byun H-S, Bittman R, Natarajan V. Characterization of sphingosine-1-phosphate lyase activity by electrospray ionization-liquid chromatography/tandem mass spectrometry quantitation of (2E)-hexadecenal. *Anal Biochem* 2011; 408: 12-8.
- 143 Reina E, Camacho L, Casas J, Van Veldhoven PP, Fabrias G. Determination of sphingosine-1-phosphate lyase activity by gas chromatography coupled to electron impact mass spectrometry. *Chem Phys Lipids* 2012; 165: 225-31.
- 144 Bedia C, Camacho L, Casas J, Abad JL, Delgado A, Van Veldhoven PP, Fabriàs G. Synthesis of a fluorogenic analogue of sphingosine-1-phosphate and its use to determine sphingosine-1-phosphate lyase activity. *ChemBioChem* 2009; 10: 820-2.
- 145 Nakahira K, Choi AMK. Autophagy: a potential therapeutic target in lung diseases. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2013; 305: 93-107.
- 146 Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell* 2010; 40: 280-93.
- 147 Fitzwalter BE, Thorburn A. Recent insights into cell death and autophagy. *FEBS J* 2015; 282: 4279-88.
- 148 Schneider JL, Cuervo AM. Liver autophagy: much more than just taking out the trash. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 2014; 11: 187-200.
- 149 Tooze SA, Dooley HC, Jefferies HBJ, Joachim J, Judith D, Lamb CA, Razi M, Wirth M. Assessing Mammalian Autophagy. In: *Membrane Trafficking: Second Edition, Methods in Molecular Biology*. 2015, pp 155-65.
- 150 Bedia C, Levade T, Codogno P. Regulation of autophagy by sphingolipids. *Anticancer Agents Med Chem* 2011; 11: 844-53.
- 151 Maes H, Rubio N, Garg AD, Agostinis P. Autophagy: Shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol Med* 2013; 19: 428-46.
- 152 Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; 7: 279-96.
- 153 Liang J, Shao SH, Xu ZX, Hennessy B, Ding Z, Larrea M, Kondo S, Dumont DJ, Gutterman JU, Walker CL, Slingerland JM, Mills GB. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27kip1 phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007; 9: 218-24.
- 154 Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang YY, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A, Guan KL. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 2013; 15: 741-50.
- 155 Wirawan E, Vanden Berghe T, Lippens S, Agostinis P, Vandenabeele P. Autophagy: for better or for worse. *Cell Res* 2012; 22: 43-61.
- 156 Reggiori F, Tooze SA. Autophagy regulation through Atg9 traffic. *J Cell Biol* 2012; 198: 151-3.
- 157 Proikas-Cezanne T, Takacs Z, Donnes P, Kohlbacher O. WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci* 2015; 128: 207-17.
- 158 Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH, Lenardo MJ. Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* 2010; 465: 942-6.

- 159 Nishida Y, Arakawa S, Fujitani K, Yamaguchi H, Mizuta T, Kanaseki T, Komatsu M, Otsu K, Tsujimoto Y, Shimizu S. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 2009; 461: 654-8.
- 160 Hasima N, Ozpolat B. Regulation of autophagy by polyphenolic compounds as a potential therapeutic strategy for cancer. *Cell Death Dis* 2014; 5: 1-13.
- 161 Yamagata M, Obara K, Kihara A. Sphingolipid synthesis is involved in autophagy in *Saccharomyces cerevisiae*. 2011 doi:10.1016/j.bbrc.2011.06.061.
- 162 Li Y, Li S, Qin X, Hou W, Dong H, Yao L, Xiong L. The pleiotropic roles of sphingolipid signaling in autophagy. *Cell Death Dis* 2014; 5: 1-11.
- 163 Scarlatti F, Bauvy C, Ventrucci A, Sala G, Cluzeaud F, Vandewalle A, Ghidoni R, Codogno P. Ceramidemediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B and up-regulation of beclin 1. *J Biol Chem* 2004; 279: 18384-91.
- 164 Guenther GG, Peralta ER, Rosales KR, Wong SY, Siskind LJ, Edinger AL. Ceramide starves cells to death by downregulating nutrient transporter proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 17402-7.
- 165 Pattingre S, Bauvy C, Carpentier S, Levade T, Levine B, Codogno P. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy. *J Biol Chem* 2009; 284: 2719-28.
- 166 Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Selvam SP, Ramshesh VK, Peterson YK, Lemasters JJ, Szulc ZM, Bielawski J, Ogretmen B. Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol* 2012; 8: 831-8.
- 167 Lépine S, Allegood JC, Park M, Dent P, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate phosphohydrolase-1 regulates ER stress-induced autophagy. *Cell Death Differ* 2011; 18: 350-61.
- 168 Long JS, Ryan KM. New frontiers in promoting tumour cell death: targeting apoptosis, necroptosis and autophagy. *Oncogene* 2012; 31: 5045-60.
- 169 Huang WC, Chen CL, Lin YS, Lin CF. Apoptotic sphingolipid ceramide in cancer therapy. *J Lipids* 2011; 2011: 1-15.
- 170 Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB, Tsujimoto Y. Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; 6: 1221-8.
- 171 Zhu Y, Zhao L, Liu L, Gao P, Tian W, Wang X, Jin H, Xu H, Chen Q. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis. *Protein Cell* 2010; 1: 468-77.
- 172 Oral O, Oz-Arslan D, Itah Z, Naghavi A, Devenci R, Karacali S, Gozuacik D. Cleavage of Atg3 protein by caspase-8 regulates autophagy during receptor-activated cell death. *Apoptosis* 2012; 17: 810-20.
- 173 Gu W, Wan D, Qian Q, Yi B, He Z, Gu Y, Wang L, He S. Ambra1 is an essential regulator of autophagy and apoptosis in SW620 cells: pro-survival role of Ambra1. *PLoS One* 2014; 9: 1-11.
- 174 Van Brocklyn JR, Williams JB. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp Biochem Physiol Part B Biochem Mol Biol* 2012; 163: 26-36.
- 175 Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L, Kroemer G, Abdulrahman BA, Khweek AA, Akhter A, Caution K, Kroemer G *et al.* Autophagy and Cellular Immune Responses. *Immunity* 2013; 39: 211-227.
- 176 Muzes G, Sipos F. Anti-tumor immunity, autophagy and chemotherapy. *World J Gastroenterol* 2012; 18: 6537-40.

- 177 Zhang X, Chen LX, Ouyang L, Cheng Y, Liu B. Plant natural compounds: Targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. *Cell Prolif* 2012; 45: 466-76.
- 178 Yang ZJ, Chee CE, Huang S, Sinicrope FA. The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 2011; 10: 1533-41.
- 179 Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen EL, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G, Levine B. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 2003; 112: 1809-20.
- 180 Elgendy M, Sheridan C, Brumatti G, Martin SJ, Berry DL, Baehrecke EH, Chen L, Willis SN, Heintz N *et al.* Oncogenic Ras-induced expression of Noxa and Beclin-1 promotes autophagic cell death and limits clonogenic survival. *Mol Cell* 2011; 42: 23-35.
- 181 Iannello A, Thompson TW, Ardolino M, Lowe SW, Raulet DH. p53-dependent chemokine production by senescent tumor cells supports NKG2D-dependent tumor elimination by natural killer cells. *J Exp Med* 2013; 210: 2057-69.
- 182 Maiuri MC, Tasdemir E, Ciriollo A, Morselli E, Vicencio JM, Carnuccio R, Kroemer G. Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell Death Differ* 2009; 16: 87-93.
- 183 Deretic V, Saitoh T, Akira S. Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2013; 13: 722-37.
- 184 Zhang L, Sung JJ, Yu J, Ng SC, Wong SH, Cho CH, Ng SS, Chan FK, Wu WK. Xenophagy in Helicobacter pylori- and Epstein-Barr virus-induced gastric cancer. *J Pathol* 2014; 233: 103-12.
- 185 Liu EY, Ryan KM. Autophagy and cancer - issues we need to digest. *J Cell Sci* 2012; 125: 2349-58.
- 186 Galluzzi L, Pietrocola F, Bravo-San Pedro JM, Amaravadi RK, Baehrecke EH, Cecconi F, Codogno P, Debnath J, Gewirtz DA, Karantza V, Kimmelman A, Kumar S, Levine B, Maiuri MC, Martin SJ, Penninger J, Piacentini M, Rubinsztein DC, Simon HU, Simonsen A, Thorburn AM, Velasco G, Ryan KM, Kroemer G. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J* 2015; 34: 856-80.
- 187 Rote K V., Rechsteiner M. Degradation of microinjected proteins: Effects of lysosomotropic agents and inhibitors of autophagy. *J Cell Physiol* 1983; 116: 103-10.
- 188 Eisenberg-Lerner A, Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy. *Apoptosis* 2009; 14: 376-91.
- 189 Jendrossek V. Targeting apoptosis pathways by Celecoxib in cancer. *Cancer Lett* 2013; 332: 313-24.
- 190 Jones DA, Carlton DP, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM. Molecular cloning of human prostaglandin endoperoxide synthase type II and demonstration of expression in response to cytokines. *J Biol Chem* 1993; 268: 9049-54.
- 191 Chandrasekharan N V, Dai H, Roos KLT, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 13926-31.
- 192 Bombardier C, Laine L, Reicin A, Shapiro D, Burgos-Vargas R, Davis B, Day R, Ferraz MB, Hawkey CJ, Hochberg MC, Kvien TK, Schnitzer TJ. Comparison of Upper Gastrointestinal Toxicity of Rofecoxib and Naproxen in Patients with Rheumatoid Arthritis. *N Engl J Med* 2000; 343: 1520-8.
- 193 Grosser T, Fries S, FitzGerald GA. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. *J Clin Invest* 2006; 116: 4-15.

- 194 Solomon SD, McMurray JJV, Pfeffer MA, Wittes J, Fowler R, Finn P, Anderson WF, Zauber A, Hawk E, Bertagnolli M. Cardiovascular Risk Associated with Celecoxib in a Clinical Trial for Colorectal Adenoma Prevention. *N Engl J Med* 2005; 352: 1071-80.
- 195 Cairns JA. The coxibs and traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs: a current perspective on cardiovascular risks. *Can J Cardiol* 2007; 23: 125-31.
- 196 Patel MI, Subbaramaiah K, Du B, Chang M, Yang P, Newman RA, Thaler HT, Dannenberg AJ. Celecoxib Inhibits Prostate Cancer Growth: Evidence of a Cyclooxygenase-2-Independent Mechanism. *Clin Cancer Res* 2005; 1: 1999-2007.
- 197 Schiffmann S, Ziebell S, Sandner J, Birod K, Deckmann K, Hartmann D, Rode S, Schmidt H, Angioni C, Geisslinger G, Grösch S. Activation of ceramide synthase 6 by celecoxib leads to a selective induction of C16:0-ceramide. *Biochem Pharmacol* 2010; 80: 1632-40.
- 198 Huang S, Sinicrope FA. Celecoxib-induced apoptosis is enhanced by ABT-737 and by inhibition of autophagy in human colorectal cancer cells. *Autophagy* 2010; 6: 256-69.
- 199 Liu M, Li CM, Chen ZF, Ji R, Guo QH, Li Q, Zhang HL, Zhou YN. Celecoxib regulates apoptosis and autophagy via the PI3K/Akt signaling pathway in SGC-7901 gastric cancer cells. *Int J Mol Med* 2014; 33: 1451-8.
- 200 Pervaiz S, Holme AL. Resveratrol: its biologic targets and functional activity. *Antioxid Redox Signal* 2009; 11: 2851-97.
- 201 Kuršvietienė L, Stanevičienė I, Mongirdienė A, Bernatoniene J. Multiplicity of effects and health benefits of resveratrol. *Medicina (B Aires)* 2016; 52: 148-55.
- 202 Regev-Shoshani G, Shoseyov O, Bilkis I, Kerem Z. Glycosylation of resveratrol protects it from enzymic oxidation. *Biochem J* 2003; 374: 157-63.
- 203 Conte E, Fagone E, Fruciano M, Gili E, Iemmolo M, Vancheri C. Anti-inflammatory and antifibrotic effects of resveratrol in the lung. *Histol Histopathol* 2015; 30: 523-9.
- 204 Han G, Xia J, Gao J, Inagaki Y, Tang W, Kokudo N. Anti-tumor effects and cellular mechanisms of resveratrol. *Drug Discov Ther* 2015; 9: 1-12.
- 205 Signorelli P, Ghidoni R. Resveratrol as an anticancer nutrient: molecular basis, open questions and promises. *J Nutr Biochem* 2005; 16: 449-66.
- 206 Albertoni G, Schor N. Resveratrol plays important role in protective mechanisms in renal disease - mini-review. *J Bras Nefrol* 2015; 37: 106-14.
- 207 de Ligt M, Timmers S. Resveratrol and obesity: Can resveratrol relieve metabolic disturbances? *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 1137-44.
- 208 Szkudelski T, Szkudelska K. Resveratrol and diabetes: from animal to human studies. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1852: 1145-54.
- 209 Nabavi S, Li H, Daglia M, Nabavi S. Resveratrol and Stroke: from Chemistry to Medicine. *Curr Neurovasc Res* 2014; 11: 390-7.
- 210 Aguirre L, Portillo MP, Hijona E, Bujanda L. Effects of resveratrol and other polyphenols in hepatic steatosis. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 7366-80.
- 211 Tang PCT, Ng YF, Ho S, Gyda M, Chan SW. Resveratrol and cardiovascular health - Promising therapeutic or hopeless illusion? *Pharmacol Res* 2014; 90: 88-115.
- 212 Tellone E, Galtieri A, Russo A, Giardina B, Ficarra S. Resveratrol: A Focus on Several Neurodegenerative Diseases. *Oxid Med Cell Longev* 2015; 2015: 1-14.
- 213 de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156-60.
- 214 Hung LM, Chen JK, Huang SS, Lee RS, Su MJ. Cardioprotective effect of resveratrol, a natural antioxidant derived from grapes. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 549-55.
- 215 Dolfini E, Roncoroni L, Dogliotti E, Sala G, Erba E, Sacchi N, Ghidoni R. Resveratrol impairs the formation of MDA-MB-231 multicellular tumor spheroids concomitant with ceramide accumulation. *Cancer Lett* 2007; 249: 143-7.

- 216 Cakir Z, Saydam G, Sahin F, Baran Y. The roles of bioactive sphingolipids in resveratrol-induced apoptosis in HL60 acute myeloid leukemia cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 2011; 137: 279-86.
- 217 Trincerri NF, Follo C, Nicotra G, Peracchio C, Castino R, Isidoro C. Resveratrol-induced apoptosis depends on the lipid kinase activity of Vps34 and on the formation of autophagolysosomes. *Carcinogenesis* 2008; 29: 381-9.
- 218 Scarlatti F, Maffei R, Beau I, Codogno P, Ghidoni R. Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells. *Cell Death Differ* 2008; 15: 1318-29.
- 219 Kartal M, Saydam G, Sahin F, Baran Y. Resveratrol triggers apoptosis through regulating ceramide metabolizing genes in human K562 chronic myeloid leukemia cells. *Nutr Cancer* 2011; 63: 637-44.
- 220 Lim KG, Gray AI, Pyne S, Pyne NJ. Resveratrol dimers are novel sphingosine kinase 1 inhibitors and affect sphingosine kinase 1 expression and cancer cell growth and survival. *Br J Pharmacol* 2012; 166: 1605-16.
- 221 Delgado A, Fabrias G, Bedia C, Casas J, Abad JL. Sphingolipid Modulation: A Strategy for Cancer Therapy. *Anticancer Agents Med Chem* 2012; 12: 285-302.
- 222 Hsieh T, Wu JM. Resveratrol: Biological and pharmaceutical properties as anticancer molecule. *Biofactors* 2010; 36: 360-9.
- 223 Fotsis T, Pepper M, Adlercreutz H, Hase T, Montesano R, Schweigerer L. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. *J Nutr* 1995; 125: 790-7.
- 224 Georgaki S, Skopeliti M, Tsiatas M, Nicolaou KA, Ioannou K, Husband A, Bamias A, Dimopoulos MA, Constantinou AI, Tsitsilonis OE. Phenoxodiol, an anticancer isoflavene, induces immunomodulatory effects in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* 2009; 13: 3929-38.
- 225 Constantinou AI, Husband A. Phenoxodiol (2H-1-benzopyran-7-O,1,3-(4-hydroxyphenyl)), a novel isoflavone derivative, inhibits DNA topoisomerase II by stabilizing the cleavable complex. *Anticancer Res* 2002; 22: 2581-6.
- 226 Gamble JR, Xia P, Hahn CN, Drew JJ, Drogemuller CJ, Brown D, Vadas MA. Phenoxodiol, an experimental anticancer drug, shows potent antiangiogenic properties in addition to its antitumour effects. *Int J Cancer* 2006; 118: 2412-20.
- 227 Alvero AB, O'Malley D, Brown D, Kelly G, Garg M, Chen W, Rutherford T, Mor G. Molecular mechanism of phenoxodiol-induced apoptosis in ovarian carcinoma cells. *Cancer* 2006; 106: 599-608.
- 228 Aguero MF, Facchinetti MM, Sheleg Z, Senderowicz AM. Phenoxodiol, a Novel Isoflavone, Induces G1 Arrest by Specific Loss in Cyclin-Dependent Kinase 2 Activity by p53-Independent Induction of p21 WAF1/CIP1. *Cancer Res* 2005; 65: 3364-73.
- 229 Yu F, Watts RN, Zhang XD, Borrow JM, Hersey P. Involvement of BH3-only proapoptotic proteins in mitochondrial-dependent Phenoxodiol-induced apoptosis of human melanoma cells. *Anticancer Drugs* 2006; 17: 1151-61.
- 230 Mahoney S, Arfuso F, Rogers P, Hisheh S, Brown D, Millward M, Dharmarajan A. Cytotoxic effects of the novel isoflavone, phenoxodiol, on prostate cancer cell lines. *J Biosci* 2012; 37: 73-84.
- 231 Herst PM, Petersen T, Jerram P, Baty J, Berridge MV. The antiproliferative effects of phenoxodiol are associated with inhibition of plasma membrane electron transport in tumour cell lines and primary immune cells. *Biochem Pharmacol* 2007; 74: 1587-95.

- 232 De Luca T, Morré DM, Morré DJ. Reciprocal relationship between cytosolic NADH and ENOX2 inhibition triggers sphingolipid-induced apoptosis in HeLa cells. *J Cell Biochem* 2010; 110: 1504-11.
- 233 Fotopoulou C, Vergote I, Mainwaring P, Bidzinski M, Vermorken JB, Ghamande SA, Harnett P, del Prete SA, Green JA, Spaczynski M, Blagden S, Gore M, Ledermann J, Kaye S, Gabra H. Weekly AUC2 carboplatin in acquired platinum-resistant ovarian cancer with or without oral phenoxodiol, a sensitizer of platinum cytotoxicity: The phase III OVATURE multicenter randomized study. *Ann Oncol* 2014; 25: 160-5.
- 234 Bangham AD, Horne RW. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J Mol Biol* 1964; 8: 660-8.
- 235 Balazs DA, Godbey WT. Liposomes for Use in Gene Delivery. *J Drug Deliv* 2011; 2011: 1-12.
- 236 Lasic D. On the thermodynamic stability of liposomes. *J Colloid Interface Sci* 1990; 140: 302-4.
- 237 Spector MS, Zasadzinski JA, Sankaram MB. Topology of Multivesicular Liposomes, a Model Biliquid Foam. *Langmuir* 1996; 12: 4704-8.
- 238 Dua JS, Rana AC, Bhandari AK. Liposome: Methods of preparation and applications. *Int J Pharm Stud Res E* 2012; 3: 14-20.
- 239 Tikshdeep C, Sonia A, Bharat P, Abhishek C. Liposome drug delivery: a review. *Int J Pharm Chem Sci Vol Page* 2012; 1: 754-64.
- 240 Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM, Danielsen M. Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 7413-7.
- 241 Elouahabi A, Ruyschaert JM. Formation and intracellular trafficking of lipoplexes and polyplexes. *Mol Ther* 2005; 11: 336-47.
- 242 Kobayashi T, Stang E, Fang KS, de Moerloose P, Parton RG, Gruenberg J. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature* 1998; 392: 193-7.
- 243 Hafez IM, Maurer N, Cullis P. On the mechanism whereby cationic lipids promote intracellular delivery of polynucleic acids. *Gene Ther* 2001; 8: 1188-96.
- 244 Gregoriadis G. Liposome research in drug delivery: the early days. *J Drug Target* 2008; 16: 520-4.
- 245 Barenholz Y. Doxil® — The first FDA-approved nano-drug: Lessons learned. *J Control Release* 2012; 160: 117-34.
- 246 Hadavi D, Poot AA. Biomaterials for the Treatment of Alzheimer's Disease. *Front Bioeng Biotechnol* 2016; 4: 1-10.
- 247 Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The smart drug delivery system and its clinical potential. *Theranostics* 2016; 6: 1306-23.
- 248 Billich A, Beerli C, Bergmann R, Bruns C, Loetscher E. Cellular assay for the characterization of sphingosine-1-phosphate lyase inhibitors. *Anal Biochem* 2013; 434: 247-53.
- 249 Cobanoglu G, Turacli ID, Ozkan AC, Ekmekci A. Flavopiridol's antiproliferative effects in glioblastoma multiforme. *J Cancer Res Ther* 2016; 12: 811-7.
- 250 Banerjee M, Chattopadhyay S, Choudhuri T, Bera R, Kumar S, Chakraborty B, Mukherjee SK. Cytotoxicity and cell cycle arrest induced by andrographolide lead to programmed cell death of MDA-MB-231 breast cancer cell line. *J Biomed Sci* 2016; 23: 1-40.
- 251 Marzec KA, Lin MZ, Martin JL, Baxter RC. Involvement of p53 in insulin-like growth factor binding protein-3 regulation in the breast cancer cell response to DNA damage. *Oncotarget* 2015; 6: 26583-98.

- 252 Xiao D, Bommareddy A, Kim SH, Sehrawat A, Hahm ER, Singh S V. Benzyl isothiocyanate causes FoxO1-mediated autophagic death in human breast cancer cells. *PLoS One* 2012; 7: 1-12.
- 253 Wolfe KL, Liu RH. Cellular Antioxidant Activity (CAA) Assay for Assessing Antioxidants, Foods, and Dietary Supplements. *J Agric Food Chem* 2007; 55: 8896-907.
- 254 Bhabak KP, Proksch D, Redmer S, Arenz C. Novel fluorescent ceramide derivatives for probing ceramidase substrate specificity. *Bioorg Med Chem* 2012; 20: 6154-61.
- 255 Suh JH, Eltanawy A, Rangan A, Saba JD. A facile stable-isotope dilution method for determination of sphingosine phosphate lyase activity. *Chem Phys Lipids* 2016; 194: 101-9.
- 256 Sanllehí P, Abad JL, Bujons J, Casas J, Delgado A. Studies on the inhibition of sphingosine-1-phosphate lyase by stabilized reaction intermediates and stereodefined azido phosphates. *Eur J Med Chem* 2016; 123: 905-15.
- 257 Argiriadi MA, Banach D, Radziejewska E, Marchie S, DiMauro J, Dinges J, Dominguez E, Hutchins C, Judge RA, Queeney K, Wallace G, Harris CM. Creation of a SIP Lyase bacterial surrogate for structure-based drug design. *Bioorg Med Chem Lett* 2016; 26: 2293-6.
- 258 Wallace SJ, Li J, Nation RL, Boyd BJ. Encapsulation and Release Methodology. *Drug Deliv Transl Res* 2012; 2: 284-92.
- 259 Eckert GP, Chang S, Eckmann J, Copanaki E, Hagl S, Hener U, Müller WE, Kögel D. Liposome-incorporated DHA increases neuronal survival by enhancing non-amyloidogenic APP processing. *Biochim Biophys Acta* 2011; 1808: 236-43.
- 260 Siddique MM, Li Y, Wang L, Ching J, Mal M, Ilkayeva O, Wu YJ, Bay BH, Summers SA. Ablation of dihydroceramide desaturase 1, a therapeutic target for the treatment of metabolic diseases, simultaneously stimulates anabolic and catabolic signaling. *Mol Cell Biol* 2013; 33: 2353-69.
- 261 Prietsch RF, Monte LG, da Silva FA, Beira FT, Del Pino FAB, Campos VF, Collares T, Pinto LS, Spanevello RM, Gamaro GD, Braganhol E. Genistein induces apoptosis and autophagy in human breast MCF-7 cells by modulating the expression of proapoptotic factors and oxidative stress enzymes. *Mol Cell Biochem* 2014; 390: 235-42.
- 262 Michel C, van Echten-Deckert G, Rother J, Sandhoff K, Wang E, Merrill AH. Characterization of Ceramide Synthesis. *J Biol Chem* 1997; 272: 22432-7.
- 263 Spanier G, Xu H, Xia N, Deng S, Wojnowski L, Forsternann U, Li H, Hospital T. Resveratrol reduces endothelial oxidative stress by modulating the gene expression of Superoxides Dismutase (SOD1), Gluthathione Peroxidase (GPX1) and NADPH Oxidase Subunit (NOX4). *J Physiol Pharmacol* 2009; Suppl. 4: 111-6.
- 264 Chu C, Lu FJ, Yeh RH, Li ZL, Chen CH. Synergistic antioxidant activity of resveratrol with genistein in high-glucose treated Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *Biomed reports* 2016; 4: 349-54.
- 265 Tauler R. Multivariate curve resolution applied to second order data. *Chemom Intell Lab Syst* 1995; 30: 133-46.
- 266 Yi L, Dong N, Yun Y, Deng B, Ren D, Liu S, Liang Y. Chemometric methods in data processing of mass spectrometry-based metabolomics: A review. *Anal Chim Acta* 2016; 914: 17-34.
- 267 Nakamura MT, Nara TY. Structure, Function and Dietary Regulation of $\Delta 6$, $\Delta 5$, and $\Delta 9$ Desaturases. *Annu Rev Nutr* 2004; 24: 345-76.
- 268 Zhang XH, Huang B, Choi SK, Seo JS. Anti-obesity effect of resveratrol-amplified grape skin extracts on 3T3-L1 adipocytes differentiation. *Nutr Res Pract* 2012; 6: 286-93.

- 269 Shin ES, Lee HH, Cho SY, Park HW, Lee SJ, Lee TR. Genistein downregulates SREBP-1 regulated gene expression by inhibiting site-1 protease expression in HepG2 cells. *J Nutr* 2007; 137: 1127-31.
- 270 Tanida I, Waguri S. Measurement of Autophagy in Cells and Tissues. *Methods Mol Biol* 2010; 648: 193-214.
- 271 Gottlieb RA, Andres AM, Sin J, Taylor DPJ, Gottlieb RA. All Fluxed Up. *Circ Res* 2015; 116: 504-15.
- 272 Marquez RT, Xu L. Bcl-2:Beclin 1 complex: multiple, mechanisms regulating autophagy/apoptosis toggle switch. *Am J Cancer Res* 2012; 2: 214-21.
- 273 Vinod V, Padmakrishnan CJ, Vijayan B, Gopala S. 'How can I halt thee?' The puzzles involved in autophagic inhibition. *Pharmacol Res* 2014; 82: 1-8.
- 274 Wu YT, Tan HL, Shui G, Bauvy C, Huang Q, Wenk MR, Ong CN, Codogno P, Shen HM. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *J Biol Chem* 2010; 285: 10850-61.
- 275 Bhattacharya S, McElhanon KE, Gushchina L V., Weisleder N. Role of phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase signaling in vesicular trafficking. *Life Sci* 2016; 167: 39-45.
- 276 Rouschop KMA, van den Beucken T, Dubois L, Niessen H, Bussink J, Savelkoul K, Keulers T, Mujcic H, Landuyt W, Voncken JW, Lambin P, van der Kogel AJ, Koritzinsky M, Wouters BG. The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5. *J Clin Invest* 2010; 120: 127-41.
- 277 Høyer-Hansen M, Bastholm L, Szyniarowski P, Campanella M, Szabadkai G, Farkas T, Bianchi K, Fehrenbacher N, Elling F, Rizzuto R, Mathiasen IS, Jäättelä M. Control of Macroautophagy by Calcium, Calmodulin-Dependent Kinase Kinase-β, and Bcl-2. *Mol Cell* 2007; 25: 193-205.
- 278 Chen N, Karantza-Wadsworth V. Role and regulation of autophagy in cancer. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 1516-23.
- 279 Zhang J, Chiu J, Zhang H, Qi T, Tang Q, Ma K, Lu H, Li G. Autophagic cell death induced by resveratrol depends on the Ca²⁺/AMPK/mTOR pathway in A549 cells. *Biochem Pharmacol* 2013; 86: 317-328.
- 280 Wang JL, Lin KL, Chou CT, Kuo CC, Cheng JS, Hsu SS, Chang HT, Tsai JY, Liao WC, Lu YC, Chen IS, Liu SI, Jan CR. Effect of celecoxib on Ca²⁺ handling and viability in human prostate cancer cells (PC3). *Drug Chem Toxicol* 2012; 35: 456-62.
- 281 Li L, Tan J, Miao Y, Lei P, Zhang Q. ROS and Autophagy: Interactions and Molecular Regulatory Mechanisms. *Cell Mol Neurobiol* 2015; 35: 615-21.
- 282 Wang JS, Ho FM, Kang HC, Lin WW, Huang KC. Celecoxib induces heme oxygenase-1 expression in macrophages and vascular smooth muscle cells via ROS-dependent signaling pathway. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2011; 383: 159-68.
- 283 Tang FY, Chen CY, Shyu HW, Hong S, Chen HM, Chiou YH, Lin KH, Chou MC, Wang LY, Wang YF. Resveratrol induces cell death and inhibits human herpesvirus 8 replication in primary effusion lymphoma cells. *Chem Biol Interact* 2015; 242: 372-9.
- 284 Jiang W, Ogretmen B. Autophagy paradox and ceramide. *Biochim Biophys Acta* 2014; 1841: 783-92.

MIREIA CASASAMPERE FERRER
2017
