



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA

## Eines per a l'estudi del metabolisme i els efectes dels esfingolípidis

Núria Bielsa i Vilardaga

**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](http://www.tdx.cat)) i a través del Dipòsit Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) y a través del Repositorio Digital de la UB ([diposit.ub.edu](http://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](http://www.tdx.cat)) service and by the UB Digital Repository ([diposit.ub.edu](http://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.



UNIVERSITAT DE  
BARCELONA



CSIC

CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS

UNIVERSITAT DE BARCELONA  
FACULTAT DE BIOLOGIA  
PROGRAMA DE DOCTORAT EN BIOMEDICINA

EINES PER A L'ESTUDI DEL METABOLISME I ELS EFECTES DELS ESFINGOLÍPIDS

Memòria presentada per Núria Bielsa i Vilardaga per optar al grau de  
Doctora per la Universitat de Barcelona

Tesi realitzada al Departament de Química Biològica,  
Institut de Química Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC)

Núria Bielsa i Vilardaga  
Doctoranda

Gemma Fabriàs Domingo  
Directora

Josefina Casas Brugulat  
Directora

Josep Joan Centelles Serra  
Tutor



*Als qui m'heu donat suport*



He vingut pel camí dels desigs  
i me'n tornaré pel camí dels records

*En una nit obscura*

Mercè Rodoreda

Aquest treball ha estat finançat pel Ministerio de Economía, Industria y Competitividad (projecte CTQ2017-85378-R).

La següent llista inclou els articles publicats durant la realització d'aquesta tesi:

N. Bielsa, J.M. Lizcano, J. Casas, G. Fabriàs. Jaspine B induces methuosis through activation of AMPK (manuscrit en preparació)

N. Bielsa, M. Casasampere, M. Aseeri, J. Casas, A. Delgado, J.L. Abad, G. Fabriàs. Discovery of deoxyceramide analogs as highly selective ACER3 inhibitors in live cells. *European Journal of Medicinal Chemistry*. **2021**; Feb 24;216:113296. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113296

M. Casasampere, N. Bielsa, D. Riba, L. Bassas, R. Xu, C. Mao, G. Fabriàs, J.L. Abad, A. Delgado, J. Casas. New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases. *Journal of Lipid Research*. **2019**; 60(6):1174-1181





# ABREVIATURES

1-desoximetilSa	1-desoximetilesfinganina
1-desoxiSa	1-desoxiesfinganina
1-desoxiSLs	1-desoxiesfingolípids
3MA	3-Metiladenina
AC	Ceramidasa àcida
ACER/s	Ceramidasa/es alcalina/es
ACER1	Ceramidasa alcalina 1
ACER2	Ceramidasa alcalina 2
ACER3	Ceramidasa alcalina 3
Akt	Proteïna quinasa B
alc-SMasa	Esfingomielinasa alcalina
AMP	Monofosfat d'adenosina
AMPK	Proteïna quinasa activada per AMP
ASAH2	N-Acilesfingosina Amidohidrolasa 2
aSMasa	Esfingomielinasa àcida
C1P	Ceramida-1-fosfat
C1PP	Ceramida-1-fosfat fosfatasa
CDasa/es	Ceramidasa/es
CDK	Quinasa/es dependent/s de ciclins
Cer	Ceramida/es
Cer1P	Ceramida-1-fosfat
CerK	Ceramida quinasa
CerS	Ceramida sintasa/es
CerS1	Ceramida sintasa 1
CerS2	Ceramida sintasa 2
CerS3	Ceramida sintasa 3
CerS4	Ceramida sintasa 4

## ABREVIATURES

---

CerS5	Ceramida sintasa 5
CerS6	Ceramida sintasa 6
CERT	Proteïna de transferència de ceramida
CitC	Citocrom C
CK2	Caseïna quinasa 2
CMA	Autofàgia per xaperones
DBCO-PEG4/5/6-TAMRA	Dibenzilciclooctí-PEG4-5/6-Tetrametilrhodamina
Des1	Dihidroceramida dessaturasa 1
dhCer	Dihidroceramida/es
dhS1P	Dihidroesfingosina-1-fosfat
dhSo	Dihidroesfingosina
EIPA	5-[N-etil-N-isopropil] amilorida
RE	Reticle endoplasmàtic
ERK	Proteïna quinasa regulada per senyals extracel·lulars
FB1	Fumonisina B1
GBA	Glucocerebrosidasa
GlcCer	Glucosilceramida/es
GlcCerS	Glucosilceramida sintasa
HPLC	Cromatografia líquida d'alta resolució
HTS	Cribratge d'alt rendiment
IAA	Iodoacetamida
IC <sub>50</sub>	Concentració inhibidora 50%
JB	Jaspina B
KSa	3-cetoesfinganina
KSR	3-cetoesfinganina reductasa
LC/MS	Cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses
LC3	Proteïna acoblada a microtúbuls de cadena lleugera 1A/1B 3
LMP	Permeabilització de la membrana lisosomal
LT	<i>Lysotracker</i>
LY	<i>Lucifer Yellow</i>

---

MAM	Membranes associades al mitocondri
MA-nSMasa	Esfingomielinasa neutra associada a mitocondri
MAPK	Proteïnes quinases activades per mitògens
MBCD	Metil- $\beta$ -ciclodextrina
mTOR	Diana de rapamicina en mamífers
mTORC1	Complex 1 de la diana de rapamicina en mamífers
mTORC1/2	Complexos 1 i 2 de la diana de rapamicina en mamífers
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamida adenina dinucleòtid
NC	Ceramidasa neutra
NCCD	Comitè de nomenclatura de la mort cel·lular
NETs	Trampes extracel·lulars de neutròfils trampes extracel·lulars de neutròfils
nSMasa	Esfingomielinasa neutra
nSMasa1	Esfingomielinasa neutra 1
nSMasa2	Esfingomielinasa neutra 2
nSMasa3	Esfingomielinasa neutra 3
OH	Radical hidroxil
PARP	DNA polimerases
PE	Fosfatidiletanolamina
PEA	Fosforiletanolamina
phCer	Fitoceramida
PHS	Fitoesfingosina
pl	Punt isoelèctric
PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinasa
PI3P	Fosfatidilinositol 3-fosfat
PKC	Proteïna quinasa C
PMT	Tub fotomultiplicador
PS	Fosfatidilserina
PTEN	Fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat 3-fosfatasa
rhNC	Enzim recombinant humà de la ceramidasa neutra
S1P	Esfingosina-1-fosfat

## ABREVIATURES

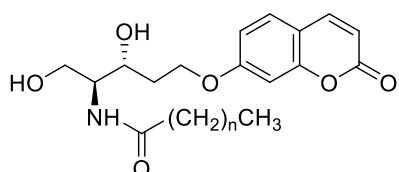
---

S1PL	Esfingosina-1-fosfat liasa
S1PP	Esfingosina-1-fosfat fosfatasa
S1PR/s	Receptor/s d'esfingosina-1-fosfat
Sa	Esfinganina
SaP	Esfinganina-1-fosfat
SK	Esfingosina quinasa
SK1	Esfingosina quinasa 1
SK2	Esfingosina quinasa 2
SL/s	Esfingolípid/s
SM	Esfingomielina
SMA-PME	Atròfia muscular espinal amb epilèpsia mioclònica progressiva
SMasa	Esfingomielinasa
SMS	Esfingomielina sintasa/es
SMS1	Esfingomielina sintasa 1
SMS2	Esfingomielina sintasa 2
So	Esfingosina
SPT	Serina palmitoiltransferasa
TNF $\alpha$	Factor de necrosi tumoral $\alpha$
TRAIL	Lligand inductor d'apoptosi relacionat amb TNF
TRiC	Component del complex-T que conté xaperones
UBL	Proteïnes tipus ubiquitina
UPLC-TOF	Cromatografia líquida d'ultra alta resolució acoblada a un espectròmetre de masses tipus temps de vol
V <sub>max</sub>	Constant de velocitat màxima
SDS-PAGE	Electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic
T	Temps
PSM	Coincidències d'espectre peptídic
WT	Fenotip salvatge
Col.	Col·laboradors
Ceramida-C6-Urea	D-eritro-N-(hexilcarbamoil)esfingosina

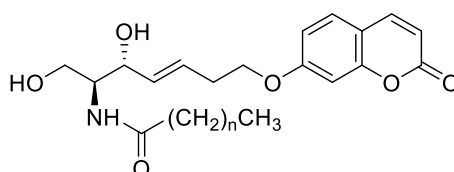
# ESTRUCTURES QUÍMIQUES

## Substrats de ceramidases

RBM14

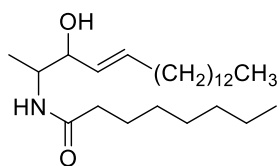


RBM15

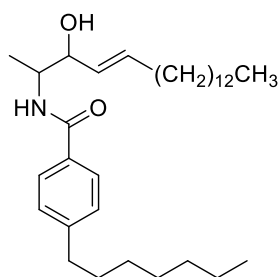


## Inhibidors de ceramidases

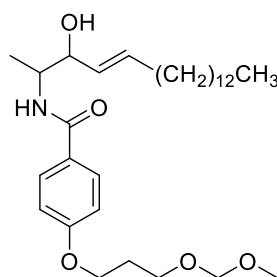
8



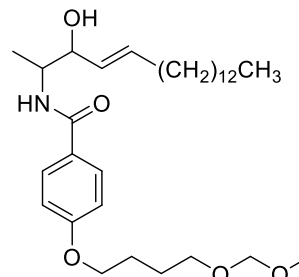
20



20l

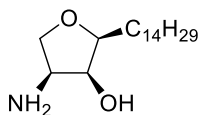


20m

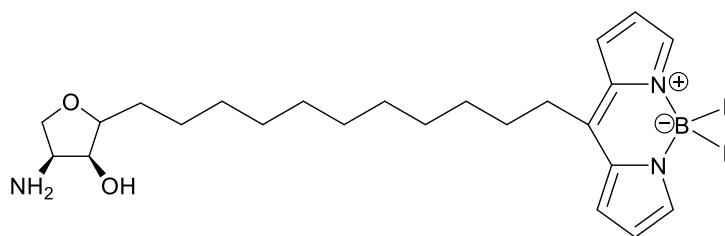


## Jaspina B i derivats

Jaspina B



Jaspina B Bodipy



Resum de les estructures químiques dels compostos utilitzats en aquesta tesi.



# ÍNDEX

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	<b>- 1 -</b>
<b>1. ESFINGOLÍPIDS</b> .....	<b>- 3 -</b>
1.1 Estructura dels esfingolípid	- 3 -
1.2 Metabolisme dels esfingolípid	- 5 -
1.3 Compartimentalització i regulació dels esfingolípid	- 9 -
<b>2. ELS ESFINGOLÍPIDS EN SENYALITZACIÓ CEL·LULAR</b> .....	<b>- 12 -</b>
2.1 Esfingolípid bioactius.....	- 12 -
2.2 Enzims del metabolisme dels esfingolípid	- 17 -
<b>3. ESFINGOLÍPIDS NATURALS</b> .....	<b>- 34 -</b>
3.1 Inhibidors del metabolisme d'esfingolípid	- 34 -
3.2 Anàlegs d'esfingolípid en organismes marins: Jaspina B	- 35 -
<b>4. MECANISMES DE MORT CEL·LULAR</b> .....	<b>- 38 -</b>
4.1 Apoptosi .....	- 39 -
4.2 Necrosi .....	- 41 -
4.3 Autofàgia .....	- 42 -
4.4 Anoikis.....	- 46 -
4.5 Catàstrofe mitòtica .....	- 47 -
4.6 Paraptosi.....	- 47 -
4.7 Parthanatos .....	- 47 -
4.8 Permeabilització de la membrana lisosomal i oncosi .....	- 48 -
4.9 Entosi.....	- 48 -
4.10 Piroptosi .....	- 49 -
4.11 Netosi .....	- 49 -
4.12 Ferroptosi.....	- 50 -
4.13 Metuosi .....	- 51 -
<b>OBJECTIUS</b> .....	<b>- 61 -</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>- 65 -</b>
<b>CAPÍTOL 1. NOUS SUBSTRATS FLUOROGÈNICS PER LES CERAMIDASES NEUTRA I ALCALINES I DESCOBRIMENT D'ANÀLEGS DE DESOXCERAMIDES COM A INHIBIDORS ALTAMENT SELECTIUS PER ACER3 EN CÈL·LULES INTACTES</b> .....	<b>- 67 -</b>
<b>Article 1. "New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases"</b> .....	<b>- 69 -</b>
<b>Article 2. "Discovery of deoxyceramide analogs as highly selective ACER3 inhibitors in live cells"</b> .....	<b>- 79 -</b>



<b>CAPÍTOL 2.</b> VIES DE SENYALITZACIÓ I PROTEÏNES DIANA DE LA JB .....	- 93 -
<b>Article 3.</b> <i>Jaspine B induces methuosis through activation of AMPK</i> .....	- 95 -
<b>Resultats addicionals.</b> <i>Identificació de proteïnes diana de la Jaspina B</i> .....	- 123 -
<b>RESUM DELS RESULTATS</b> .....	- 139 -
<b>DISCUSSIÓ</b> .....	- 147 -
<b>CONCLUSIONS</b> .....	- 163 -
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	- 167 -

# INTRODUCCIÓ



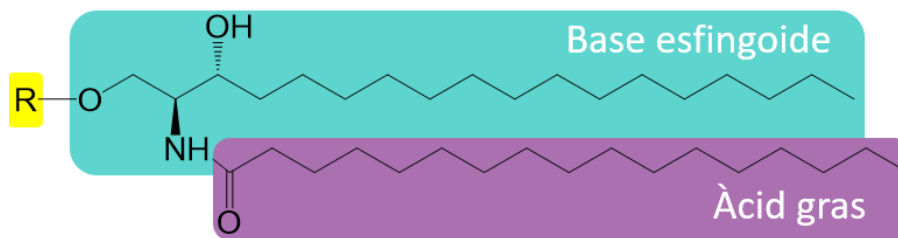
## 1. Esgingolípids

Les membranes lipídiques de les cèl·lules de mamífer estan constituïdes majoritàriament per tres classes de lípids diferents: glicerols, esterols i esgingolípids (SLs), que es classifiquen segons l'estructura del seu esquelet hidrofòbic. Els esgingolípids són una classe de lípids de membrana derivats de l'amino-alcohol esgingosina i es troben en totes les membranes eucariotes. L'any 1884, J. L. W. Thudichum<sup>1</sup> va ser el primer en identificar i aïllar aquesta molècula que posteriorment va ser caracteritzada com a esgingosina. Va anomenar a aquest tipus de compostos esgingolípids (derivat del grec "sphingos", misteriós, enigmàtic) inspirant-se en la figura mitològica de l'esfinx i en la seva naturalesa enigmàtica<sup>2</sup>.

Els esgingolípids constitueixen una família extensa de lípids amb una gran varietat de funcions. Tot i que inicialment es pensava que tenien un paper únicament estructural, els esgingolípids són molècules implicades en diferents processos cel·lulars com creixement, mort, senescència, adhesió, migració, inflamació, diferenciació, senyalització i transport intracel·lular<sup>3</sup>.

### 1.1 Estructura dels esgingolípids

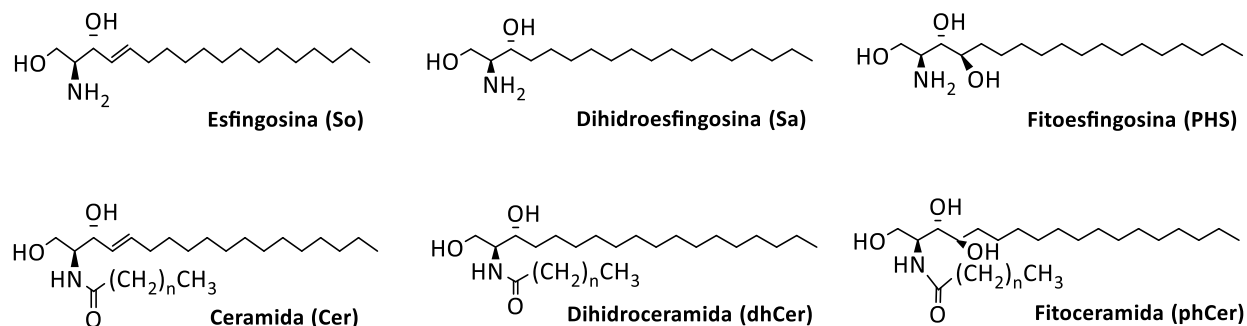
Com tots els lípids de membrana, els esgingolípids són molècules amfipàtiques. Generalment estan compostos per un cap polar i dues cues apolars. Una d'elles, anomenada base esgingoide, és un 1,3-aminodiol i en mamífers està formada normalment per divuit àtoms de carboni, i l'altra és un àcid gras de longitud variable unit mitjançant un enllaç amida a la base esgingoide (**Figura 1**).



**Figura 1.** Estructura representativa dels esgingolípids on la base esgingoide s'uneix a l'àcid gras mitjançant un enllaç amida. R representa els diferents grups polars.

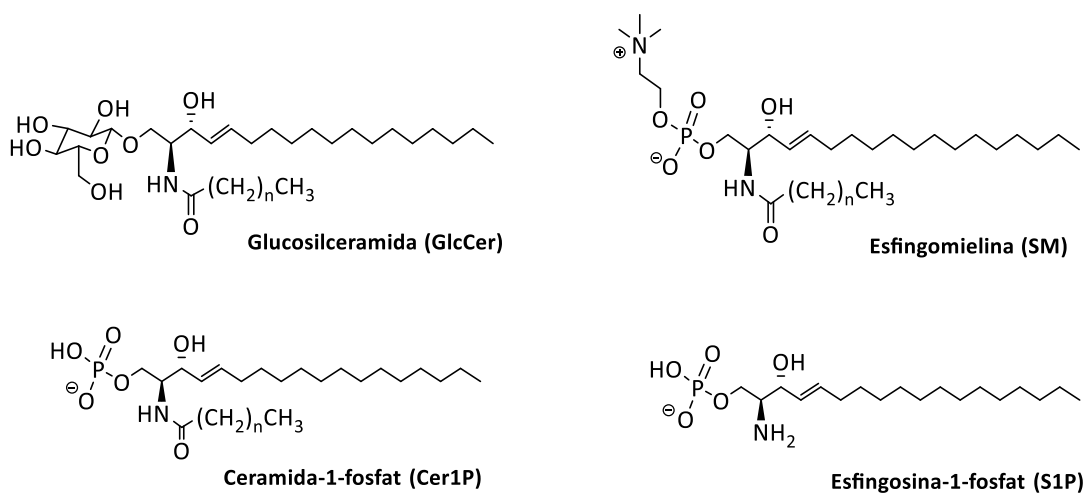
Les bases esgingoïdes més abundants en mamífers són l'esgingosina (So), l'esginganina (Sa), també anomenada dihidroesgingosina (dhSo), i la fitoesgingosina (PHS). Aquestes estructures es poden trobar en la seva forma lliure o bé formant part d'esgingolípids més complexos que contenen un àcid gras mitjançant un enllaç amida. Els esgingolípids es poden classificar segons la base esgingoïde, els àcids grassos units al grup amino de la base esgingoïde, i els diferents grups polars.

Així doncs l'So, l'Sa i la PHS *N*-acilades esdevenen la ceramida (Cer), la dihidroceramida (dhCer), i la fitoceramida (phCer), respectivament (**Figura 2**).



**Figura 2.** Estructura de les bases esfingoides més comunes i els productes de la seva *N*-acilació.

La Cer és l'esfingolípide 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 (**Figura 3**). L'esfingomielina (SM) hi té una cadena de fosforilcolina, mentre que els glicosfingolípids el presenten glicosilat amb gran diversitat de carbohidrats de diferent complexitat, essent la glucosilceramida (GlcCer) el representant més senzill. L'addició d'un fosfat a l'hidroxil de la posició 1 de la ceramida o l'So genera la ceramida-1-fosfat (C1P o Cer1P) o l'esfingosina-1-fosfat (S1P), respectivament. La llargada de la cadena de l'àcid gras i els graus d'insaturació donen lloc a una gran diversitat d'espècies d'esfingolípids que varien en solubilitat i propietats biològiques. Des del seu descobriment s'han identificat milers d'espècies diferents<sup>4</sup>.



**Figura 3.** Estructures de la glucosilceramida, l'esfingomielina, la ceramida-1-fosfat i l'esfingosina-1-fosfat.

## 1.2 Metabolisme dels esfingolípidis

L'àrea del metabolisme dels esfingolípidis ha estat molt estudiada i ben caracteritzada, i s'han descrit les vies bioquímiques de síntesi i degradació d'esfingolípidis, així com tots els enzims que hi estan involucrats. Aquests enzims es troben perfectament coordinats, com exigeix l'activitat biològica dels diferents compostos intermedis.

La molècula central del metabolisme dels esfingolípidis és la Cer, que se sintetitza bàsicament a través de la via anabòlica de síntesi *de novo* (**Figura 4, verd**), a partir de precursors que no són esfingolípidis. La biosíntesi *de novo* dels esfingolípidis és essencial per la supervivència cel·lular ja que la majoria d'esfingolípidis ingerits a través de la dieta són degradats a l'intestí dels mamífers<sup>5</sup>. Tot i així, també hi ha dues vies alternatives que generen Cer: la via catabòlica (**Figura 4, lila**), amb la hidròlisi de lípids complexos (especialment l'SM) i la via de reciclatge de les bases esfingoides (**Figura 4, taronja**).

### 1.2.1 Biosíntesi *de novo* de la ceramida

La biosíntesi *de novo* implica diverses etapes enzimàtiques. S'inicia amb la condensació de la L-serina amb el palmitoïl-CoA per generar 3-cetoefingianina (K<sub>3</sub>Sa)<sup>6</sup>. Aquesta reacció està catalitzada per l'enzim heterodimèric serina palmitoïltransferasa (SPT)<sup>7</sup>, dependent de piridoxal fosfat. Aquesta reacció pot ser inhibida per diferents molècules, ja siguin naturals o artificials, i la majoria provenen de microorganismes (esfingofungines, miriocina...). La inhibició de la SPT afecta el creixement i la viabilitat cel·lular, i això evidencia la importància de la biosíntesi *de novo* per a la supervivència cel·lular. La base esfingoida de 18 àtoms de carboni que resulta de la reacció de la SPT quan utilitza palmitoïl-CoA com a substrat és la més abundant en eucariotes i per això els esfingolípidis, en eucariotes, contenen generalment un esquelet de 18 carbonis. No obstant, la SPT també pot metabolitzar altres acil-CoA grassos i formar bases esfingoides amb cadenes de carbonis de llargada entre C14 i C22<sup>8</sup> com l'estearoïl-CoA, per generar esfingolípidis de 20 carbonis, o el miristoïl-CoA, que comporta la formació de bases esfingoides de 16 carbonis<sup>9</sup>.

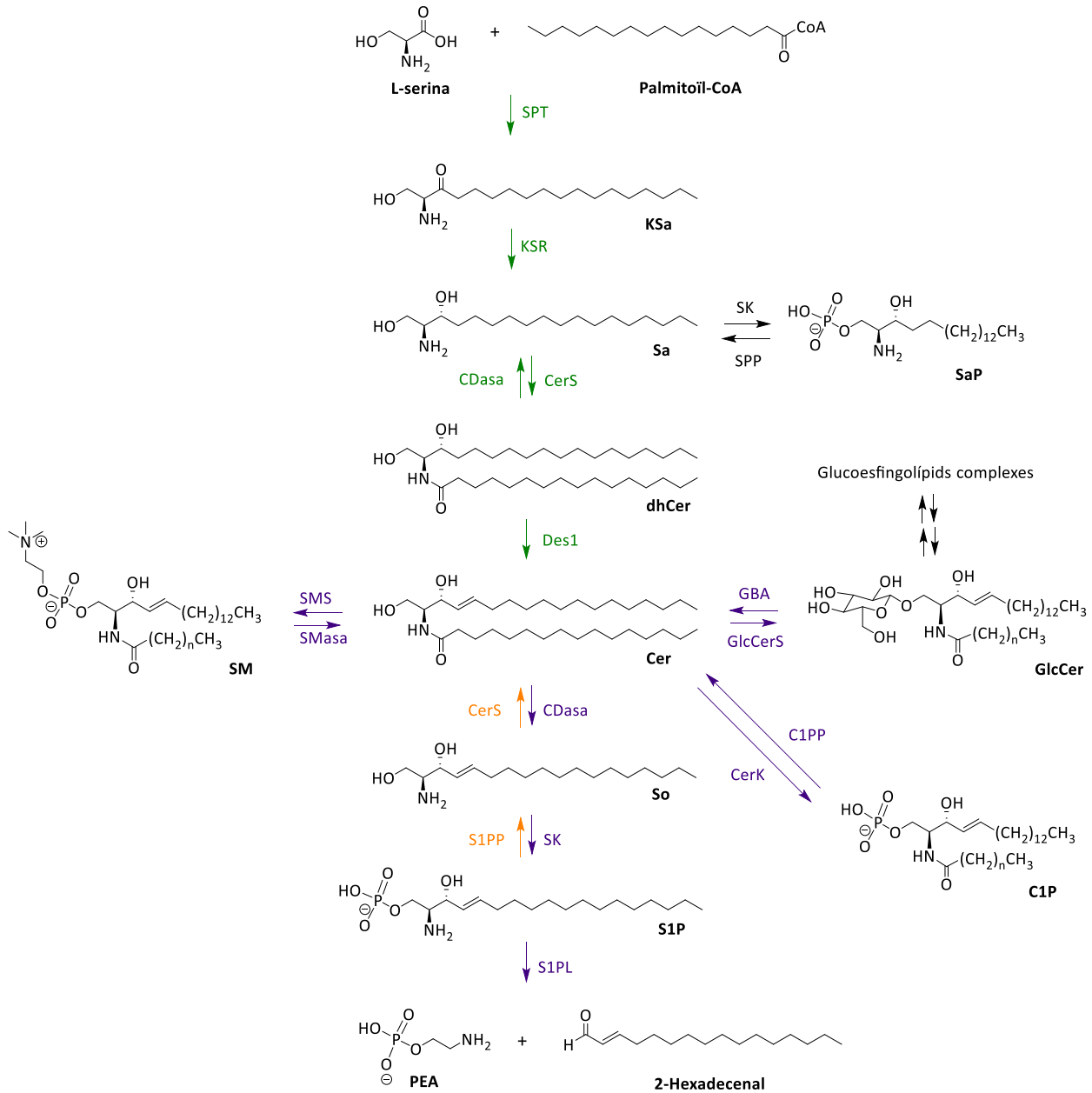
A més a més, la SPT pot utilitzar altres aminoàcids no essencials com a substrats alternatius en condicions de baixos nivells de serina<sup>10</sup>, en particular L-alanina i glicina, que resulten en la formació dels 1-desoxiesfingolípidis (1-desoxiSLs)<sup>11,12</sup>. La conjugació amb L-alanina forma 1-desoxiesfingianina (1-desoxiSa) i, amb glicina, 1-desoximetilesfingianina (1-desoximetilSa)<sup>11,13</sup>. Els 1-desoxiSLs no tenen grup hidroxil a la posició C1 de l'Sa, fet que impedeix que es puguin formar SLs complexos. A més, també bloqueja la seva degradació per l'esfingosina-1-fosfat liasa (S1PL), ja que no es pot formar l'intermedi catabòlic essencial S1P. Aquest increment de desoxiSLs s'ha descrit recentment com a mecanisme per a inhibir el creixement

tumoral<sup>10,14</sup>. D'altra banda, la formació de quantitats elevades de desoxiSLs deguda a mutacions de la SPT que produeixen enzims amb preferència per L-alanina i L-glycina provoca la Neuropatia Hereditària Sensorial i Autònoma, un trastorn que afecta el sistema nerviós caracteritzat per pèrdua d'audició, deteriorament de la funció intel·lectual (demència) i empitjorament de la pèrdua de sensibilitat en peus i cames (neuropatia perifèrica)<sup>15</sup>.

Després de la reacció catalitzada per la STP, la K<sub>3</sub> és reduïda a Sa per la 3-cetoesfinganina reductasa (KSR), en una reacció dependent de NADPH. Seguidament, la ceramida sintasa (CerS) acila l'Sa amb un àcid gras (d'entre 16 i 26 àtoms de carboni) i produeix dhCer. Aquesta reacció la realitzen diferents CerS amb diferent especificitat per la llargada de la cadena de l'àcid gras<sup>16</sup>.

La reacció final de la síntesi *de novo* la duu a terme l'enzim dihidroceramida dessaturasa 1 (Des1), que insereix un doble enllaç a la posició *trans* 4-5 de la dhCer per a generar la Cer<sup>4,17</sup>.

Els enzims responsables de la biosíntesi *de novo* de la Cer estan localitzats a la cara citosòlica del reticle endoplasmàtic (RE). En les reaccions biosintètiques que segueixen, la Cer és transportada a l'aparell de Golgi a través de mecanismes dependents o independents de vesícules<sup>18</sup> per convertir-se en la precursora dels esfingolípid complexos, addicionant substituents específics en la posició C<sub>1</sub>-OH de la Cer i, en menor mesura, de la dhCer.



**Figura 4.** Vies del metabolisme dels esfingolípids. Ceramida, groc; síntesi de novo, verd; vies catabòliques, lila; via de reciclatge, taronja. Abreviatures: KSa, 3-cetoesfingana; Sa, esfingana; SaP, esfingana-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-cetoesfingana 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 quinasa; C1PP, ceramida-1-fosfat fosfatasa.



### 1.2.2 Formació d'esfingomielina i glicoesfingolípid

La Cer és metabolitzada a SM amb generació de diacilglicerol (DAG) per acció de les esfingomielina sintases 1 i 2 (SMS1 i SMS2), enzims integrals de membrana localitzats a l'aparell de Golgi, que transfereixen un grup fosforilcolina de la fosfatidilcolina a la ceramida<sup>19,20</sup>. També pot ser convertida a C1P per la ceramida quinasa (CerK)<sup>21</sup>. El transport de la Cer des del reticle endoplasmàtic a l'aparell de Golgi per a la formació d'SM i C1P està mediat per la proteïna CERT<sup>22</sup>.

L'addició de diferents carbohidrats al grup hidroxil del C1 de la Cer genera glicoesfingolípid. El primer pas és catalitzat per la glucosilceramida sintasa (GlcCerS) i té lloc a la cara citosòlica de l'aparell de Golgi<sup>23</sup>, on la Cer arriba des del reticle endoplasmàtic per transport vesicular. La GlcCerS uneix una unitat de glucosa al grup C<sub>1</sub>-OH de la Cer per a formar GlcCer en una reacció dependent d'UDP-glucosa. Un cop generada, la GlcCer pot ser transportada directament a la membrana plasmàtica o bé pot migrar a la cara luminal del complex de Golgi per a posteriors addicions d'altres carbohidrats a la cadena. Aquest transport està mediat per la proteïna FAPP2<sup>22</sup>.

### 1.2.3 Catabolisme dels esfingolípid

La Cer també pot ser hidrolitzada per diferents ceramidases (CDases) per generar So. L'So és substrat de les esfingosina quinases (SK1 i SK2) i així es genera S1P<sup>24</sup>. L'S1P pot ser metabolitzada a So per acció de l'esfingosina-1-fosfat fosfatasa (S1PP). D'altra banda, l'acció de l'S1PL permet obtenir de forma irreversible els productes finals de la via; la fosforiletanolamina (PEA) i l'hexadecenal<sup>25</sup>.

La degradació d'esfingolípid complexos suposa una font de Cer. A la via catabòlica de l'esfingomielinasa (SMasa), la hidròlisi d'SM per part de les diferents SMases a lisosoma, membrana plasmàtica i mitocondri, genera Cer i fosforilcolina<sup>26</sup>.

La degradació dels glicoesfingolípid complexos per hidrolases lisosomals específiques també genera Cer. L'enzim lisosomal que hidrolitza l'enllaç glicosídic entre la Cer i la glucosa és la glucocerebrosidasa (GBA), una  $\beta$ -glucosidasa que depèn de l'activitat d'una proteïna activadora de baix pes molecular, la saposina C (SAP-C)<sup>27</sup>. Una activitat disminuïda d'aquest enzim, per mutacions al gen que el codifica, provoca una acumulació de GlcCer dins dels lisosomes, i això provoca la malaltia de Gaucher<sup>28</sup>.

També forma part de la via catabòlica la hidròlisi de la C1P per a obtenir Cer, per part de la C1P fosfatasa (C1PP).

### 1.2.4 Via de reciclatge

Finalment, a la via de reciclatge iniciada al lisosoma<sup>29</sup>, la hidròlisi d'S1P per l'S1PP genera So, i l'acció de la CerS permet produir Cer a partir d'So.

És important que hi hagi una bona coordinació entre la biosíntesi i la degradació de les diferents espècies d'esfingolípid per aconseguir l'homeòstasi metabòlica de l'esfingolipidoma, i per això es necessita un equilibri regulat entre la biosíntesi *de novo*, la via catabòlica i la via de reciclatge<sup>4</sup>.

## 1.3 Compartimentalització i regulació dels esfingolípid

Les reaccions enzimàtiques del metabolisme dels esfingolípid, altament conservades, tenen lloc a diferents compartiments cel·lulars (**Figura 5**).

La síntesi *de novo* de la Cer té lloc a la cara citosòlica del RE i a altres membranes associades al RE, com la membrana perinuclear i les membranes associades a mitocondri ("mitochondrial associated membranes", MAM), que són unes estructures membranoses implicades en la senyalització cel·lular i que es troben associades tant al mitocondri com al RE<sup>30</sup>. La posterior addició d'un cap polar a la Cer per a generar SM i GlcCer té lloc a l'aparell de Golgi.

Per les seves propietats hidrofòbiques, la Cer transloca del RE a l'aparell de Golgi mitjançant mecanismes actius<sup>31</sup>. En primer lloc, la proteïna de transferència de ceramida (CERT) transporta la Cer del RE a la cara luminal de l'aparell de Golgi per a generar SM<sup>32</sup>. En canvi, les GlcCer se sintetitzen a la cara citosòlica del Golgi i el transport de Cer, en aquest cas, és a través de transport vesicular, independent de CERT. Les GlcCer, sintetitzades a la regió *cis*-Golgi, són transportades fins als compartiments *trans*-Golgi mitjançant la proteïna adaptadora quatre fosfat 2 ("four-phosphate-adaptor protein 2", FAPP2)<sup>18,33</sup>, on troben els enzims encarregats de sintetitzar la lactosilceramida (LacCer) i els glicoesfingolípid. Per a la formació d'aquestes molècules complexes, com els gangliòsids, la GlcCer necessita passar de la superfície citosòlica a la luminal de l'aparell de Golgi mitjançant la glicoproteïna-P o proteïna de resistència a múltiples fàrmacs 1 ("multidrug resistance protein 1", MDR1)<sup>34,35</sup>.

Tant les SM com les GlcCer produïdes al Golgi són generalment conduïdes a la membrana plasmàtica a través de transport vesicular. Un cop a la membrana plasmàtica, l'SMasa, la CDasa i l'SK actuen per generar Cer, So i S1P, respectivament. La Cer també pot ser fosforilada a C1P mitjançant la CerK a la cara citosòlica del Golgi. A diferència de les SM i les GlcCer, la C1P no és transportada a través de vesícules sinó a través de la proteïna específica de transferència de C1P ("C1P-specific transfer protein", CPTP), que la transporta a la membrana plasmàtica o a altres compartiments cel·lulars<sup>36</sup>. Paral·lelament, a la via de

reciclatge, els esfingolípid complexos provinents de la membrana plasmàtica són internalitzats a través de la via endocítica i són hidrolitzats a So, al lisosoma, per les formes àcides de l'SMasa, la GBA i la CDasa. La base lliure So surt del lisosoma gràcies a la seva càrrega positiva ionitzable i té una solubilitat al citosol adequada per a moure's entre membranes, inclosa la del RE, on pot ser reciclada per a la síntesi de Cer<sup>37</sup>. Alternativament, l'So pot ser metabolitzada a glicerolípid després de la fosforilació per SK i el clivatge per S1PL.

També hi ha metabolisme d'esfingolípid al nucli perquè l'SM és un component de la matriu nuclear<sup>38</sup>. L'SMasa i la CDasa neutra hidrolitzen l'SM per a generar So. L'SK2, la isoforma nuclear de l'SK, és la responsable de la síntesi d'S1P, que podria intervenir en la transcripció de determinats gens<sup>39</sup>. Tot i que la Cer pot arribar al mitocondri des del RE a través del contacte entre les membranes dels dos orgànuls, al mitocondri també s'hi sintetitza Cer, ja sigui a través de la CerS<sup>40</sup> o d'una isoforma reversa de la CDasa neutra<sup>41,42</sup>.

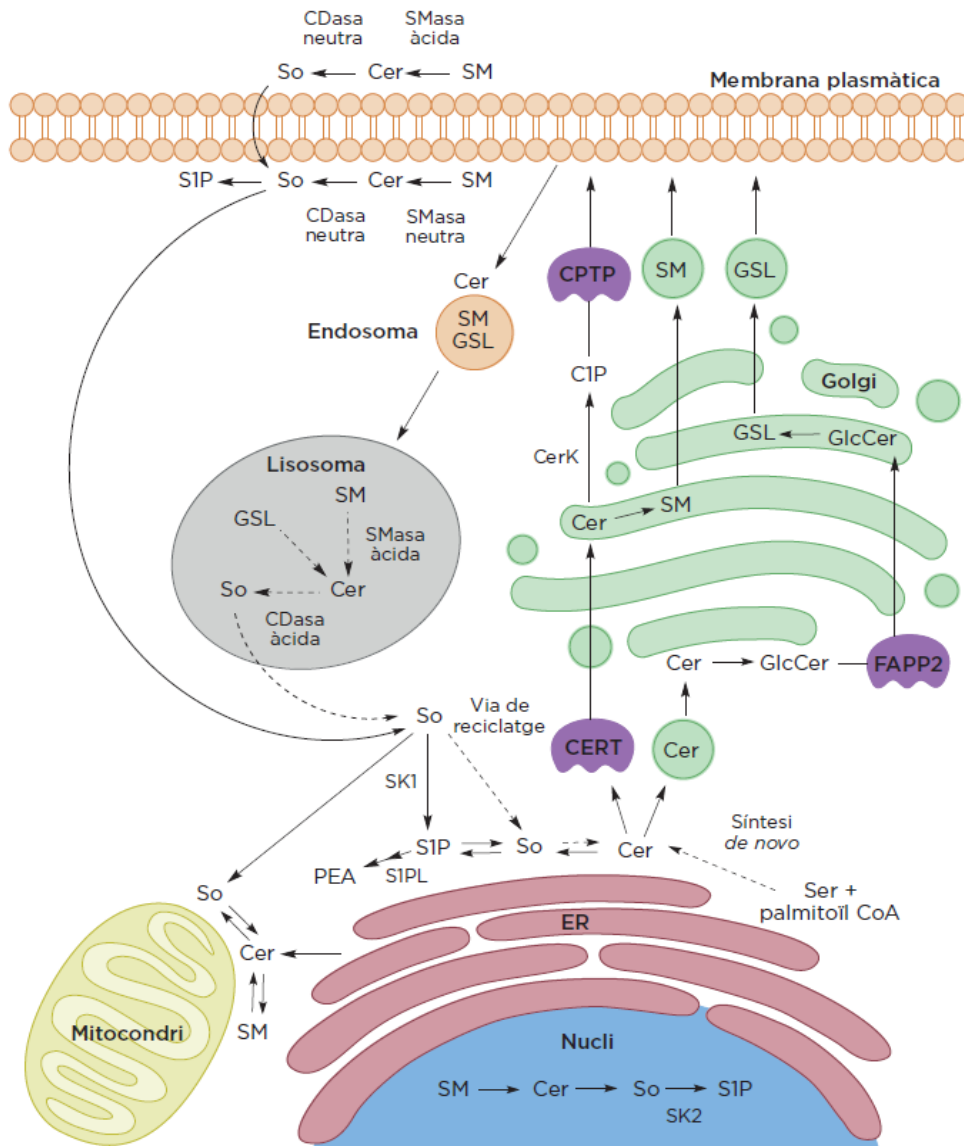


Figura 5. Compartimentalització del metabolisme dels esfingolípidos. Extret de la tesi doctoral de la Mireia Casasampere, 2017.

## 2. Els esfingolípidis en senyalització cel·lular

El metabolisme dels esfingolípidis es pot regular a molts nivells, des del control de l'expressió dels enzims que formen la via fins a mecanismes al·lostèrics. Com que els diferents esfingolípidis tenen diferents funcions de regulació i senyalització, les vies que regulen el seu metabolisme són complexes i hi ha una elevada diversitat estructural entre els diferents esfingolípidis.

### 2.1 Esfingolípidis bioactius

A més de tenir una funció estructural formant part de les membranes cel·lulars, els esfingolípidis regulen vies de senyalització implicades en múltiples processos fisiològics i fisiopatològics com proliferació, senescència, apoptosi, autofàgia, diferenciació, migració, angiogènesi i resposta inflamatòria. La desregulació del metabolisme dels esfingolípidis, així com els canvis en la seva localització espai-temporal, poden comportar l'aparició de diferents malalties<sup>43,44</sup>.

#### 2.1.1 Ceramida

La Cer és la molècula central del metabolisme dels esfingolípidis i la més estudiada. La Cer està involucrada en diversos processos biològics com diferenciació cel·lular, metabolisme d'oxidació-reducció, alliberament de citocines, inflamació, aturada del cicle cel·lular i proliferació cel·lular<sup>3,45-47</sup>. L'anàlisi de l'esfingolipidoma per espectrometria de masses ha permès aprofundir en l'estudi del paper de les diferents espècies de Cer<sup>48</sup>, diferenciades per l'heterogeneïtat de la cadena de l'àcid gras, que ve determinada per l'activitat de sis CerS diferents que tenen preferències específiques per àcids grassos concrets i d'aquesta manera cada CerS és responsable de la formació de determinades espècies de Cer<sup>49,50</sup>. Les propietats fisicoquímiques i fisiològiques de la Cer estan determinades per la longitud i les insaturacions de la cadena de l'àcid gras que s'uneix a la base esfingoide<sup>51,52</sup>.

A part, les funcions biològiques de la Cer també estan controlades per la seva localització subcel·lular<sup>45,53</sup>. La Cer i els enzims del metabolisme de la Cer s'han trobat en molts compartiments cel·lulars, i aquests dipòsits de Cer en espais cel·lulars diferents semblen estar involucrats en diferents vies de senyalització<sup>54</sup>.

La Cer generada a la membrana plasmàtica a partir d'SM activa vies de senyalització associades amb inhibició de creixement i mort cel·lular per estrès oxidatiu. Al mitocondri té un paper de missatger cel·lular en apoptosi<sup>55</sup>. Els efectes de la Cer convergeixen principalment al mitocondri, on s'inhibeixen proteïnes anti-apoptòtiques (Bcl-2 i Bcl-XL) i hi ha una disminució del potencial de membrana que facilita l'alliberació del citocrom C (CitC). Aquesta sortida del mitocondri del CitC al citosol desencadena la

formació de l'apoptosoma i, conseqüentment, l'activació de caspases, i així s'inicia el procés de mort apoptòtica intrínseca.

L'SMasa àcida també genera Cer al lisosoma, on pot interaccionar amb la catepsina D, que regula l'activació de la proteïna BID, que també indueix apoptosi<sup>56</sup>.

Com que les estructures membranoses del RE i el nucli estan connectades, les Cer que es generen al RE poden actuar al nucli, on poden inhibir l'activitat telomerasa i regular així la senescència i l'envelliment<sup>57</sup> i també poden activar la fosfatasa-1 i induir *splicing* alternatiu de la caspasa-9, pro-apoptòtica<sup>58</sup>. La Cer també atura el cicle cel·lular en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> a través de l'activació de la proteïna del retinoblastoma (Rb)<sup>59</sup>, de quinases dependents de ciclines ("cyclin dependent kinase", CDK) com la cdk2<sup>60</sup>, i regulant la diferenciació cel·lular<sup>45</sup>. Finalment, la Cer regula l'autofàgia mitjançant la regulació de la proteïna Beclin-1<sup>61,62</sup>.

Donada la importància de les funcions cel·lulars que realitza la Cer, tots els enzims que en regulen els seus nivells han d'estar perfectament coordinats ja que, en cas contrari, es comprometria la supervivència cel·lular.

### 2.1.2 Dihidroceramida

Les dhCer es van considerar durant molt temps intermediaris innocus del metabolisme dels esfingolípid, però s'ha evidenciat que són elements clau per diverses vies de senyalització cel·lular<sup>43</sup>. Tenen funcions biològiques diferents i que no se solapen amb les de les Cer. Alguns dels papers de les dhCer estan relacionats amb autofàgia, hipòxia i proliferació cel·lular, i ara estan implicades en etiologia, tractament i diagnòstic de malalties com la diabetis, càncer, isquèmia i malalties neurodegeneratives<sup>63</sup>. Són mediadors menys efectius que la Cer i per això es pensava que les dhCer eren biològicament inactives fins l'any 2006, quan Stiban i col. van descriure la capacitat de les dhCer per inhibir l'alliberament de molècules apoptòtiques mitocondrials i la conseqüent mort per apoptosi impedit la formació de canals mitocondrials, que indueixen les Cer<sup>64</sup>.

El mateix any es va publicar un estudi en que les dhCer participaven en la formació dels autofagosomes en el procés d'autofàgia<sup>65</sup>. Aquests estudis van inspirar molts altres grups a avaluar el paper de les dhCer en diferents respostes cel·lulars i ara se sap que estan implicades en un ampli ventall de processos cel·lulars<sup>63</sup>. Les innovacions en espectrometria de masses i el desenvolupament de noves tècniques de cromatografia líquida van permetre diferenciar Cer i dhCer, i això va obrir un nou camp d'investigació sobre el paper de les dhCer en senyalització cel·lular<sup>66</sup>.

Una de les primeres respostes biològiques relacionades amb les dhCer va ser l'autofàgia, tot i que amb certa controvèrsia. Alguns estudis descriuen que nivells elevats de dhCer provoquen activació d'autofàgia amb un paper protector contra agents citotòxics, sense que l'acumulació de dhCer ni l'autofàgia contribueixin a la mort cel·lular<sup>67,68</sup>. Per contra, en altres estudis s'ha descrit que nivells elevats de dhCer i la consegüent activació de l'autofàgia impliquen mort cel·lular<sup>69,70</sup>. Altres estudis han suggerit que l'acumulació de dhCer provocada per inhibidors de l'enzim Des1 activa autofàgia per vies dependents i independents de dhCer i que és el balanç entre les diferents vies el que defineix el destí cel·lular<sup>71</sup>.

Molts estudis han demostrat que les dhCer inhibeixen el cicle cel·lular. La inhibició de Des1, ja sigui genèticament o farmacològica, provoca una acumulació de dhCer que redueixen el creixement cel·lular i provoquen parada del cicle cel·lular en G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> reduint la fosforilació de la proteïna Rb<sup>72</sup> o modulant l'expressió de la ciclina D1, i així retarden la transició G<sub>1</sub>/S<sup>67</sup>.

El paper de la dhCer en apoptosi no és tan clar com el de la Cer. Alguns estudis suggereixen que les dhCer estan implicades en la inducció d'apoptosi<sup>73</sup> i altres indiquen que l'augment de dhCer és insuficient per a induir apoptosi o mort cel·lular<sup>74</sup>. Malgrat que el paper de les dhCer en apoptosi no estigui ben definit, les evidències de múltiples treballs suggereixen que les dhCer contraresten l'acció de les Cer en mort cel·lular. Per exemple, al mitocondri, les dhCer eviten la formació dels porus que faciliten les Cer, tot i que hi hagi poca concentració de dhCer, i això suggereix que la relació entre els dos esfingolípidis, i no tant la concentració de cada un d'ells, és determinant per a la inducció d'apoptosi<sup>63</sup>.

Igual com passa amb les Cer, les dhCer tenen efectes específics segons la longitud de la cadena de l'àcid gras. Un estudi va demostrar que les dhCer de cadenes de C22 i C24 són responsables de la citotoxicitat en línies cel·lulars de leucèmia<sup>75</sup>. En un altre estudi es va descriure que nivells elevats de les dhCer de C16, C24 i C24:1 estan implicats en efectes antiproliferatius provocats pel celecoxib<sup>76</sup>, un inhibidor de Des1.

Les dhCer, com les Cer, no es localitzen només a la membrana plasmàtica i el RE, sinó que també s'han trobat en altres orgànuls cel·lulars com el nucli i el mitocondri<sup>77</sup>. Increments en la relació dhCer/Cer a les membranes cel·lulars fan que n'augmenti la rigidesa i se n'alteri la dinàmica, i això pot repercutir en alteracions a diversos processos biològics com el transport, la formació de vesícules i la senyalització cel·lular<sup>43</sup>.

### 2.1.3 Bases esfingoides

#### 2.1.3.1 Esfingosina

L'So va ser la primera espècie d'esfingolípids que es va identificar. Entre les seves accions destaquen la parada de creixement cel·lular<sup>78</sup> i l'apoptosi en diferents tipus cel·lulars després de tractar-los amb dexametasona<sup>79</sup>, doxorubicina<sup>80</sup> o privació de sèrum<sup>81</sup>. S'ha demostrat que l'So té activitat bactericida contra diversos patògens com *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli*. L'So és present en cèl·lules epitelials nasals, traqueals i bronquials, i constitueix un element central de defensa de les vies respiratòries contra patògens bacterians<sup>82</sup>.

L'So és un inhibidor de la proteïna quinasa C (PKC)<sup>83,84</sup>. L'activació d'algunes isoformes de la PKC està implicada en proliferació cel·lular i supervivència. Per tant, la inhibició de la PKC per part de l'So podria estar associada a efectes inhibidors sobre aquests processos. A part, l'So també inhibeix altres quinases com la proteïna quinasa regulada per senyals extracel·lulars ("extracellular signal regulated kinase", ERK1/2)<sup>85</sup> i la proteïna quinasa B (PKB/Akt)<sup>86</sup>. A més, l'So també altera la integritat de membranes intracel·lulars: incrementa la permeabilitat dels lisosomes, que comporta l'activació de la via lisosomal d'apoptosi<sup>87</sup> induïda pel factor de necrosi tumoral  $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) a cèl·lules d'hepatoma, i això comporta mort cel·lular per apoptosi<sup>88</sup>, i també la dels mitocondris, que comporta alliberació del CitC i l'activació de la via intrínseca de l'apoptosi<sup>80</sup>. També s'ha descrit que l'So és responsable de la fragmentació de l'aparell de Golgi<sup>89</sup>, que comporta parada del cicle cel·lular, defectes en l'adhesió cel·lular i anoikis, un subtipus de mort cel·lular que es descriu a l'apartat 4.4.

#### 2.1.3.2 Esfinganina

De manera similar a l'So, la dhSo o Sa també és un mediador de la parada de cicle cel·lular i apoptosi<sup>90,91</sup>, ja sigui per aplicació exògena<sup>92</sup> o per acumulació endògena després de la inhibició de la CerS<sup>93</sup>. A més, es va veure que l'efecte citotòxic de l'agent anticancerigen fenretinida està relacionat amb l'acumulació d'Sa en diferents línies cel·lulars<sup>94,95</sup>. També s'ha descrit que nivells elevats de dhSo i dhCer estan relacionats amb la inducció d'apoptosi i autofàgia per  $\gamma$ -tocotrienol en cèl·lules de càncer de pròstata<sup>96</sup>.

#### 2.1.3.3 Fitoesfingosina

El paper de la PHS com a mediadora de diverses respostes cel·lulars com inhibició de creixement<sup>97</sup> i activació de proteïnes quinases<sup>98</sup> s'ha demostrat en llevats, però també té efectes en mamífers. Per exemple, l'addició de PHS exògena indueix la diferenciació i parada de creixement cel·lular en queratinòcits epidèrmics per activació del receptor  $\gamma$  activat per proliferació de peroxisomes ("peroxisome proliferator-activated receptor", PPAR- $\gamma$ )<sup>99</sup>. La PHS també causa apoptosi de cèl·lules Jurkat



(una línia immortalitzada de limfòcits T humans) a través de la via mitocondrial<sup>100</sup> i sensibilitza a aquesta línia cel·lular per a apoptosi induïda pel lligand inductor d'apoptosi relacionat amb TNF ("TNF-related apoptosis-inducing ligand", TRAIL)<sup>101</sup>.

### 2.1.4 Esfingosina-1-fosfat

La molècula proliferativa S1P té un paper oposat a la funció pro-apoptòtica de la Cer i l'So. És un mediador de moltes respostes cel·lulars crítiques per la cèl·lula com proliferació, creixement cel·lular i supervivència, ja que indueix mitosi en diversos tipus cel·lulars<sup>102-104</sup>. També regula adhesió, migració<sup>105,106</sup>, inflamació i angiogènesi<sup>107,108</sup>. S'ha demostrat que l'S1P indueix autofàgia i protegeix la cèl·lula de la mort per apoptosi, per tant afavoreix la seva supervivència<sup>109</sup>. S'han descrit algunes funcions intracel·lulars per l'S1P, però generalment és transportada fora la cèl·lula. La majoria de funcions biològiques de l'S1P estan regulades a través de receptors altament específics per l'S1P (S1PR) que estan acoblats a proteïnes G i regulen diverses vies de senyalització intracel·lular<sup>110</sup>. S'han descrit cinc S1PR (S1P1-5) que s'expressen de manera diferencial segons el teixit i el tipus cel·lular<sup>111</sup>. Aquests receptors activen vies de senyalització en les que hi participen proteïnes quinases activades per mitògens ("mitogen activated protein kinase", MAPK), la fosfatidilinositol-3-quinasa (PI3K), la proteïna quinasa activada per monofosfat d'adenosina ("AMP-activated protein kinase", AMPK) i altres mediadors intracel·lulars<sup>112</sup>, a més d'ERK<sup>113</sup>. Els efectes que comporta l'S1P a través d'aquests receptors són proliferació cel·lular, reestructuració del citoesquelet, migració, invasió, angiogènesi i transport de limfòcits, entre d'altres<sup>114</sup>.

Els efectes de l'S1P a través dels S1PR que s'han comentat al paràgraf anterior es coneixen bé. Les accions de l'S1P intracel·lular, que no interacciona amb els receptors extracel·lulars, no es coneixen tan bé, tot i que sembla ser que participa en la supressió de l'apoptosi i la regulació del creixement cel·lular<sup>115</sup>.

Vist que l'S1P té un ampli ventall d'accions, és interessant poder-ne regular els nivells d'expressió. La fosforilació de l'So per part de l'enzim SK genera S1P, i l'enzim S1PL i diferents fosfatases s'encarreguen de la seva degradació. La disponibilitat d'So limita la generació d'S1P, tot i que depèn de l'activitat de SK1 i SK2. Aquest punt és el "reòstat dels esfingolípids" (**Figura 6**), que és un mecanisme que té com a objectiu l'homeòstasi cel·lular i consisteix en l'equilibri de dos metabòlits amb funcions oposades, la Cer i l'S1P.

Per una banda, la Cer provoca apoptosi, parada del cicle cel·lular i senescència, i l'So també està relacionada amb aquests processos antiproliferatius. Per altra banda, l'S1P participa en processos com proliferació, creixement cel·lular i supervivència i, per tant, la Cer i l'S1P són lípids antagònics. El que determina el destí cel·lular no són les quantitats totals d'aquests metabòlits, que es poden convertir entre

ells, sinó els seus nivells relatius. En aquest sentit, com que la formació d'So depèn de l'activitat CDasa, es pot afirmar que l'equilibri entre les activitats de la CDasa i de la SP1L és clau pel manteniment de l'homeòstasi cel·lular.

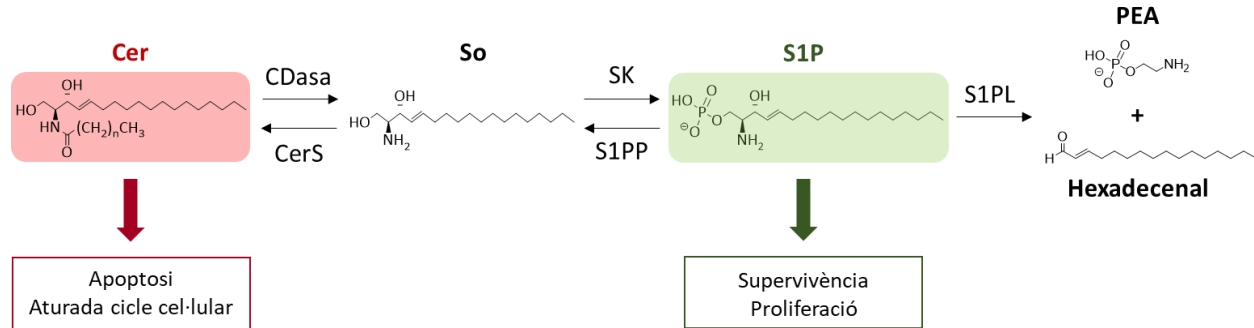


Figura 6. Esquema de la relació entre la Cer i l'S1P i les seves funcions cel·lulars.

### 2.1.5 Esfinganina-1-fosfat

L'esfinganina-1-fosfat (SaP), o dihidroesfingosina-1-fosfat (dhS1P), és l'anàleg saturat de l'S1P. Igual com l'S1P, l'SaP pot ser hidrolitzada per l'S1PL i com a productes de la reacció s'obtenen PEA i l'aldehid saturat hexadecanal.

Així com es coneixen bé les funcions de l'S1P, l'SaP no s'ha estudiat tant i es té poca informació dels seus potencials papers biològics., però s'ha descrit que l'S1P i l'SaP tenen propietats biològiques diferents. Per exemple, l'S1P mimetitzava algunes de les funcions profibròtiques del factor de creixement transformant  $\beta$  ("transforming growth factor  $\beta$ ", TGF- $\beta$ ) a través de l'activació creuada de la senyalització de les proteïnes Smad, que funcionen com a factors de transcripció pels receptors de TGF- $\beta$ <sup>116</sup>. En canvi, l'SaP té un paper oposat en la regulació de la senyalització de TGF- $\beta$ , inhibint la fosforilació i activació de les proteïnes Smad<sup>117</sup>. Aquest efecte antifibròtic de l'SaP està mediat per la normalització dels nivells d'expressió del supressor de tumors PTEN (fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfat 3-fosfatasa), i l'SaP o els seus derivats podrien ser efectius com a agents antifibròtics<sup>118</sup>.

## 2.2 Enzims del metabolisme dels esfingolípids

Els desordres metabòlics del metabolisme dels esfingolípids s'anomenen esfingolipidosis. Aquests desordres metabòlics estan causats per mutacions en gens dels enzims del metabolisme dels esfingolípids, que passen a perdre activitat o fins i tot ser inactius i causen acumulació d'intermediaris específics als orgànuls cel·lulars. Per exemple, mutacions al gen *ASAHL*, que codifica per la CDasa àcida (AC) lisosomal, provoquen la malaltia de Farber (o lipogranulomatosi)<sup>119,120</sup> o una atròfia muscular espinal

amb epilèpsia mioclònica progressiva (“spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy”, SMA-PME)<sup>120</sup>, totes dues malalties rares. Mutacions al gen SMPD1, que codifica per l’Smasa àcida, causen greus desordres lisosomals i provoquen la malaltia recessiva Niemann-Pick tipus A i B, que provoca la mort abans dels 3 anys d’edat, generalment<sup>121</sup>. Una altra esfingolipidosi, la malaltia de Gaucher, està caracteritzada per l’acumulació de glicoesfingolípid als lisosomes de monòcits i macròfags a causa d’una mutació puntual al gen GBA1, que codifica per l’enzim GBA<sup>122</sup>.

Dels lípids totals de la cèl·lula, els esfingolípid en són només una petita fracció. Malgrat això, canvis dels seus nivells, o desregulacions o alteracions en els enzims del seu metabolisme, provoquen la iniciació i progressió de diverses malalties. A part de les esmentades al paràgraf anterior, també s’han observat alteracions al metabolisme d’esfingolípid en moltes altres patologies<sup>123</sup>. Per això diversos enzims del metabolisme dels esfingolípid són dianes terapèutiques prometedores.

### 2.2.1 Ceramidases

Les CDases catalitzen la hidròlisi de les Cer i les dhCer per generar respectivament So i Sa, i un àcid gras (Figura 7)<sup>124</sup>. L’So és fosforilada per l’SK per a formar S1P. Com que l’única via per a generar S1P és la fosforilació de l’So, els nivells d’S1P depenen directament de la disponibilitat d’So generada per les CDases. Les CDases, per tant, tenen un paper clau no només en la regulació de la hidròlisi de Cer sinó també en la generació d’S1P<sup>125</sup>. Mantenir el balanç entre Cer i S1P és crucial per les cèl·lules ja que aquests lípids bioactius contribueixen substancialment a decidir el destí cel·lular<sup>3,126</sup>.

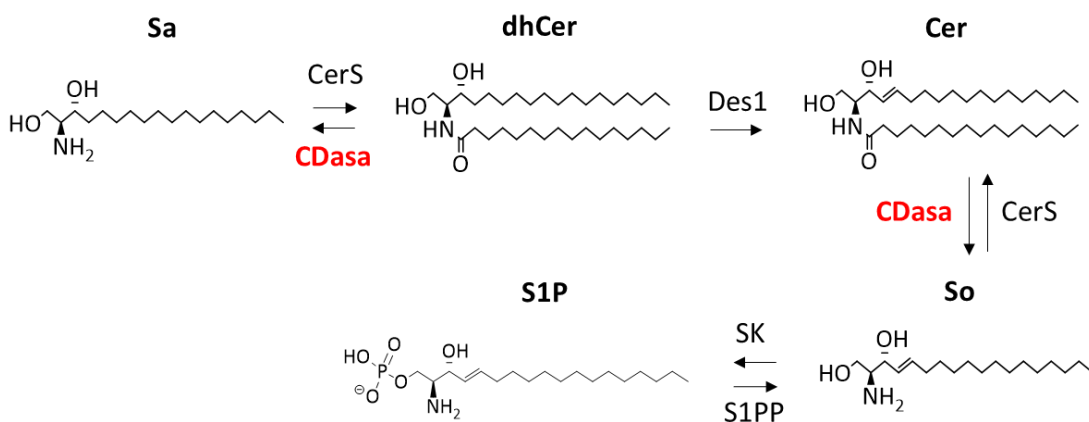


Figura 7. Les CDases catalitzen la hidròlisi de Cer i dhCer per generar So i Sa, respectivament.

Per les seves implicacions en mecanismes cel·lulars, les alteracions dels nivells de Cer s'han reconegut en moltes condicions patològiques com Alzheimer<sup>127</sup>, diabetis tipus 2<sup>128</sup>, malalties cardiovasculars<sup>129</sup>, malaltia inflammatòria intestinal<sup>130</sup>, malaltia de Farber<sup>119</sup>, sèpsies o càncer de còlon<sup>131</sup>.

Hi ha cinc CDases humanes codificades per cinc gens diferents, que es classifiquen segons el pH òptim per a la seva activitat. Així hi ha una CDasa àcida codificada pel gen *ASAH1*, una CDasa neutra (NC) codificada pel gen *ASAH2* (N-Acilesfingosina Amidohidrolasa 2), i tres CDases alcalines (ACER1, ACER2 i ACER3) codificades pels gens *ASAH3*, *ASAH3L* i *PHCA*, respectivament (**Taula 1**).

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

Enzim	Gen	pH òptim	Localització subcel·lular
Ceramidasa àcida (AC)	<i>ASAH1</i>	4,5	Lisosomes
Ceramidasa neutra (NC)	<i>ASAH2</i>	7,6	Mitocondris, membrana plasmàtica, aparell de Golgi 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

Cada CDasa té una distribució en teixits, localització subcel·lular i especificitat per substrat diferent a les altres. La AC s'expressa només en vertebrats. En canvi, la NC i les ACERs es distribueixen de manera més àmplia i es poden trobar en diferents espècies, des d'eucariotes simples a mamífers. Només la NC es troba a organismes procariotes<sup>132</sup>, també en bacteris patògens. Pel que fa al teixit, la AC s'expressa de manera ubiqua però sobretot a cor, ronyó, pulmó, placenta i múscul esquelètic<sup>133</sup>, la NC s'expressa només als microvil·li de l'intestí prim i còlon, on està involucrada en el catabolisme dels esfingolípidis provinents de la dieta per a regular els nivells dels metabòlits bioactius dels esfingolípidis al tracte intestinal<sup>134</sup>. En el cas de les alcalines, l'ACER1 s'expressa exclusivament a cèl·lules de la pell i ACER2 i ACER3 s'expressen a tots els teixits però són particularment abundants a la placenta<sup>135</sup>. Pel que fa als òrgans, la AC es localitza als lisosomes<sup>136</sup> i la NC a la membrana plasmàtica<sup>134,137</sup>, mitocondri<sup>138,139</sup>,

aparell de Golgi<sup>140</sup>, o secretada a l'espai extracel·lular<sup>141</sup>. En el cas de les alcalines, l'ACER1 s'expressa a RE, l'ACER2 a Golgi<sup>142,143</sup> i l'ACER3 a RE i Golgi<sup>144,145</sup>.

A part de la hidròlisi de Cer a So, també s'ha descrit per algunes CDases una activitat reversa<sup>146</sup>. En aquest cas, per acció CDasa (reversa) es genera Cer a partir d'una base esfingoide i un àcid gras. Aquesta activitat reversa de la CDasa es diferencia de l'activitat CerS en que la CerS utilitza acil-CoA grassos i l'activitat reversa de la CDasa es duu a terme amb àcids grassos lliures<sup>147</sup>.

Tot i que el paper que juguen les ceramidases en diferents malalties humanes ha guanyat interès, la recerca en aquest camp ha estat obstaculitzada per la manca d'inhibidors específics per aquests enzims. S'han descrit diferents inhibidors de ceramidases<sup>148</sup>, però quasi tots van dirigits a la AC. Durant les últimes dues dècades s'han descrit inhibidors de la NC, però la seva potència és baixa, no s'ha caracteritzat prou bé la seva especificitat i cap d'ells no ha arribat a tenir efectes clínics<sup>148</sup>. Un article recent ha publicat un assaig de cribratge d'alt rendiment ("high-throughput screening", HTS) on s'han testat més de 650000 molècules de baix pes molecular com a inhibidores de la NC amb resultats interessants, però no es revelen les estructures químiques dels compostos ni s'estudien en lisats cel·lulars ni en cèl·lules intactes<sup>149</sup>. Un altre estudi recent ha presentat un inhibidor de l'activitat NC (NC06) que suprimeix el creixement de tumors *in vivo*<sup>150</sup>, però la seva selectivitat no s'estudia de forma exhaustiva. Per altra banda, només s'ha descrit un inhibidor per l'ACER, el (1*S*,2*R*)-D-eritro-2-(*N*-miristoilamino)-1-fenil-1-propanol (D-e-DMAPP)<sup>151</sup>, però no s'ha identificat l'ACER concreta sobre la que actua i alguns articles descriuen que el D-e-DMAPP inhibeix també la AC<sup>152</sup> i la NC<sup>153</sup>.

### 2.2.1.1 Ceramidasa àcida

La AC s'anomena formalment *N*-acilesfingosina amidohidrolasa 1 i, en humans, està codificada pel gen *ASAH1*, localitzat al cromosoma 8, p22<sup>125</sup>. Va ser la primera activitat ceramidasa descrita, l'any 1963, com un enzim que catalitzava la hidròlisi de l'enllaç amida de la Cer<sup>154</sup>. La proteïna es va purificar a partir d'orina humana l'any 1990<sup>155</sup> i es va clonar el seu cDNA pocs anys més tard<sup>156</sup>. La AC és una glicoproteïna heterodimèrica formada per dues subunitats:  $\alpha$  (no glicosilada, 13 kDa) i  $\beta$  (glicosilada, 40 kDa). És sintetitzada al RE com a precursor inactiu de 53 kDa i després és processada de manera post-transcripcional als lisosomes, on les dues subunitats  $\alpha$  i  $\beta$  queden unides per ponts disulfur<sup>157</sup>. Aquesta modificació post-transcripcional és un mecanisme per evitar l'activació prematura de l'enzim abans que arribi al lisosoma, ja que només s'activa a pH àcid. El centre actiu d'aquest enzim conté un tiol nucleofílic al residu cisteïna 143 (Cys143) que queda exposat a l'*N*-terminal de la subunitat  $\beta$  després del trencament

de la proteïna precursora<sup>158</sup>. Tot i que aquest enzim es localitza principalment als lisosomes, una petita porció de l'enzim és secretada al medi com a monòmer<sup>155</sup>.

El pH òptim per a l'activitat hidrolítica de la AC és 4,5 i no necessita cations per a la seva activitat enzimàtica<sup>159</sup>. Igual que altres enzims, i com ja s'ha comentat anteriorment, la AC catalitza la reacció reversa de síntesi de Cer: pot utilitzar un àcid gras de C12 i una molècula d'So per a produir Cer, amb un pH òptim de 6, en lloc de 4,5<sup>160</sup>. Els millors substrats per la AC són Cer amb àcids grassos amb cadenes de carbonis de C12-C14, en comparació amb cadenes més curtes ( $\leq C6$ ) o més llargues ( $\geq C16$ )<sup>161</sup>. També té preferència per les Cer insaturades (com C18:1 o C18:2) en comparació amb les saturades (C18)<sup>135,162</sup>, i és capaç d'hidrolitzar dhCer *in vitro*, però no en cèl·lules<sup>95</sup>. D'altra banda, és l'única ceramidasa capaç d'hidrolitzar 1-desoxidihidroceramides<sup>163</sup>.

La deficiència o el mal funcionament de la AC causa patologies, ja que és un element clau del catabolisme de la Cer en cèl·lules humanes. La deficiència congènita de la AC causa la malaltia de Farber o lipogranulomatosi<sup>119</sup>, que és una malaltia autosòmica recessiva causada per una acumulació de Cer als lisosomes de diversos teixits com el fetge, la melsa i els pulmons<sup>120,164</sup>, i mutacions al gen *ASAH1*, que sovint causen un mal plegament de la proteïna, també poden causar SMA-PME<sup>120</sup>. La AC també inhibeix l'acció inhibidora dels àcids grassos saturats sobre la via de senyalització de la insulina i així preven la malaltia de diabetis tipus 2<sup>165</sup>. En la malaltia d'Alzheimer hi ha nivells elevats de AC, que té un paper de control de l'apoptosi neuronal<sup>166</sup>. També hi ha nivells elevats de AC en diverses línies tumorals com melanoma<sup>167</sup>, càncer de pròstata<sup>168</sup> o càncer de cap i coll<sup>169</sup>. Generalment, la sobreexpressió de la AC té un efecte protector en cèl·lules tumorals perquè converteix la Cer (pro-apoptòtica) a S1P (anti-apoptòtica), per això és important tenir eines per a inhibir-la. En aquest sentit, el nostre grup ha sintetitzat dos inhibidors irreversibles de la AC, el SOCLAC i el SOBRAC<sup>170</sup>.

### 2.2.1.2 Ceramidasa neutra

La NC és una proteïna integral de membrana tipus II de 85,5 kDa<sup>137</sup>. Està codificada pel gen *ASAH2*, localitzat al cromosoma 10, q11.23<sup>125</sup>. La seva activitat es va descriure per primer cop l'any 1969 a l'intestí humà, amb un pH òptim de 7,6<sup>171</sup>. Es va purificar i clonar per primer cop de *Pseudomonas aeruginosa*, aïllada de la pell de pacients amb dermatitis atòpica<sup>146,172</sup>, i de cèl·lules de cervell de rata<sup>173</sup>, i més tard es va purificar també en humans<sup>138</sup> i altres espècies<sup>174</sup>. No es requereixen cations per activar la NC, tot i que l'activitat enzimàtica incrementa amb Na<sup>+</sup> i Ca<sup>2+</sup>. El Mg<sup>2+</sup> i el Mn<sup>2+</sup> milloren una mica l'activitat NC, però el Zn<sup>2+</sup>, el Cu<sup>2+</sup> i el Fe<sup>2+</sup> la inhibeixen<sup>175</sup>. L'estructura cristal·lina va revelar un domini catalític (residus 99-629), un connector curt (627-641) i un domini semblant a immunoglobulina (642-780). L'estructura

també va revelar que el centre actiu de la NC humana està compost per una butxaca hidrofòbica estreta i de 20 Å de profunditat amb un ió  $Zn^{2+}$  a la base<sup>176</sup>.

La NC humana té més preferència per Cer de cadena llarga (C16-C22) que per Cer de cadena molt llarga ( $\geq C24$ ), tot i que l'especificitat pel substrat en el cas de la NC no ha estat ben establerta<sup>177</sup>, i és incapaç d'hidrolitzar dhCer en cèl·lules<sup>95</sup>. Igual que la AC, la NC promou proliferació i supervivència cel·lular, ja que disminueix els nivells de Cer i augmenta l'efecte de l'S1P. És per això que la inhibició de la NC provoca aturada de cicle cel·lular i apoptosi<sup>178</sup>.

La NC humana s'expressa principalment als microvil·li de l'intestí prim i còlon, on està involucrada en el catabolisme dels esfingolípidis provinents de la dieta per a regular els nivells dels metabòlits bioactius dels esfingolípidis al tracte intestinal<sup>134</sup>. En canvi, la NC de ratolí s'expressa a fetge, cor, cervell, pulmons, i tracte intestinal<sup>125</sup>. Inicialment, la NC es va caracteritzar com a proteïna mitocondrial<sup>138,139</sup>, quan es va sobreexpressar en cèl·lules HEK293T, però després es va identificar com a proteïna de membrana O-glicosilada<sup>134,137</sup>, i més tard es va identificar també a l'aparell de Golgi<sup>140</sup>. La presència d'un domini ric en serina, treonina i prolina, anomenat domini mucina, que és present només a la regió *N*-terminal en vertebrats, és la responsable per la presència de la NC a la membrana plasmàtica<sup>171</sup>. L'enzim també pot ser excretat per proteòlisi de la regió *N*-terminal, que fa que perdi el seu ancoratge a la membrana plasmàtica<sup>179</sup>.

La NC està sobreexpressada en cèl·lules de càncer de còlon<sup>140</sup>. La inhibició de la NC porta a un increment de Cer, que és acompanyat de l'activació d'apoptosi i autofàgia, i una supervivència reduïda en cèl·lules de càncer de còlon, mentre que la inhibició de la NC exerceix efectes mínims en cèl·lules intestinals no tumorals<sup>134</sup>. En aquest sentit, és interessant tenir bons inhibidors de la NC. El retard en el creixement cel·lular observat després de la inhibició de la NC és a través de la fosforilació de la proteïna Akt, que indueix desfosforilació de GSK3 $\beta$ , seguida per la fosforilació i degradació de la  $\beta$ -catenina i la supressió de la proliferació de cèl·lules de càncer de còlon, *in vivo* i *in vitro*<sup>180</sup>.

En contrast amb la NC de ratolí, la NC humana no s'expressa al cervell en nivells significatius. En canvi, una duplicació d'*ASAH2* al cromosoma 10 q11.23, anomenada *ASAH2L*, s'expressa de manera abundant en teixit cerebral. És interessant destacar que l'expressió d'aquesta variant de la NC disminueix amb l'edat i amb l'inici de la malaltia d'Alzheimer<sup>181</sup>. Citocines com TNF $\alpha$  i interferó- $\gamma$  incrementen l'activitat, els nivells de mRNA i la síntesi de proteïna NC, i aquest augment protegeix les cèl·lules de la mort cel·lular induïda per citocines<sup>182</sup>. En un model de ratolí amb malaltia inflamatòria intestinal es va veure que la NC

també tenia un paper protector<sup>183</sup>. També s'ha descrit que la NC té un paper en la memòria de diverses espècies de mamífers, tant a curt com a llarg termini<sup>184</sup>.

S'han identificat dues isoformes de la NC humana: *ASA2* isoforma 1 (NP\_063946; *Homo sapiens*), de 780 aminoàcids, i *ASA2* isoforma 2 (NP\_001137446; *Homo sapiens*), de només 745 aminoàcids. Les dues isoformes de la NC estan codificades pel mateix gen però tenen diferents llocs d'inici de transcripció. Aquest *splicing* alternatiu porta a la truncació de la isoforma 2, que té 35 aminoàcids menys que la isoforma 1, els de la posició 410 a la 444. Parveen i col. van alinear les seqüències de NC d'humà i altres espècies, i van veure que hi ha una regió molt variable entre les posicions 34 i 103, que inclouen possibles llocs d'O-glicosilació des de l'aminoàcid 62 al 98. Tot i així, el pèptid *N*-terminal tipus 2 d'ancoratge a la membrana (aminoàcids 12 a 33) i el motiu amidasa (aminoàcids 353 a 366) estan relativament conservats, per tant les funcions es mantenen. Hi ha múltiples codons d'inici a la regió *N*-terminal de l'mRNA de la NC, i això pot portar a diverses isoformes que difereixen en la llargada de la regió *N*-terminal i això pot influenciar significativament la localització intracel·lular del polipèptid de la NC. La regió variable pot portar a diferències molt significatives en la localització subcel·lular, la funció i els nivells d'expressió en humans i altres animals<sup>125</sup>.

### 2.2.1.3 Ceramidases alcalines

S'han descrit tres CDases alcalines humanes: ACER1, ACER2 i ACER3, que contenen 264<sup>185</sup>, 275<sup>142</sup> i 267<sup>144</sup> aminoàcids, respectivament, amb un pes molecular similar, al voltant de 31 kDa. Totes tres presenten múltiples dominis transmembrana i les seves activitats incrementen amb  $\text{Ca}^{2+}$ <sup>135</sup>. L'S1P del plasma deriva de l'So generada per activitat ACER als eritròcits, que és l'única activitat ceramidasa present en aquest tipus de cèl·lules<sup>186</sup>. Les tres ACERs tenen una seqüència proteica molt semblant, però cada una presenta unes propietats específiques. Tenen diferents papers en respostes cel·lulars ja que presenten diferències en l'especificitat pel substrat, la localització cel·lular, la distribució als teixits i el nivell d'expressió.

#### 2.2.1.3.1 **Ceramidasa alcalina 1**

L'ACER1 es localitza al RE<sup>185</sup>, té un pH òptim de 8,5, i hidrolitza preferentment Cer amb àcids grassos de cadena molt llarga i insaturada (com la Cer C24:1). Inicialment es va descriure que no podia hidrolitzar ni dhCer ni phCer<sup>185</sup> però més tard s'ha demostrat que sí que pot hidrolitzar dhCer insaturades i generar espècies de dhSo, però no pot hidrolitzar dhCer saturades<sup>95</sup>. L'activitat de l'ACER1, igual que la de la AC, augmenta en presència de  $\text{Ca}^{2+}$  i no d'altres cations, i la seva activitat en absència de  $\text{Ca}^{2+}$  és molt baixa<sup>185</sup>. A més, el tractament amb l'inhibidor de la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa thapsigargin esgota els nivells de  $\text{Ca}^{2+}$  del RE i bloqueja la generació d'So en resposta a la sobreexpressió d'ACER1<sup>135</sup>. És un enzim que s'expressa



bàsicament a queratinòcits de l'epidermis<sup>187</sup>, on en regula la diferenciació ja que l'So generada per acció de l'ACER és un lípid bioactiu amb propietats antiproliferatives i, per tant, afavoreix la diferenciació<sup>185</sup>. Tot i que ha estat menys estudiada que altres CDases, estudis recents han mostrat la implicació d'ACER1 en l'homeòstasi de la pell de mamífers i l'homeòstasi de l'energia corporal<sup>188</sup>.

### 2.2.1.3.2 Ceramidasa alcalina 2

L'ACER2 es localitza a l'aparell de Golgi i s'expressa molt en placenta tot i que, de manera més moderada, també en altres teixits<sup>142</sup>. La seqüència de la proteïna ACER2 presenta elevada similitud amb la de l'ACER1. Com que té un nombre de dominis transmembrana imparell, l'extrem C-terminal de la proteïna es troba orientada a la cara citosòlica i, la cua N-terminal, al lumen de l'aparell de Golgi. Aquesta disposició és necessària per la correcta localització i activitat CDasa de l'ACER2. Aquest enzim catalitza la reacció en un rang de pH d'entre 7 i 9 i la seva activitat òptima, tant *in vitro* com en cèl·lules, requereix de Ca<sup>2+</sup> al lumen de l'aparell de Golgi<sup>143</sup>.

Tal com s'ha descrit per l'ACER1, l'ACER2 té com a substrats Cer de cadena molt llarga i preferentment insaturada, tot i que hidrolitza la majoria d'espècies de Cer de mamífers<sup>143</sup>. Igual que l'ACER1, té preferència per Cer en lloc de dhCer o phCer<sup>142</sup> però, tot i així, tant l'ACER1 com l'ACER2 poden hidrolitzar dhCer de cadena molt llarga i insaturada (com C24:1), que són les espècies més abundants en les línies tumorals. En cèl·lules tumorals, la CDasa responsable de la generació de dhSo a partir de dhCer és l'ACER2, ja que la AC i la NC no tenen capacitat d'hidrolitzar dhCer, l'activitat de l'ACER1 està limitada als queratinòcits<sup>95</sup> i l'ACER3 hidrolitza dhCer poc abundants, com es comenta a l'apartat següent.

L'ACER2 té un paper dual pel que fa al destí cel·lular, depenent del balanç entre So i S1P. Nivells d'expressió ectòpica d'ACER2 baixos o moderats promouen la proliferació cel·lular i supervivència provocats per l'augment d'expressió d'S1P i la disminució dels nivells de Cer, ja que no s'acumulen nivells citotòxics d'So. En canvi, una elevada expressió ectòpica d'ACER2 genera nivells elevats d'So que causen aturada de creixement cel·lular<sup>142</sup>. L'ACER2 té un paper important en la regulació de la glicosilació de proteïnes a l'aparell de Golgi: la glicosilació del precursor de la subunitat  $\beta$ 1 de la integrina és inhibida per la sobreexpressió d'ACER2 i això impedeix l'adhesió cel·lular a la matriu extracel·lular<sup>143</sup>. A part, en un estudi fet amb cèl·lules HeLa, es va veure que l'expressió d'ACER2 augmenta en resposta a la privació de sèrum, i el *knockdown* d'ACER2 inhibeix la proliferació cel·lular i provoca apoptosi en cèl·lules cultivades en absència de sèrum. Aquests resultats suggereixen que, en privació de sèrum, l'ACER2 té un paper protector i promou la supervivència cel·lular<sup>142</sup>. Estudis recents han mostrat la implicació d'ACER2 en la regulació de la resposta al dany de DNA<sup>189</sup>.

### 2.2.1.3.3 Ceramidasa alcalina 3

L'ACER3 va ser la primera CDasa alcalina clonada en mamífers i originalment se la va anomenar fitoceramidasa alcalina (aPHC) per la seva capacitat d'hidrolitzar l'anàleg sintètic de Cer D-ribo-C12-NBD-fitoceramida. És una proteïna homòloga tant a ACER1 com a ACER2, amb diversos dominis transmembrana, i es localitza tant al RE com a l'aparell de Golgi<sup>144</sup>. S'expressa de forma ubíqua a molts teixits, especialment a la placenta, i sobretot és present a cèl·lules endotelials, fibroblasts, múscul llis i cèl·lules hematopoiètiques<sup>145</sup>. El pH òptim per a la seva activitat és de 9,5 i s'estimula amb  $Ca^{2+}$  però s'inhibeix amb  $Zn^{2+}$  i  $So$ <sup>144</sup>.

Així com l'ACER1 i l'ACER2 utilitzen com a substrat Cer de cadena llarga abundants als mamífers (com C16, C24 o C24:1), l'ACER3 té especificitat pel substrat i catalitza només Cer de cadena llarga mono- o poli-insaturada, que són espècies de Cer poc abundants (com C18:1, C20:1 o C20:4) i no és capaç d'hidrolitzar Cer amb cadenes llargues saturades (com C18) o cadenes insaturades molt llargues (com C24:1). A diferència de l'ACER1 i l'ACER2, l'ACER3 pot hidrolitzar Cer, dhCer i phCer amb la mateixa eficiència, tant en cèl·lules com *in vitro* i, per tant, és la CDasa alcalina més activa en gran varietat de models cel·lulars. Tot i que no s'han detectat Cer i dhCer de cadena llarga poliinsaturades en cèl·lules de mamífer, també són substrat de l'ACER3<sup>145</sup>.

El *knockdown* de l'ACER3 inhibeix la proliferació cel·lular activant p21, que és una proteïna inhibidora de la CDK, i segurament també a partir d'una acumulació de Cer, que alteren el creixement cel·lular, tot i que també inhibeix l'apoptosi induïda per privació de sèrum. A més, aquest silenciament gènic de l'ACER3 provoca la sobreexpressió de l'ACER2, i això demostra que l'ACER2 i l'ACER3 treballen coordinadament per a compensar la pèrdua d'activitat CDasa i així regulen la proliferació cel·lular<sup>145</sup>.

### 2.2.1.4 Mètodes per a determinar l'activitat ceramidasa

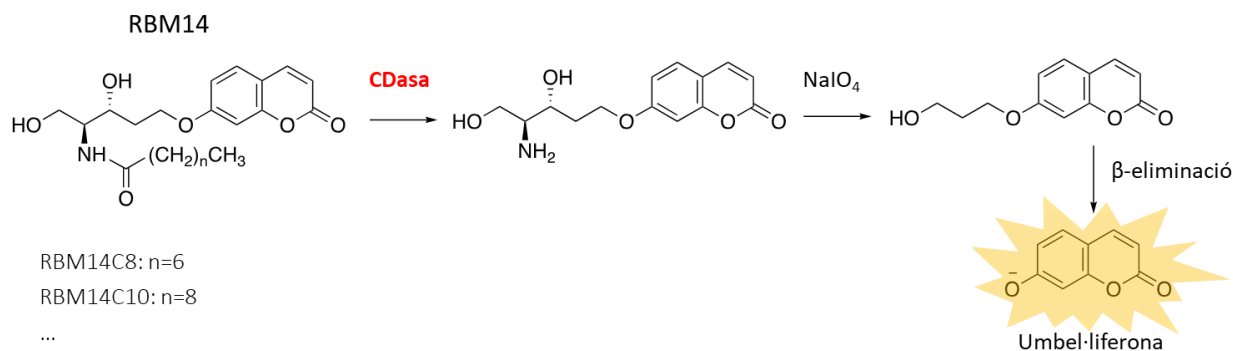
L'interès per les CDases en biologia cel·lular ha impulsat el desenvolupament de diferents substrats que permeten mesurar l'activitat enzimàtica CDasa. El primer assaig descrit es basava en l'ús de Cer marcades amb radioactivitat<sup>190,191</sup> amb <sup>14</sup>C o <sup>3</sup>H. En aquest cas, les Cer eren hidrolitzades i es determinava el nivell de radioactivitat a l'àcid gras<sup>192</sup>. Alternativament, per estalviar l'ús de productes radioactius i els inconvenients que comporten, es van dissenyar també anàlegs de Cer fluorescents, sent les Cer marcades amb NBD<sup>193</sup> o BODIPY<sup>191</sup> els anàlegs més utilitzats. En aquest cas, el fluoròfor s'uneix al final de la cadena de l'àcid gras de la Cer i, per acció de la CDasa, s'obté l'àcid gras fluorescent. També s'ha avaluat l'So derivatitzada amb compostos fluorescents com l'NDA (naftalè-2,3-dialdehid) formada després de la hidròlisi de la Cer per part de la CDasa<sup>194</sup>. La determinació d'activitat CDasa amb tots aquests substrats

requereix la separació cromatogràfica dels reactius i els productes per cromatografia líquida d'alta resolució (HPLC) acoblat a un detector de fluorescència. Per a la determinació de l'activitat CDasa bacteriana s'ha utilitzat un anàleg de Cer que no és fluorescent, la Cer-C10-pyrene, però que ho esdevé després de la hidròlisi de l'enllaç *N*-acil<sup>195</sup>.

Com que les CDases han anat guanyant importància com a noves dianes terapèutiques, s'han desenvolupat inhibidors de CDases com a possibles nous fàrmacs i per a millorar el coneixement del paper de les CDases en diferents sistemes. Molts d'aquests inhibidors han sorgit en provar petites quimioteques de compostos, i altres han estat dissenyats de manera racional. Tot i que s'han esmentat diversos mètodes per a la determinació de l'activitat CDasa, el cribratge de llibreries de compostos requereix metodologies HTS i n'hi ha pocs ja que, com s'ha comentat, la majoria dels procediments esmentats requereixen separació cromatogràfica.

Un dels mètodes HTS és l'ús d'un anàleg de Cer marcada amb dos fluoròfors, l'NBD i el Nile Red, que exerceix transmissió d'energia de ressonància ("fluorescence resonance energy transfer", FRET) i, al ser hidrolitzat per les CDases, permet la determinació de l'activitat enzimàtica a temps real<sup>196</sup>.

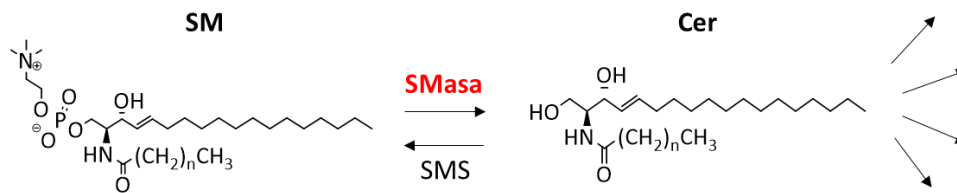
El nostre grup va desenvolupar un mètode HTS que permet determinar l'activitat CDasa a partir de diferents substrats fluorogènics, anàlegs cumarínics de la Cer, anomenats RBM14<sup>161,197</sup> (**Figura 8**). La porció cumarínica, mentre es troba unida a l'estructura de la Cer, no emet fluorescència. Els diferents substrats RBM14 poden ser hidrolitzats per les diferents CDases i el grup aminodiòl resultant s'oxida químicament a un aldehyd, que pateix una  $\beta$ -eliminació espontània que provoca l'alliberament de la umbel·liferona, que és fluorescent. Particularment, l'RBM14C12 és un bon substrat de la AC i, per tant, un bon sistema per al diagnòstic de la malaltia de Farber<sup>161</sup>.



**Figura 8.** Transformació química i enzimàtica dels compostos RBM14 a umbel·liferona.

## 2.2.2 Esfingomielinases

Dels esfingolípidis que hi ha a la membrana plasmàtica, el majoritari és l'SM. L'SM, a la membrana plasmàtica, interacciona amb els glicoesfingolípidis i el colesterol en un entorn fosfolipídic, i formen uns microdominis anomenats rafts<sup>198</sup>. L'any 1989 es va descriure la hidròlisi de l'SM per a generar Cer i fosfocolina mitjançant l'activació d'SMases<sup>199</sup>. En l'anomenat cicle de l'SM, quan hi ha un estímul, entre un 30 i un 40% de l'SM cel·lular és hidrolitzada a Cer per acció de les SMases, i els nivells normals d'SM es recuperen per acció de l'SMS<sup>200</sup> (Figura 9).



**Figura 9.** Les SMases catalitzen la hidròlisi de l'SM per a generar Cer.

La principal funció de l'SM, doncs, és actuar com a reservori de molècules de senyalització cel·lular. Per aquesta raó l'activitat SMasa és molt important, no només per l'augment dels nivells de Cer sinó pels altres esfingolípidis que es generen a partir d'aquesta Cer, com So, S1P o Cer1P, tots ells amb activitats biològiques conegudes. L'activació de les SMases pot ser conseqüència d'una gran varietat d'estímuls extracel·lulars com estrès cel·lular o quimioteràpia. Les SMases es poden dividir en tres grans grups en base al pH òptim per a la seva activitat.

### 2.2.2.1 Esfingomielinasa àcida

L'SMasa àcida (aSMasa), l'SMasa més estudiada, es localitza als lisosomes. La deficiència congènita d'aquest enzim provoca la malaltia de Niemann Pick tipus C<sup>201</sup>. L'SMasa àcida s'activa com a resposta a diferents estímuls externs, com la infecció per part de determinats microorganismes o l'activació d'alguns receptors, i es desplaça des dels compartiments intracel·lulars fins a l'exterior de la membrana plasmàtica<sup>202,203</sup>, on hidrolitza l'SM dels rafts a Cer. La Cer generada forma petits agregats<sup>202</sup> que s'associen espontàniament per formar extensions que s'anomenen plataformes de Cer<sup>204</sup>, que promouen la reorganització de les proteïnes de membrana i la formació d'agregats de receptors<sup>205</sup>. Aquest procés sembla ser clau per a la internalització de determinats patògens i l'inici de processos de senyalització cel·lular<sup>202,206,207</sup>. Per exemple, la infecció per *Pseudomonas aeruginosa* activa l'aSMasa, que incrementa els nivells de Cer i reorganitza els rafts lipídics en plataformes senyalitzadores més grans, que són necessàries per a la internalització cel·lular de la *P. aeruginosa*, induir apoptosi i regular la resposta de

citocines a aquelles cèl·lules infectades<sup>208</sup>. El mateix gen que codifica per l'aSMasa també genera una forma secretada d'SMasa, l'S-SMasa, que és l'encarregada de la hidròlisi de l'SM dels agregats LDL (lipoproteïnes de baixa densitat) de les parets arterials, per tant té un paper important en aterogènesi<sup>209</sup>.

### 2.2.2.2 Esfingomielinases neutres

Hi ha quatre SMases que funcionen a pH neutre (nSMasa): nSMasa1 (codificada per la SM fosfodiesterasa 2, SMPD2), nSMasa2 (SMPD3), nSMasa3 (SMPD4) i l'nSMasa associada a mitocondri MA-nSMasa (SMPD5).

L'aSMasa i l'SMasa alcalina (alc-SMasa) existeixen com a producte únic del seu gen<sup>210,211</sup>, tot i que en el cas de l'aSMasa, com ja s'ha comentat, aquest producte pot estar a lisosoma o en vies de secreció. En canvi, destaquen el nombre i la diversitat en la compartimentalització dels membres de la família de l'nSMasa, fet que suggereix funcions diferents i no solapades per a cada isoforma, relacionades amb les seves localitzacions subcel·lulars.

L'nSMasa1, localitzada al RE<sup>212</sup>, mostra activitat SMasa *in vitro* però no mostra cap efecte en els nivells d'SM o Cer quan se sobreexpressa en cèl·lules MCF-7<sup>213</sup>, tot i que s'ha vist que pot funcionar *in vivo* en alguns casos<sup>214</sup>. En canvi, l'nSMasa2<sup>215</sup>, que localitza a membrana plasmàtica<sup>26,216,217</sup> i Golgi<sup>218</sup>, presenta activitats *in vitro* i *in vivo* i incrementa els nivells de Cer quan se sobreexpressa<sup>218,219</sup>. L'activitat enzimàtica de l'nSMasa2 és dependent de Mg<sup>2+</sup> i s'activa per fosfolípids aniònics com la fosfatidilserina (PS). A més, l'nSMasa2 ha estat implicada en nombrosos processos com la resposta cel·lular a citocines i l'estrès oxidatiu, parada de creixement, desenvolupament i mort cel·lular<sup>219-222</sup>. L'nSMasa3, que es localitza a RE i Golgi<sup>223,224</sup>, té poca homologia de seqüència amb l'nSMasa1 i l'nSMasa2, però també és dependent de Mg<sup>2+</sup> i activada per PS<sup>224</sup>. Finalment, l'MA-nSMasa localitza a mitocondri i RE i també depèn de cations com Mg<sup>2+</sup> i Mn<sup>2+</sup> i activació per fosfolípids aniònics, especialment PS i la cardiolipina mitocondrial<sup>225</sup>.

Les connexions inicials de l'activació de les nSMases en resposta a estrès cel·lular, quimioteràpia, parada de creixement cel·lular i apoptosi van suggerir que eren enzims anticancerígens que promouien la mort cel·lular. Després de més de dues dècades de recerca i la identificació de múltiples isoformes, però, s'ha vist que té efectes tant pro com antitumorígens<sup>226</sup>.

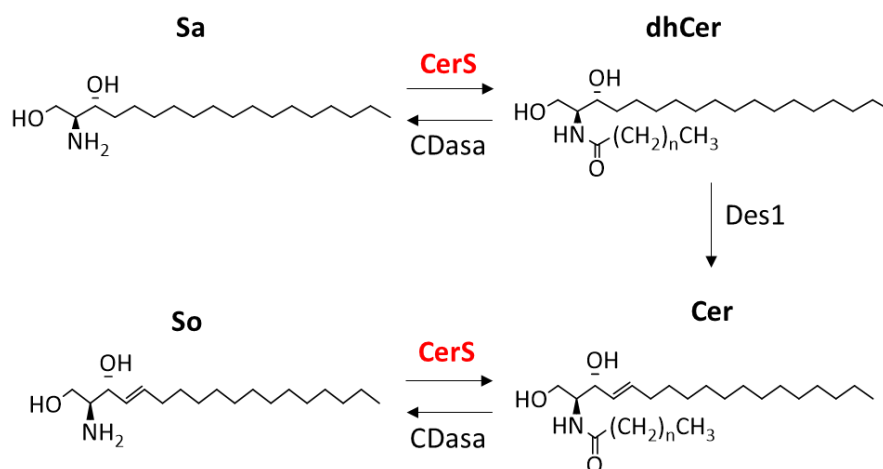
### 2.2.2.3 Esfingomielinasa alcalina

Així com la distribució tissular de l'aSMasa i l'nSMasa és força diversa, l'alc-SMasa es localitza únicament a la mucosa intestinal dels vertebrats<sup>227,228</sup>. S'estimula amb sals biliars<sup>229</sup> i tripsina pancreàtica<sup>230</sup>, i ha demostrat ser un enzim clau en la prevenció del càncer de còlon ja que regula directament els nivells de

Cer<sup>231</sup> i, a més, bloqueja certs factors cancerígens com l'àcid lisofosfatídic<sup>232</sup> o el factor activador de plaquetes (PAF)<sup>233</sup>, que contribueixen a la inflamació, inici, proliferació i metàstasi del càncer de còlon.

### 2.2.3 Ceramida Sintases

Les CerS són un grup de sis enzims (CerS1-6) que catalitzen la formació de dhCer o Cer a través de l'acilació de les bases esfingoides Sa i So respectivament (**Figura 10**), en mamífers, amb diversos acil-CoA<sup>234</sup>.



**Figura 10.** Les CerS catalitzen la formació de dhCer o Cer a través de l'acilació de les bases esfingoides Sa i So, respectivament.

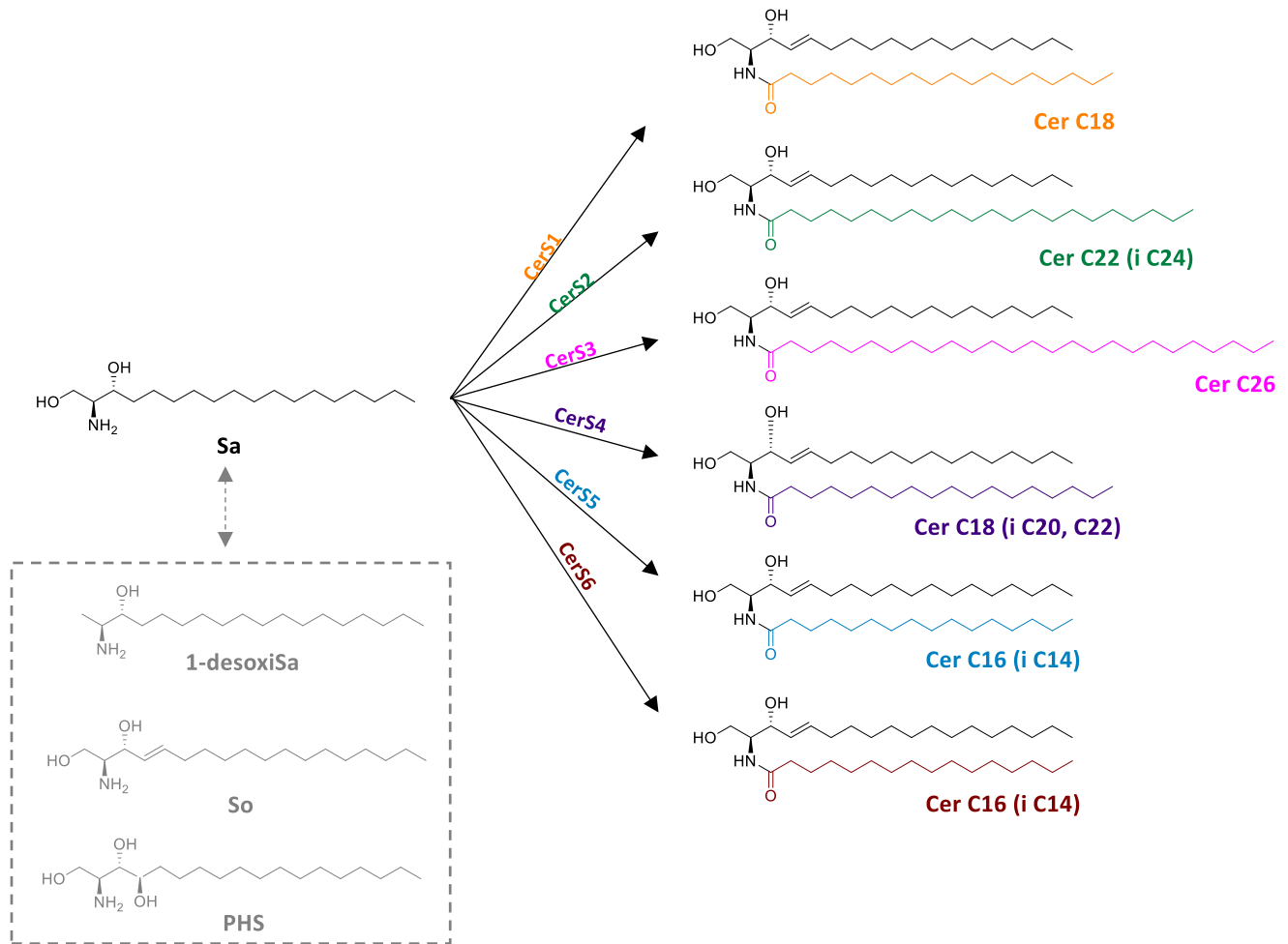
Originalment, la CerS es va trobar buscant gens importants per a la longevitat de llevats, i per això es va anomenar “assegurador de longevitat” (“longevity assurance gene”, LASS)<sup>235,236</sup>. El nom es va reemplaçar per CerS per a definir millor la seva activitat enzimàtica<sup>16</sup>, però s’ha reafirmat el possible paper d’ortòlegs de la CerS en el manteniment de processos fisiològics que influeixen la longevitat<sup>237</sup>.

Les CerS són proteïnes integrals de membrana del RE i la Cer se sintetitza a la cara citosòlica de la membrana del RE<sup>238</sup>. També s’ha atribuït activitat CerS al mitocondri<sup>40,42</sup>. Com que els mitocondris tenen un paper important en l’apoptosi induïda per Cer, els mitocondris podrien estar involucrats directament en la formació de Cer en processos de mort cel·lular. Tot i així, els mitocondris obtinguts per fraccionament subcel·lular podrien contenir membranes de RE (MAM)<sup>239</sup> i, per tant, no es pot descartar que hi hagi contaminacions d’activitat CerS derivada de RE. S’ha demostrat la relocalització regulada de la CerS1 del RE a l’aparell de Golgi després d’estímuls d’estrès i això podria suggerir un fenomen més general de la compartimentalització de les CerS<sup>240</sup>.

Tot i que no s'ha resolt experimentalment encara la topologia transmembrana de les CerS de mamífer, la comparació de diversos programes de predicció suggereix que la CerS té sis dominis que travessen la membrana. Tot i així, hi ha desacords entre els diversos programes de predicció en el quart domini transmembrana: alguns programes suggereixen un domini que travessa la membrana en aquesta regió i, altres, dos<sup>241</sup>. Dades experimentals suporten un nombre imparell de dominis transmembrana<sup>242</sup>.

El domini TLC (Tram-Lag-CLN8) és una regió d'uns 200 residus que es troba en diferents proteïnes, i és un domini compartit entre totes les CerS de mamífer<sup>243</sup>. Dins d'aquesta regió, el motiu Lag1p és una seqüència conservada de 52 aminoàcids<sup>236</sup> que es considera que està involucrada en l'activitat CerS, amb alguns residus conservats que probablement estan implicats en la catàlisi o unió de substrat<sup>243</sup>. Totes les CerS de mamífer excepte la CerS1 tenen un domini Hox<sup>244</sup> i els seus últims 12 residus són importants pel funcionament de l'activitat CerS, ja que la seva modificació o eliminació porta a la pèrdua d'activitat CerS<sup>245</sup>.

Cada un dels sis enzims CerS és el producte de gens únics localitzats a cromosomes diferents<sup>16</sup> i tenen característiques diferents<sup>246</sup>. Una de les característiques més notables de les CerS és l'habilitat de cada isoforma per a produir Cer amb una distribució característica de la cadena acil. Cada CerS utilitza un conjunt restringit d'acil-CoA grassos per a sintetitzar Cer amb una llargària de la cadena acil definida (**Figura 11**). S'ha demostrat que una regió de 150 residus del domini TLC és suficient per a mantenir l'especificitat de la CerS<sup>241</sup>. Les CerS tenen menor especificitat per la cadena de la base esfingòide, ja que són capaces d'*N*-acilar gran varietat de bases esfingòides naturals de cadena llarga (dhSo, So, PHS o 1-desoxiSa)<sup>247</sup> i també els seus anàlegs, com la Fumonisina B1<sup>248</sup>, NBD-Sa<sup>249</sup> i FTY720<sup>250</sup>.



**Figura 11.** Especificitat de les CerS. Diferents isoformes de CerS poden utilitzar un grup restringit d'acil-CoA i produir Cer amb una llargada específica de la cadena d'àcid gras. Les CerS mostren menys especificitat cap a les bases esfingoides: la síntesi de Cer s'origina a partir d'Sa produïda a la via sintètica *de novo* dels esfingolípid; l'1-desoxiSa, l'So i la PHS representen substrats naturals alternatius de les CerS.

S'han fet diversos estudis sobre la distribució tissular de les CerS de mamífer i s'ha vist que hi ha diferents perfils d'expressió de CerS a cada teixit i que poden canviar durant el desenvolupament. La CerS1 s'expressa bàsicament a cervell i, en menor nivell, a múscul esquelètic i testicles<sup>251</sup>. S'expressa en més quantitat de manera post-natal, segurament per la síntesi de membrana plasmàtica neuronal<sup>252</sup>. La CerS2 s'expressa de manera molt més àmplia que no la CerS1 i és abundant en molts teixits, principalment ronyó i fetge<sup>251,253</sup>. La CerS3 es troba principalment a pell i testicles<sup>254</sup>, s'expressa molt en queratinòcits i l'expressió de CerS3 incrementa durant la seva diferenciació<sup>255</sup>. Hi ha menys informació sobre la CerS4, que s'ha trobat en nivells elevats a pell, leucòcits, cor i fetge. Tot i així, els nivells absoluts d'expressió d'mRNA de CerS4 en aquests teixits és significativament més baix que els de les altres CerS, com la CerS2<sup>251</sup>. La CerS5 és la CerS principal de l'epiteli de pulmó<sup>256</sup>. L'mRNA de la CerS5 es detecta a quasi totes



les cèl·lules de matèria blanca i grisa al cervell<sup>252</sup>. La CerS6 té elevada homologia amb la CerS5 i, tot i que se sap molt menys sobre la CerS6, es troba a diferents teixits com l'intestí i el ronyó<sup>251</sup>. Durant el desenvolupament del cervell de ratolí s'ha descrit una disminució en els nivells d'expressió de CerS6 i CerS2, especialment en cèl·lules productores de mielina<sup>252</sup>. S'ha observat que els nivells d'expressió d'mRNA de CerS no sempre es correlacionen amb la composició de la cadena acil dels esfingolípidis en un teixit determinat, i això suggereix que les CerS regulen una gran varietat de mecanismes reguladors d'activitat i post-traducció i determinen la presència de Cer amb cadenes acil específiques<sup>251</sup>.

La CerS està implicada en la regulació fisiològica de la síntesi *de novo* dels esfingolípidis, amb l'acilació de l'Sa, i també en el reciclatge d'So originada pel catabolisme d'esfingolípidis complexos<sup>234</sup> (**Figura 10**). Per tant, el paper de la CerS en processos fisiològics i patològics està relacionat estrictament amb els efectes biològics de les molècules que estan regulades per aquest enzim. Les Cer, dhCer i els seus precursors, So i dhSo, tenen un paper important com a molècules de senyalització en diferents processos incloent creixement cel·lular, apoptosi i diferents malalties.

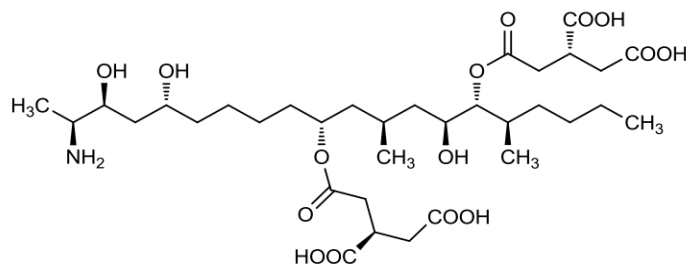
Tot i que la implicació directa de les CerS en processos patològics no es comprèn completament, alguns exemples d'alteracions genètiques de la CerS suggereixen la seva implicació en malalties humanes. Un estudi genètic sobre el despreniment de retina, una causa important de pèrdua de visió, va mostrar associació amb un codó amb canvi de sentit d'un nucleòtid del gen de la CerS2<sup>257</sup>. El bloqueig de la síntesi de Cer va tenir efectes protectors en un model de ratolí amb retinitis pigmentosa<sup>258</sup> i en degeneració de retina induïda per llum<sup>259</sup>. Per tant, és raonable considerar la implicació de Cer de cadena molt llarga, o els seus corresponents metabòlits, en desordres de retina. A més, mutacions al gen de la CerS3 s'han relacionat amb un destorb en la queratinització anomenat ictiosi, per tant les Cer de cadena molt llarga són importants en la formació i funció de l'epidermis humana<sup>260,261</sup>.

S'han generat ratolins nuls per CerS que han aportat altra informació sobre la biologia de les CerS<sup>262</sup>. La disminució de Cer amb una llargada de cadena específica deguda a la depleció de la isoforma corresponent de CerS està relacionada amb nivells elevats de diferents espècies de Cer. Es destaca la rellevància de les funcions de les diferents espècies de Cer perquè, tot i així, en la majoria de casos, aquests reemplaçaments no eviten diverses alteracions en el fenotip de ratolins. Es van generar ratolins deficientes per CerS4<sup>263</sup>, amb Cer de C18 i C20 disminuïdes i nivells més elevats de Cer de cadena molt llarga, que tenien pèrdua de cabell dependent de l'edat. En concordança amb aquest estudi, es va

informar d'un fenotip igual en un estudi diferent que va mostrar el rol crucial de la CerS4 en l'homeòstasi de cèl·lules mare o progenitores de l'epidermis i regulació del cicle fol·licular capil·lar<sup>264</sup>.

Tot i que el coneixement sobre l'especificitat de la CerS i els diferents rols de Cer amb diferent llargada de cadenes acil ha incrementat notablement els últims anys, els inhibidors de CerS disponibles no mostren especificitat per les diferents isoformes dels enzims excepte un, P053, que s'ha descrit recentment i té especificitat per la CerS1<sup>265</sup>.

La Fumonisina B1 (FB1) (**Figura 12**) és l'inhibidor més utilitzat i caracteritzat de la CerS i pertany una família de toxines d'origen fúngic (*Fusarium verticilloides*). Es troba com a contaminant en cereals i la seva ingesta causa diverses malalties en humans i animals<sup>266-268</sup>. La FB1 és responsable de la desregulació del metabolisme dels esfingolípid, i això representa un dels mecanismes proposats pel seu efecte tòxic<sup>268-270</sup>. Inhibeix la CerS de forma competitiva<sup>271</sup> amb una IC<sub>50</sub> de 100 nM<sup>239</sup> i causa una acumulació de dhSo i, en menys quantitat, d'So. S'ha detectat parada de cicle cel·lular<sup>272</sup> i apoptosi<sup>273,274</sup> en diverses línies cel·lulars després de ser tractades amb FB1, en correlació amb l'acumulació de bases esfingoides. Altres efectes de la FB1 en el metabolisme d'esfingolípid inclouen l'increment d'S1P<sup>275</sup> i dhS1P<sup>270</sup> i, al seu torn, d'aldehid gras i etanolamina fosfat<sup>269</sup>, així com depleció d'esfingolípid complexos<sup>271</sup>.



**Figura 12.** Estructura química de la Fumonisina B1.

Hi ha altres inhibidors de la CerS, com la toxina d'*Alternaria alternata* (AAT) i l'australifungina, totes dues d'origen fúngic. L'AAT està relacionada estructuralment amb les fumonisines i causa acumulació de bases esfingoides<sup>276</sup> mentre que l'australifungina<sup>277</sup> és un compost antifúngic amb diferents característiques estructurals dels esfingolípid. Una altra molècula que inhibeix la CerS és FTY720, un compost semblant a una base esfingoida que també actua com a antagonista dels receptors d'S1P<sup>278</sup>.

### 3. Esfingolípidis naturals

Els SLs no són presents només en mamífers sinó que es troben també en altres organismes, tant del regne procariota com de l'eucariota<sup>279</sup>. La multiplicitat de les vies biosintètiques implicades en els diferents organismes és responsable de la diversitat estructural que hi ha de les bases esfingoides naturals<sup>280</sup>. La varietat d'aquestes molècules naturals representa una font remarcable de compostos pel disseny d'anàlegs sintètics amb aplicacions terapèutiques. Alternativament, representen eines farmacològiques adients per la recerca biomèdica bàsica.

#### 3.1 Inhibidors naturals del metabolisme d'esfingolípidis

Entre els eucariotes, els fongs representen una àmplia font de micotoxines i altres metabòlits que exhibeixen activitats biològiques diverses<sup>281</sup>. Particularment, els anàlegs d'SLs procedents de fongs poden alterar el metabolisme dels SLs inhibint enzims claus per a la via metabòlica.

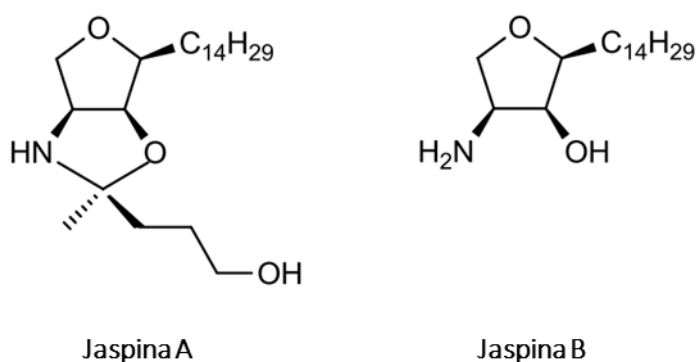
Aquest és el cas d'inhibidors de la SPT com les esfingofungines<sup>282</sup>, la lipoxamicina<sup>283</sup> i el compost més utilitzat, la miriocina<sup>284</sup>. Aquests metabòlits són substrats de l'enzim i donen lloc a formes aberrants d'un intermediari transitori de la reacció de la SPT. A més, es va veure que inhibeixen l'enzim de fong i de mamífer en preparacions sense cèl·lules amb valors d'IC<sub>50</sub> en un rang nanomolar<sup>7</sup>. Modificacions estructurals de la miriocina, que té propietats immunosupressores<sup>285</sup>, van donar lloc a FTY720, un compost que s'utilitza pel tractament de l'esclerosi múltiple<sup>286–288</sup> i que és estudiat com un agent anticancerígen per les seves propietats com a inhibidor de l'SK<sup>289,290</sup>, i també és inhibidora de l'S1PL<sup>291</sup>.

Les fumonisines són una família de toxines de fong que comparteixen semblances estructurals amb les bases esfingoides i inhibeixen la CerS<sup>269,292</sup>. Entre elles, la FB1 és el compost d'elecció utilitzat per la investigació de la inhibició de la CerS. La caracterització de la FB1 i els efectes biològics relacionats amb la inhibició de la CerS s'han tractat a l'apartat 2.2.3 junt amb altres metabòlits fúngics que també inhibeixen la CerS.

Aquests exemples ressalten la importància de molècules naturals que, per la seva similitud amb SLs naturals, poden alterar activitats enzimàtiques i conseqüentment el balanç entre les molècules bioactives. A més, serveixen com a base per a la síntesi de noves molècules amb l'objectiu de millorar les propietats farmacològiques i els efectes dels compostos originals.

### 3.2 Anàlegs d'esfingolípids en organismes marins: Jaspina B

La Jaspina B (JB, pachastrissamina) és un derivat natural de la phSo que resulta de la ciclodeshidratació entre els grups hidroxil del C1 i el C4 de l'esquelet esfingoide (**Figura 13**). Es va aïllar per primer cop de l'esponja marina *Pachastrissa sp.* per Kuroda i col. l'any 2002<sup>293</sup> i, subseqüentment, de l'esponja *Jaspis sp.*, junt amb el seu anàleg Jaspina A (**Figura 13**), per Ledroit i col., l'any 2003<sup>294</sup>. Estudis inicials en la viabilitat cel·lular van indicar que la JB era citotòxica en diferents línies cel·lulars tumorals com P388, MEL28, A549, HT29 i HeLa<sup>293-295</sup> i que induïa apoptosi i autofàgia en diverses línies cel·lulars de ratolí i d'humà<sup>296-298</sup>.



**Figura 13.** Estructura química de les jaspines naturals.

Com que té una activitat biològica intrigant, la JB ha estat una diana interessant per la síntesi química a través de diferents rutes sintètiques<sup>49,299,300</sup>. A més, es van produir anàlegs de la JB modificant l'heterocicle<sup>301,302</sup> o canviant la cadena alifàtica<sup>303</sup>; tot i així, aquestes modificacions no van millorar gaire la citotoxicitat de la JB.

La JB, com a anàleg de l'So, és inhibidora de la CerS<sup>304</sup>. El primer estudi que va investigar més a fons els efectes biològics de la JB va revelar que la citotoxicitat en cèl·lules de melanoma de ratolí (B16) i humanes (SK-Mel28) estava relacionada amb interferència en el metabolisme dels SLs a través de la via d'apoptosi típica, alliberament del CitC i processament de caspasa associat a nivells elevats de Cer. En particular, la SMS va ser proposada com a diana putativa de la JB pels efectes observats en les cèl·lules B16<sup>296</sup>. Es van reportar altres efectes biològics dels anàlegs estructurals i els isòmers de l'esfingolípido natural. Per exemple, una sèrie de cinc estereoisòmers "aza-anàlegs" de la Jaspina B ("aza-JB") (**Figura 14, A**) van mostrar efectes citotòxics contra diverses línies cel·lulars de melanoma, amb potències comparables a la de la JB. Alguns d'ells van impedir la conversió de Cer a SM en cèl·lules B16, en concordança amb els

efectes observats per la JB natural<sup>305</sup>. La investigació dels mecanismes moleculars que activen apoptosi en cèl·lules de càncer de melanoma suggereix que la inhibició d'ERK hi està involucrada<sup>306</sup>.

El nostre grup va sintetitzar la JB amb la configuració natural i tres diastereoisòmers de la JB anomenats 2,3-epi, 2-epi i 3-epi JB (**Figura 14, B**). La JB va resultar ser la molècula més citotòxica; els altres compostos eren 10-20 vegades menys tòxics<sup>297</sup>. Aquestes quatre molècules, junt amb els seus enantiòmers (**Figura 14, C**) van exhibir activitat inhibidora entre moderada i potent contra SK1 i SK2. A més, PKC atípiques van ser inhibides per diversos estereoisòmers de la JB<sup>300</sup>.

També es van sintetitzar anàlegs de tipus 1,2,3-triazol-JB (**Figura 14, D**), amb diferent llargada de la cadena hidrocarbonada, i es va avaluar la seva citotoxicitat en tres línies tumorals humanes (EC-9706, MGC-803 i MCF-7). Els anàlegs amb cadena lateral d'entre C14 i C18 van resultar ser força tòxics<sup>307</sup>.

El grup de Kwon i col. va sintetitzar diferents anàlegs carbocíclics de la JB (**Figura 14, E**) i va avaluar-ne la seva citotoxicitat i inhibició sobre SK. Els anàlegs amb cadena de llargada diferent a la de la JB natural (tant més llarga com més curta) eren menys tòxics que la JB natural<sup>299</sup>. Tot i així, Rozié i col. van descriure l'any 2018 un anàleg de JB, que van anomenar 10b, amb la cadena alifàtica més llarga (C16) que la de la JB natural (C14) i que, per primer cop, va resultar ser més citotòxic que la pròpia JB natural<sup>308</sup>.

Per a avaluar el paper del grup amino en la toxicitat de la JB també es van sintetitzar, al nostre grup, anàlegs de JB acilada amb àcids grassos de C<sub>8</sub> i C<sub>16</sub> (C<sub>8</sub>-JB i C<sub>16</sub>-JB) i N<sub>3</sub>-JB (**Figura 14, F**). Cap d'ells no va tenir efectes citotòxics, i això indica que el grup amino lliure és necessari per a l'activitat citotòxica de la JB<sup>304</sup>.

En resum, tots aquests resultats indiquen que una llargada apropiada de la cadena hidrocarbonada, així com el grup amino lliure, són necessaris per a mantenir les propietats citotòxiques dels derivats de la JB.

Per la seva bioactivitat i citotoxicitat en diverses línies cel·lulars, la JB representa una molècula prometedora pel desenvolupament de tractaments i és una eina farmacològica de gran valor per a entendre millor les bases moleculars de les alteracions cel·lulars relatives al càncer.

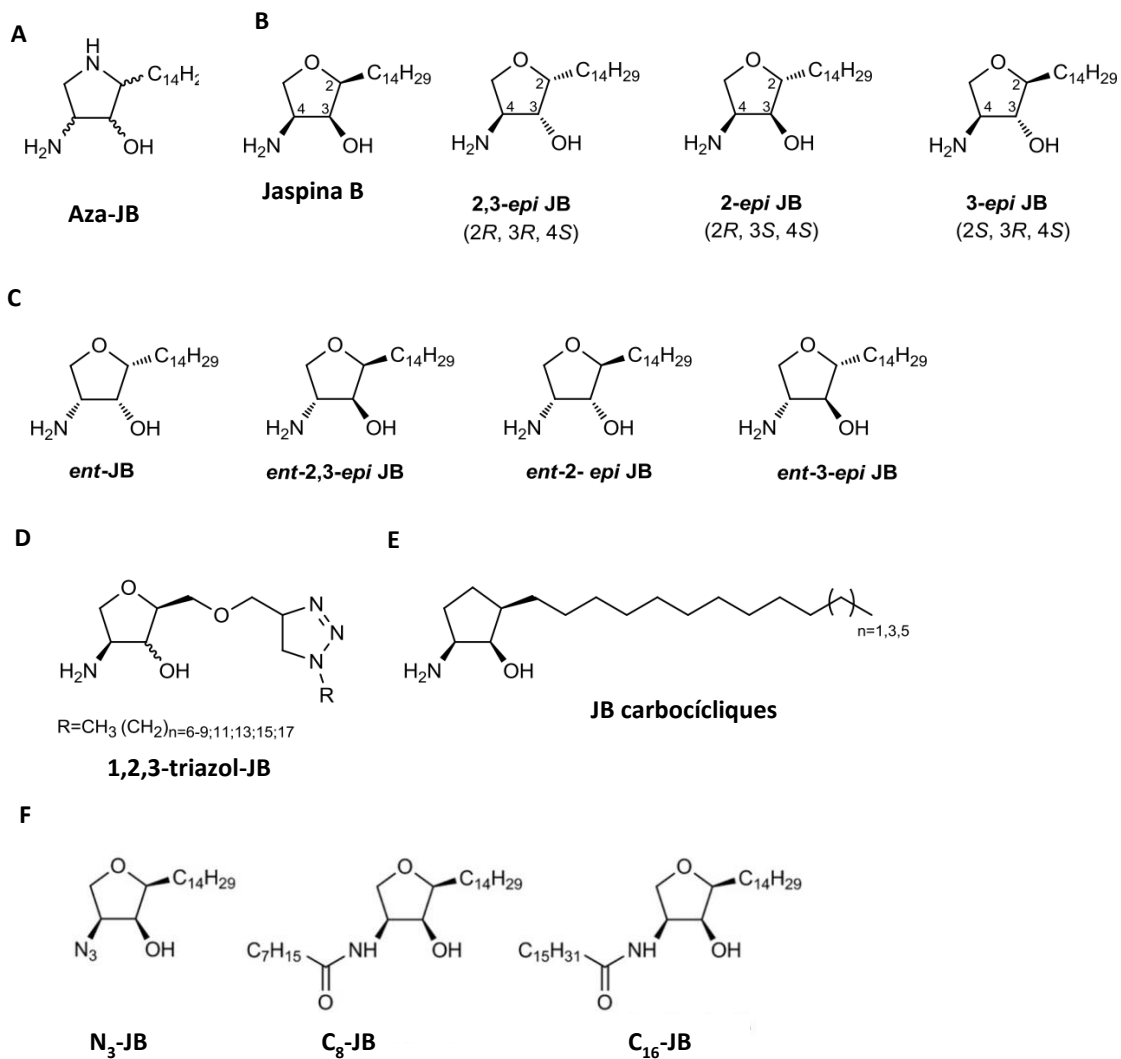


Figura 14. Estructures dels anàlegs i isòmers de la JB.

## 4. Mecanismes de mort cel·lular

Igual que els organismes que constitueixen, les cèl·lules també moren de maneres diferents. La mort pot ser predeterminada, programada, i executada netament, com en el cas de l'apoptosi, o pot ser traumàtica, inflamatòria i sobtada, com exemplifiquen diversos tipus de necrosi.

L'any 1842 es va descriure el concepte de mort cel·lular natural quan Karl Vogt va demostrar que el notocordi dels *Alytes* (amfibis com el tòtil, un petit gripau), era eliminat per mort cel·lular durant la metamorfosi i això permetia la formació de les vèrtebres<sup>309</sup>. Tot i així, durant molts anys es va assumir que la mort cel·lular era un final passiu i inevitable per la vida. Aquesta noció va canviar quan es va observar a mitjans de 1960 que la mort cel·lular durant el desenvolupament depenia de l'expressió de gens endògens, i va sorgir el concepte de mort cel·lular programada<sup>310,311</sup>.

La mort cel·lular representa un mecanisme homeostàtic en la fisiologia cel·lular, però la seva desregulació és una característica important en moltes malalties humanes com càncer, ictus o neurodegeneració, i la regulació d'aquesta resposta cel·lular ha resultat ser una estratègia terapèutica efectiva<sup>312</sup>. L'habilitat de modular la vida o mort d'una cèl·lula té un immens potencial terapèutic.

L'apoptosi i la necrosi són les dues formes principals de mort cel·lular. Tot i que inicialment es pensava que eren dos estats cel·lulars mútuament excloents, s'ha vist que alguns contextos cel·lulars requereixen part d'aquests dos tipus diferents de mort cel·lular de manera regulada<sup>313</sup>. L'autofàgia, tot i que s'ha descrit més recentment, també ha estat ben caracteritzada a nivell molecular<sup>314</sup>, i també ha estat lligada amb apoptosi i necrosi, ja sigui jugant un paper pro-supervivència o pro-mort<sup>313</sup>.

Esdeveniments que poden portar a apoptosi inclouen catàstrofe mitòtica i anoikis. La necrosi, tot i que ha estat considerada una mort cel·lular abrupta i no coordinada, té diversos esdeveniments moleculars associats. Hi ha mecanismes de mort cel·lular que comparteixen algunes característiques amb la necrosi. Entre aquests mecanismes hi ha metuosi, necroptosi, netosi i piroptosi. L'autofàgia, generalment una via catabòlica que opera per a assegurar la supervivència cel·lular, també pot matar les cèl·lules a través de mecanismes com l'autosi. Altres tipus de mort cel·lular inclouen entosi, ferroptosi, mort cel·lular dependent de lisosomes, i parthanatos<sup>315</sup>.

En l'última dècada, el comitè de nomenclatura de la mort cel·lular ("Nomenclature Committee of Cell Death", NCCD) va formular guies per la definició i la interpretació de la mort cel·lular des d'una perspectiva morfològica, bioquímica i funcional<sup>316</sup>. Com que el camp es continua expandint i es revelen mecanismes nous a través de múltiples vies de mort cel·lular, va proposar una classificació actualitzada

dels tipus de mort cel·lular centrada en els aspectes mecànics i essencials (no correlatius i prescindibles) dels processos<sup>317</sup>.

En aquesta secció es reporta una visió general de diferents mecanismes de mort cel·lular, amb especial atenció a apoptosi, autofàgia i metuosi.

## 4.1 Apoptosi

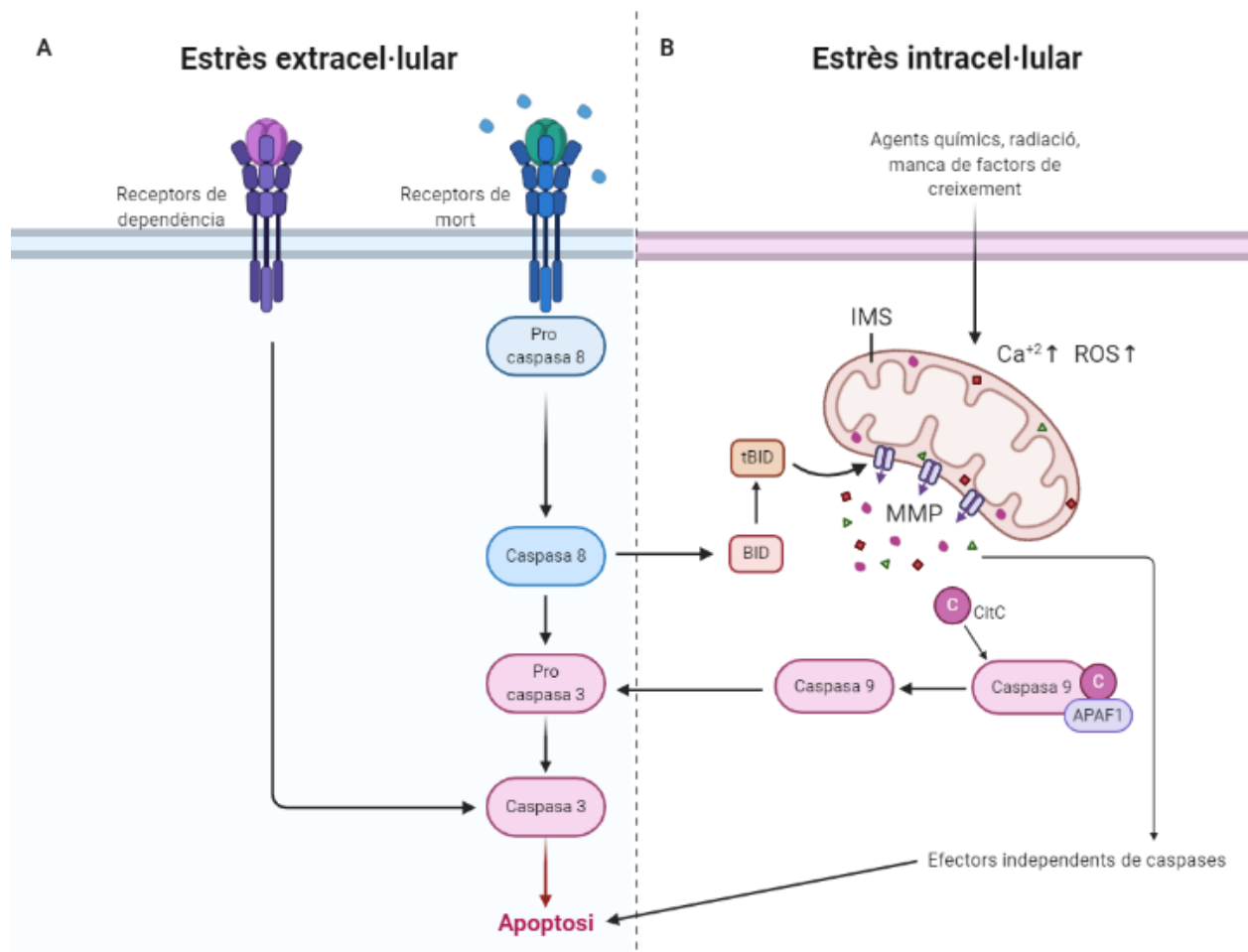
L'apoptosi és un mecanisme molt ben conegut de mort cel·lular programada que és activat durant el desenvolupament i l'envelliment com a mecanisme homeostàtic per a mantenir les poblacions cel·lulars als teixits. Es considera un component vital de diversos processos, incloent la regeneració normal de cèl·lules, el desenvolupament i funcionament del sistema immunitari, atròfia dependent d'hormones, desenvolupament embrionari i mort cel·lular induïda per un agent químic, entre d'altres. Una apoptosi desregulada, ja sigui massa o massa poc, és un factor en diverses condicions humanes com malalties neurodegeneratives, dany isquèmic, desordres autoimmunitàtics i molts tipus de càncer<sup>318</sup>. Les cèl·lules canceroses sovint presenten defectes en la maquinària d'apoptosi i això els dona avantatge per sobreviure. Per exemple, en cèl·lules canceroses s'ha observat activació de factors anti-apoptòtics, com la sobreexpressió de la família de proteïnes anti-apoptòtiques (Bcl-2, Bcl-XL i Mcl-1) i activació de vies de senyalització pro-supervivència, com la de PI3K-Akt, que ajuden a resistir els inductors de mort. També s'ha observat inactivació de factors pro-apoptòtics, com la proteïna Bax o la via de senyalització de p53. Aquests canvis en cèl·lules tumorals acaben provocant resistència a diferents teràpies. Així, els objectius principals pel desenvolupament de teràpies contra el càncer estan centrats en millorar l'eficàcia i la selectivitat terapèutica i vèncer la resistència a diferents teràpies<sup>319</sup>.

L'apoptosi té unes característiques ben definides: encongiment cel·lular, condensació de la cromatina, degradació del DNA per DNases endògenes, fragmentació nuclear i formació de cossos apoptòtics. Els cossos apoptòtics consisteixen en citoplasma amb orgànuls empaquetats amb o sense fragments nuclears<sup>320</sup>. Aquests cossos són fagocitats per macròfags i degradats en fagolisosomes<sup>321</sup>, així s'evita el procés inflamatori.

L'apoptosi pot ser activada tant per estímuls extrínsecs a través de receptors de mort cel·lular de la superfície cel·lular (com els receptors TNF $\alpha$ , Fas o TRAIL) o d'estímuls intrínsecs, com un augment de concentració intracel·lular de Ca<sup>+2</sup> o una generació excessiva d'espècies reactives d'oxigen a través de la via de senyalització mitocondrial, caracteritzada per la permeabilització de la membrana mitocondrial,



com es mostra a la **Figura 15** *Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.*<sup>322</sup>. En tots dos casos, l'activació de cisteïnil-aspartat proteases, anomenades caspases, és un punt clau en aquest procés.



**Figura 15.** Vies extrínseca i intrínseca de l'apoptosi. L'apoptosi pot resultar de l'activació de dues cascades bioquímiques que resulten en l'activació de caspases: les vies extrínseca (A) i intrínseca (B). La permeabilització de la membrana mitocondrial ("mitochondrial membrane permeabilization", MMP) marca un punt de no retorn en la via mitocondrial, activant mecanismes dependents i independents de caspases que acaben portant a la mort cel·lular. Quan té lloc la MMP, la proteïna de l'espai intermembranós ("mitochondrial intermembrane space", IMS) citocrom C és alliberat al citosol i interacciona amb el factor activador de l'adaptador de la proteïna apoptòtica peptidasa 1 ("adaptor protein apoptotic peptidase activating factor 1", APAF1) i amb la pro-caspasa 9 per a formar l'apoptosoma, que comporta l'activació de la caspasa 3. Alternativament, les proteïnes IMS activen efectors independents de caspases. Un dels lligams principals entre l'apoptosi extrínseca i la intrínseca és la proteïna BID, amb domini 3 d'homologia Bcl-2 (BH3), que pot promoure MMP després de ser truncada per la caspasa 8. dATP, desoxiadenosina trifosfat, tBID, BID truncada. Adaptat de Galluzzi i col., 2009.

En la via extrínseca el complex supramolecular inductor de mort (“death-inducing signalling complex”, DISC) regula l’activació de la caspasa 8 i, en la via mitocondrial, l’apoptosoma activa la caspasa 9. Totes dues vies convergeixen amb l’activació de la caspasa 3<sup>317</sup>, que porta al procés catabòlic que caracteritza l’apoptosi. Els processos apoptòtics estan regulats per la família de proteïnes Bcl-2, que inclou Bcl-XL, Bad i Bim. Les proteïnes inhibidores d’apoptosi (“inhibitor of apoptosis protein”, IAPs) són una família de proteïnes que regulen la cascada de caspases i poden influenciar les vies intrínseca i extrínseca. Un altre regulador fonamental de l’apoptosi és p53, ja sigui activant l’expressió de proteïnes pro-apoptòtiques o de manera independent de transcripció, interaccionant amb proteïnes anti-apoptòtiques<sup>323</sup>.

Alternativament, desencadenants pro-apoptòtics que causen permeabilització de la membrana mitocondrial també indueixen apoptosi en absència d’activitat de caspases, i així provoquen apoptosi independent de caspases<sup>316,324</sup>. Després de la permeabilització de la membrana mitocondrial, diverses proteïnes de l’espai intermembranós són alliberades al citoplasma i causen alteracions cel·lulars com dany al DNA, pèrdua progressiva del funcionament de la cadena respiratòria i reducció del potencial de membrana mitocondrial, que porta a una crisi bioenergètica i acaba provocant mort cel·lular<sup>324</sup>.

## 4.2 Necrosi

En contrast amb l’apoptosi, la necrosi es considerava tradicionalment una forma de mort cel·lular no regulada. Més tard, però, hi va haver evidència genètica, i també el descobriment d’inhibidors químics de la necrosi, que van canviar la idea de mort cel·lular “accidental” i van revelar l’existència de múltiples vies de necrosi regulada<sup>325</sup>.

La necrosi pot ser accidental o regulada. El NCCD insta a utilitzar el terme accidental en aquelles morts cel·lulars amb característiques morfològiques necròtiques que es desencadenen per estímuls citotòxics extrems i que no es poden inhibir ni a nivell genètic ni farmacològic<sup>317</sup>. La necrosi regulada és a través de vies moleculars definides. El tipus de necrosi regulada més ben definit és la necroptosi, una mort cel·lular programada no apoptòtica, conduïda per quinases de la família de la proteïna d’interacció amb el receptor (“receptor-interacting protein”, RIP)<sup>326–328</sup>, i que depèn sobretot de l’activitat de les proteïnes RIPK1 i RIPK3<sup>329</sup>. El fet de conèixer les bases moleculars de la necroptosi i d’altres tipus de mort regulada per necrosi permet interferir terapèuticament en la necrosi.

Les cèl·lules que moren per necrosi exhibeixen canvis en la morfologia nuclear però no de manera organitzada, típica de l’apoptosi<sup>330</sup>. Aquest tipus de mort cel·lular es caracteritza per inflor citoplasmàtica

i ruptura de la membrana cel·lular, que comporta l'alliberament dels components cel·lulars i una resposta inflamatòria en el teixit<sup>325</sup>.

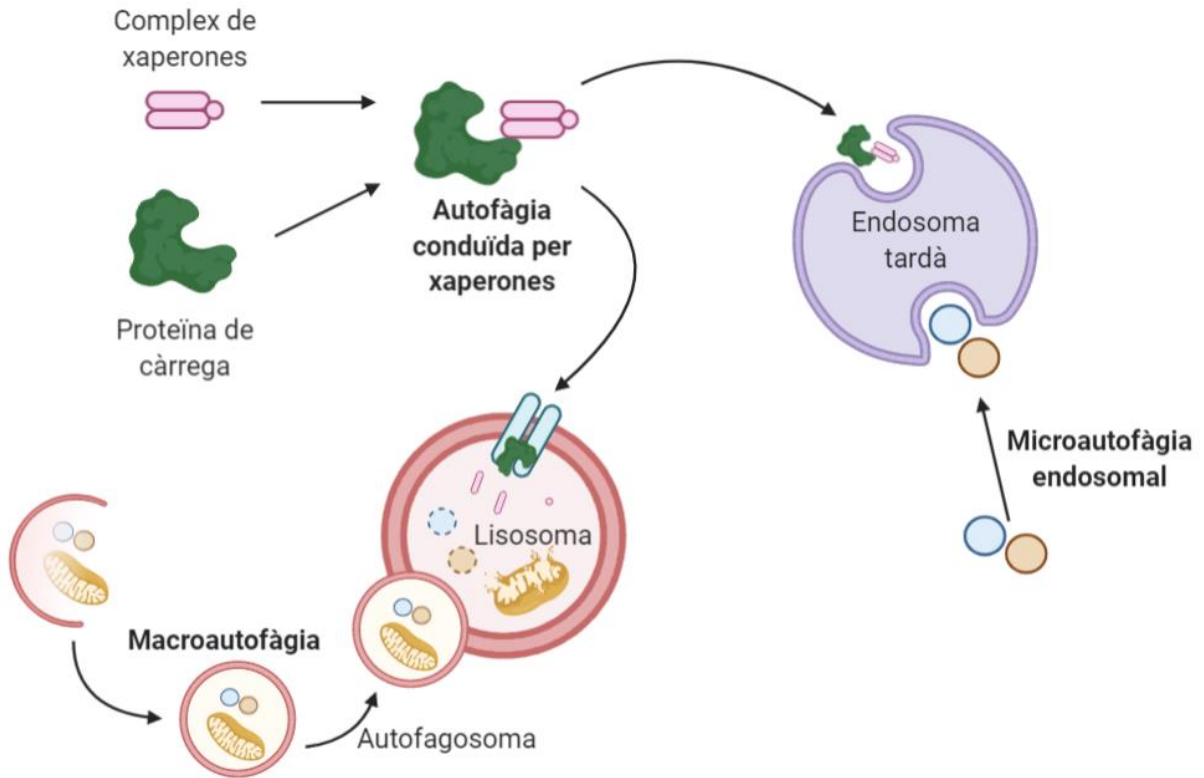
### 4.3 Autofàgia

L'autofàgia és un procés catabòlic dinàmic en el que determinades proteïnes i orgànuls cel·lulars són degradats per acció dels enzims lisosomals<sup>331</sup>. El mot autofàgia prové de les paraules gregues “autós” (que actua 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. Actua a nivells basals, assegurant una eliminació continua d'entitats danyades o no funcionals, incloent proteïnes, orgànuls i/o les seves porcions. A més, el flux autofàgic pot estar regulat a l'alça en resposta a un ampli panell d'estímuls, ja siguin nutricionals, metabòlics, oxidatius o patogènics i, per tant, representa una resposta adaptativa a l'estrès amb funcions citoprotectores<sup>332</sup>. També és un procés necessari en la remodelació de teixits durant el desenvolupament i en la resistència davant d'infeccions<sup>333</sup>. Tot i així, una activació excessiva de la maquinària d'autofàgia també pot portar a mort cel·lular<sup>334</sup>, sent doncs un altre tipus de mort cel·lular programada.

El catabolisme cel·lular està format principalment per dues 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.

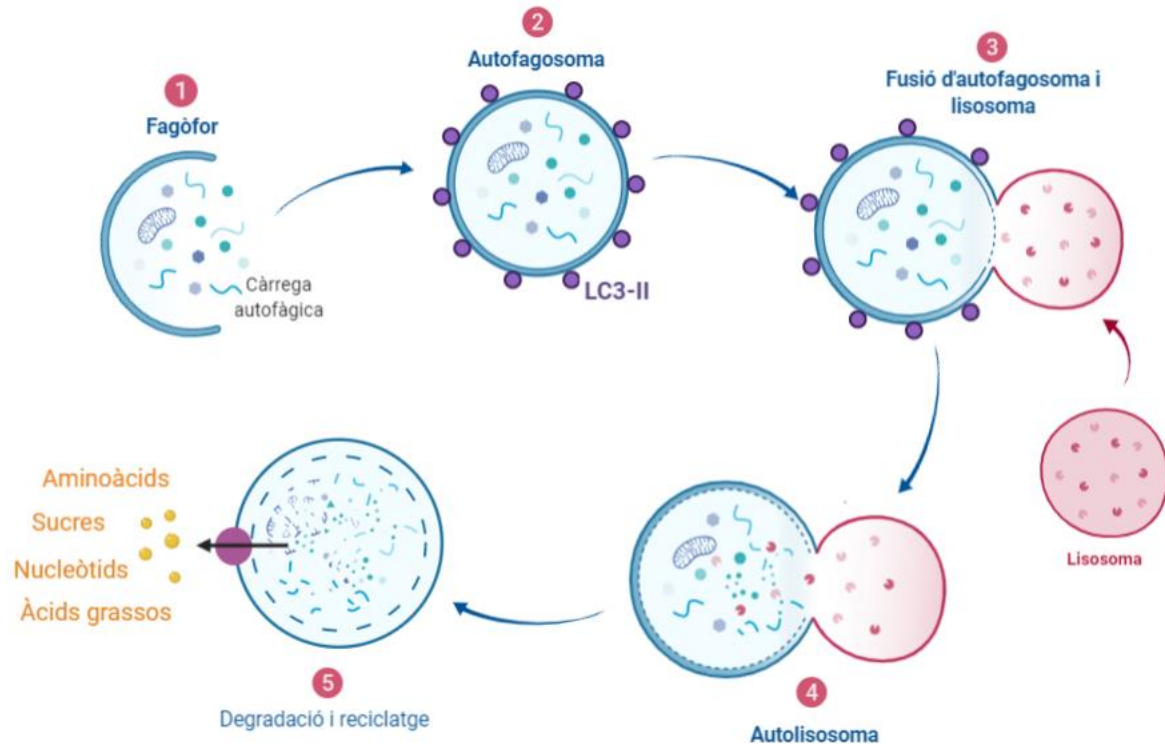
En les cèl·lules de mamífer existeixen tres tipus d'autofàgia: macroautofàgia, microautofàgia i autofàgia conduïda per xaperones (“chaperone-mediated autophagy”, CMA)<sup>335</sup>, representades a la **Figura 16**.

En la microautofàgia 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 la CMA les proteïnes amb la seqüència KFERQ són reconegudes i conduïdes al lisosoma per a ser degradades de manera selectiva mitjançant complexos de translocació (en lloc de l'ús de vesícules, com en macroautofàgia). 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)<sup>336</sup>.



**Figura 16.** Tipus d'autofàgia: macroautofàgia, microautofàgia i autofàgia conduïda per xaperones. Adaptat de Schneider i col., 2014.

La macroautofàgia, anomenada comunament "autofàgia", és un procés amb diverses etapes successives que es mostren en la **Figura 17**. Es caracteritza per la formació d'unes vesícules de doble membrana denominades autofagosomes que capturen material citoplasmàtic i el transporten fins als lisosomes<sup>332,337</sup>. Aquesta doble membrana s'origina a partir del fagòfor, una estructura membranosa formada per lípids i proteïnes, també anomenada membrana d'aïllament, que va creixent fins a formar la vesícula. L'origen exacte del fagòfor és desconegut, però sembla ser que prové de l'omegasoma, un subdomini membranós del RE enriquit amb el lípid fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P)<sup>338,339</sup>.



**Figura 17.** Organització general del procés d'autofàgia. L'autofàgia s'inicia amb una segregació progressiva del material citoplasmàtic en estructures de doble membrana anomenades fagòfors. Els fagòfors s'originen a partir del RE, però s'ha vist que altres orgànuls membranosos, com l'aparell de Golgi, el compartiment intermedi RE-Golgi ("ER-Golgi intermediate compartment", ERGIC) la membrana plasmàtica, els mitocondris i els endosomes de reciclatge, contribueixen a la seva elongació. Els fagòfors completament tancats, que s'anomenen autofagosomes, es fusionen amb els lisosomes i formen autolisosomes. Aquesta fusió promou l'activació de les hidrolases lisosomals i per tant causa la digestió del contingut de l'autofagosoma. Els productes d'aquestes reaccions catabòliques s'alliberen al citosol a través de transportadors de la membrana lisosomal i són reciclats per circuits anabòlics o bioenergètics. Es destaca la presència i la degradació del marcador d'autofàgia LC3-II.

Un cop format el fagòfor, la doble membrana s'elonga en una estructura en forma de copa i comença a engolir material cel·lular. Durant el procés d'expansió, per a l'elongació de la membrana del fagòfor es requereixen dos sistemes de conjugació de proteïnes tipus ubiquitina ("ubiquitin-like protein", UBL): ATG12-ATG5 UBL i LC3-PE UBL, la proteïna associada a microtúbuls de cadena lleugera ("microtubule-associated light-chain B, LC3-B) conjugada amb fosfatidiletanolamina (PE). La quinasa Atg4B talla la pro-LC3 i exposa un residu glicina, que es conjuga amb la PE associada a membrana<sup>340</sup>. Així passa d'estar en forma difosa al citoplasma (LC3-I) a una forma lipídica, ancorada a la membrana (LC3-II)<sup>341</sup>. La lipidació de l'LC3 es requereix per l'expansió i el tancament del fagòfor<sup>342,343</sup> i és utilitzada com a marcador d'autofàgia (**Figura 17**). L'autofagosoma és transportat a través dels microtúbuls, i la seva maduració implica l'alliberació d'LC3 (per Atg4) i PI3P (per YMR1) de la membrana externa de l'autofagosoma<sup>344</sup>.

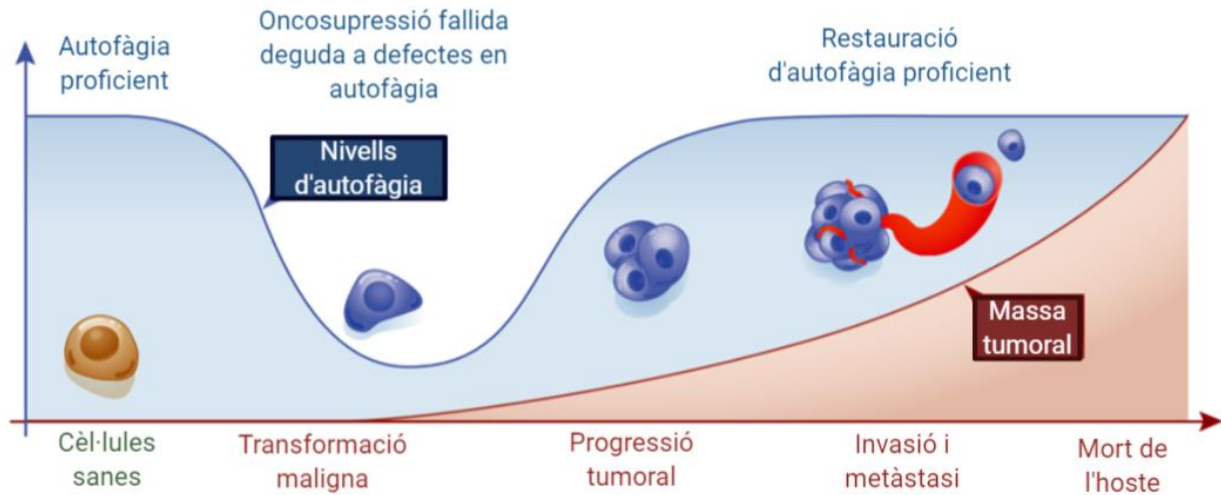
Després d'aquesta dissociació, la membrana externa de l'autofagosoma es fusiona amb la del lisosoma i així esdevé un autofagolisosoma (o autolisosoma), de membrana simple<sup>344,345</sup>. En aquest procés de fusió

hi intervienen proteïnes de tres famílies diferents: Rab GTPases, factors d'ancoratge a membrana (com HOPS i EPG5) i proteïnes d'unió a factors solubles sensibles a *N*-etilmaleimida ("soluble *N*-ethylmaleimide-sensitive factor attachment proteins", SNAREs)<sup>346</sup>. Opcionalment, l'autofagosoma es fusiona amb un endosoma tardà per formar l'amfísoma, que també acabarà fusionant-se amb el lisosoma. Dins del lisosoma, la H<sup>+</sup> ATPasa vacuolar manté l'ambient àcid necessari per a que les hidrolases lisosomals degradin el material retingut<sup>347</sup>. 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.

Els inductors d'autofàgia més ben caracteritzats són la inactivació del complex 1 de la diana de rapamicina en mamífers (mTORC1) (per falta d'aminoàcids)<sup>348,349</sup> i l'activació d'AMPK, que nota canvis en la proporció d'AMP:ATP (per privació d'energia)<sup>350,351</sup>.

L'autofàgia té un paper dual en càncer, com es mostra a la **Figura 18**<sup>352</sup>. 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, un procés pel qual el sistema immunitari elimina de forma constant cèl·lules potencialment cancerígenes abans que s'estableixin com a tumors malignes<sup>353</sup>. Per tant, durant les primeres etapes de la iniciació de la tumorigènesi, l'autofàgia té un paper supressor de tumors<sup>354,355</sup>. Per altra banda, si el càncer progressa, les cèl·lules neoplàsiques s'aprofiten de l'autofàgia per a superar condicions d'estrès cel·lular, com hipòxia o manca de nutrients. Així, l'autofàgia ajuda a la supervivència, proliferació, invasió i metàstasi, i afavoreix així la progressió tumoral<sup>356,357</sup>.

A més, s'ha descrit l'activació de l'autofàgia en resposta a diferents tractaments contra el càncer i, per tant, l'activació de l'autofàgia és un risc de resistència al tractament<sup>358,359</sup>.



**Figura 18.** El paper de l'autofàgia en la transformació i progressió tumorals. Les cèl·lules sanes estan protegides de transformacions malignes gràcies a respostes autofàgiques eficients. La transició d'una cèl·lula sana a un neoplasma metastàtic i insensible a teràpies involucra una pèrdua temporal (no estable) de l'autofàgia. El mecanisme darrere la restauració de la resposta autofàgica eficient després de la transformació maligne encara no està clar. Adaptat de Huang, T. i col., 2018.

#### 4.4 Anoikis

L'Anoikis (paraula derivada del grec que significa "sense casa") és una variant específica de l'apoptosi intrínseca que s'indueix en cèl·lules adherents per la pèrdua d'interaccions cèl·lula-matriu<sup>360,361</sup>. És un programa de mort cel·lular necessari per les cèl·lules dependents d'ancoratge, crític pel desenvolupament i l'homeòstasi dels teixits normals. Les integrines són sensibles a forces mecàniques provinents de la matriu i converteixen aquests estímuls en senyals que modulen la viabilitat cel·lular. De fet, l'anoikis prevén les cèl·lules epitelials desenganxades de colonitzar un altre espai i, per tant, és essencial per l'homeòstasi i el desenvolupament dels teixits. El creixement independent d'ancoratge (i, per tant, la resistència a anoikis) és crucial en el desenvolupament i progressió de diversos tumors<sup>361-363</sup>.

El NCCD l'associa bioquímicament amb un defecte funcional de la integrina  $\beta 1$ , una reducció de l'expressió del receptor del factor de creixement epidèrmic ("epidermal growth factor receptor", EGFR), una inhibició de la via de senyalització d'ERK1 i un increment dels nivells d'expressió de la proteïna pro-apoptòtica Bim<sup>364</sup>.

## 4.5 Catàstrofe mitòtica

La catàstrofe mitòtica és un tipus de mort no regulada. És un mecanisme oncosupressor que fa referència als casos de mort cel·lular desencadenats per una mitosi aberrant, s'executa durant la mitosi o en la interfase posterior, i acaba portant a mort cel·lular o senescència.

Les cèl·lules que han patit aquest tipus de mort es caracteritzen per mostrar alteracions nuclears (micronucleació i multinucleació), que s'utilitzen com a marcadors morfològics per a la seva detecció<sup>317,365</sup>.

Pel que fa als moduladors bioquímics s'esmenta, en alguns casos, l'activació de caspasa 2 i la del supressor tumoral p53<sup>365,366</sup>.

## 4.6 Paraptosi

La paraptosi (paraula derivada del grec, significa "relacionada amb l'apoptosi") és un tipus de mort cel·lular programada no apoptòtica que té lloc durant el desenvolupament i en alguns casos de neurodegeneració. Es diferencia de l'apoptosi perquè no respon a inhibidors de caspases i Bcl-xL, i està conduïda per l'activitat d'una caspasa 9 alternativa que és independent d'Apaf-1 i no està associada al truncament de DNA polimerases ("poly(ADP-ribose) polymerases", PARP). La paraptosi sembla ser una reacció a l'aparició de proteïnes mal plegades al RE<sup>367</sup>. A part, sovint s'observa vacuolització citoplasmàtica que comença amb un inflament progressiu del mitocondri i el RE<sup>325,368</sup>.

## 4.7 Parthanatos

La paraula "parthanatos" deriva del grec "thanatos", que és la personificació de la mort en la mitologia grega, i el prefix "PAR" s'utilitza per definir una mort que implica les PARP, en concret la PARP1<sup>369</sup>. Aquest tipus de mort cel·lular s'activa per dany al DNA i lisi de la cromatina induïda per estrès oxidatiu<sup>370</sup>, que provoca una sobreactivació de la DNA polimerasa. L'acumulació de PARP al citoplasma i la depleció del cofactor NAD<sup>+</sup> (nicotinamida adenina dinucleòtid, utilitzat per l'activació de PARP) causen una elevada citotoxicitat. La disminució de NAD<sup>+</sup> porta, al seu torn, a una depleció d'ATP i el cúmul citosòlic de PAR provoca despolarització de la membrana mitocondrial i producció secundària de ROS<sup>371</sup>, i s'indueix l'alliberament del factor inductor d'apoptosi ("apoptosis inducing factor", AIF), que transloca del mitocondri al nucli<sup>372</sup>. Aquesta modalitat de mort és independent de caspases i possiblement representa, juntament amb la necroptosi, un altre cas específic de necrosi regulada<sup>316</sup>.



## 4.8 Permeabilització de la membrana lisosomal i oncosi

La mort relacionada amb la permeabilització de la membrana lisosomal (“lysosomal membrane permeabilization”, LMP) i l'oncosi s’han agrupat en una mateixa secció perquè la pèrdua de la integritat lisosomal s’ha associat amb oncosi<sup>373–375</sup>. Les característiques de l'oncosi són quasi oposades a les de l’apoptosi, ja que presenta inflamació cel·lular i coagulació del citoplasma<sup>376</sup>. Un esdeveniment bioquímic important que porta a oncosi és, al contrari que en apoptosi, la ràpida disminució en la concentració intracel·lular d’ATP<sup>377</sup>. Per tant, com van resumir Weerasinghe i Buja l’any 2012<sup>376</sup>, l'oncosi està relacionada amb la depleció d’energia que porta al mal funcionament de les bombes iòniques de la membrana cel·lular (incloent l’ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>), inflamació cel·lular, neteja del citosol, dilatació del RE i de l’aparell de Golgi, condensació seguida d’inflor mitocondrial, aglomeració de la cromatina nuclear i formació de cossos citoplasmàtics lliures d’òrgànuls. L’esdeveniment mitocondrial crític en oncosi és l’obertura inicial del porus de la transició de permeabilitat mitocondrial (“mitochondrial permeability transition pore”, mPTP) de la membrana interna, sense que s’alliberi el CitC<sup>376</sup>.

La LMP pot resultar en una fuga gradual d’hidrolases lisosomals al citosol i comportar un dany cel·lular major. La principal funció dels lisosomes és la degradació i reciclatge de components cel·lulars de quasi tots els tipus<sup>378</sup>. Un dels components del repertori enzimàtic lisosomal és una classe de proteases que s’anomenen catepsines. Les catepsines cisteïna B i L i la catepsina aspartat D són les majors conductores de la mort relacionada amb LMP. La Kahalalide F és, probablement, l’agent més investigat que té com a diana els lisosomes<sup>375</sup> i indueix oncosi en cèl·lules tumorals<sup>373,374</sup>. És un producte natural d’origen marí, que es troba a l’alga verda *Bryopsis sp.* (i al mol·lusc *Elysia rufescens*, que s’alimenta de l’alga *Bryopsis sp.* i acumula el producte) i que va arribar a provar-se en assajos clínics<sup>379</sup>. Aquest producte natural indueix pèrdua de potencial mitocondrial i integritat lisosomal, inflor citoplasmàtica severa i vacuolització, ruptura de la membrana plasmàtica amb preservació simultània de la membrana nuclear i absència de degradació de DNA<sup>374</sup>.

## 4.9 Entosi

És una forma de canibalisme cel·lular que té lloc en teixits de mamífer tant sans com malignes i que implica la internalització de cèl·lules viables en cèl·lules no fagocítiques del mateix (homotípic) o diferent (heterotípic) tipus<sup>380,381</sup>. Sovint, tot i que no sempre, la internalització va seguida de la mort de les cèl·lules internalitzades, que s’anomenen cèl·lules entòtiques<sup>380–382</sup>. És un mecanisme oncosupressor provocat bàsicament pel desenganxament de cèl·lules epitelials de la matriu extracel·lular i la conseqüent

pèrdua de la senyalització d'integrines, tot i que també s'han descrit altres mecanismes. A diferència de l'anoikis, però, en entosi no s'activen executors apoptòtics<sup>383,384</sup>.

El model actual proposa que la internalització de cèl·lules entòtiques és a través d'invasió cel·lular, no de fagocitosi<sup>380</sup>. Aquesta internalització és un procés independent d'integrines promogut per la formació de juntures entre les dues cèl·lules que involucren les proteïnes d'adhesió cadherina 1 ("adhesion protein cadherin 1", CDH1), també coneguda com E-cadherina, i la catenina  $\alpha 1$  (CTNNA1). Eventualment, la degradació lisosomal de la cèl·lula entòtica genera nutrients que són aprofitats per la cèl·lula que l'ha internalitzat<sup>385</sup>. El NCCD defineix com a mort cel·lular per entosi aquella que s'origina per la internalització d'una cèl·lula dins d'una altra de manera dependent de l'actomiosina i que és executada per lisosomes<sup>317</sup>.

#### 4.10 Piroptosi

El nom piroptosi indica que és un tipus de mort cel·lular que recorda a l'apoptosi però que depèn del procés inflamatori ("pyrexia", en grec, significa augment de temperatura). La piroptosi és una forma de mort cel·lular regulada que depèn de la formació de porus a la membrana plasmàtica per part de membres de la família de proteïnes gasdermin, sovint (tot i que no sempre) com a conseqüència d'una activació de caspases inflamatòries. Està desencadenada per pertorbacions a l'homeòstasi extracel·lular o intracel·lular relacionades amb la immunitat innata (com invasió per patògen) i manifesta una morfologia especial, com condensació de la cromatina (de manera diferent de l'apoptosi) i inflor cel·lular que culmina amb permeabilització de la membrana plasmàtica<sup>386</sup>. És una mort cel·lular que depèn principalment de l'activació de la caspasa 1, tot i que recentment s'ha descrit que també pot dependre d'altres caspases, com la caspasa 3<sup>387</sup> i està associada a la producció de les interleucines IL-1 $\beta$  i IL-18<sup>388</sup>.

#### 4.11 Netosi

La mort cel·lular per netosi es refereix a una mort cel·lular regulada que es va descriure inicialment en cèl·lules granuloses com els neutròfils i els eosinòfils. Aquest procés de mort es caracteritza per una vacuolització del citoplasma i per l'alliberació al medi extracel·lular de les anomenades trampes extracel·lulars de neutròfils ("neutrophil extracellular traps", NETs), amb activitat bactericida<sup>389,390</sup>.

Aquesta mort cel·lular té lloc quan un estímul, generalment infecció, engega el procés de generació de les estructures NETs. Llavors s'activen la cascada de senyalització Raf-MEK-ERK i les NADPH oxidases. La senyalització cel·lular es desencadena al nucli amb l'activació de l'enzim peptidil arginina deiminasa tipus 4 ("peptidylarginine deiminase 4", PAD14), que es troba altament expressat en les cèl·lules granuloses i és un catalitzador de la hipercitrul·linació d'histones (conversió dels residus d'arginina a citrul·lina). En

conseqüència es descondensa la cromatina i es desintegra la membrana nuclear. El contingut nuclear es barreja amb el citosòlic en presència de grànuls, i s'acaben constituint les estructures NETs, que tenen un ampli contingut cel·lular (cromatina descondensada, histones i proteïnes bactericides). Finalment, les NETs són alliberades al medi extracel·lular per combatre l'agent infeccios<sup>391</sup>.

Tot i així, s'han detectat casos de netosi sense la formació d'estructures NETs o amb presència d'aquestes estructures però sense arribar a induir mort cel·lular. Les característiques emprades pel NCCD per definir aquesta modalitat de mort són: l'exclusivitat del procés de mort cel·lular en cèl·lules granuloses, la insensibilitat a inhibidors de caspases i a l'inhibidor necroptòtic específic de RIP1 (necrostatina-1), i la dependència de l'anió superòxid generat per la NADPH oxidasa<sup>317</sup>.

### 4.12 Ferroptosi

La mort per ferroptosi va ser proposada per primer cop l'any 2012<sup>392</sup> quan s'investigava l'efecte del compost Erastin<sup>393</sup> i s'ha observat en diversos tipus de càncer, en diversos teixits<sup>394</sup>, i també en altres malalties, com cardiovasculars o neurodegeneratives<sup>395</sup>.

Depèn de ferro i s'acumulen espècies reactives d'oxigen ("reactive oxygen species", ROS) i, bàsicament, els canvis que pateix la cèl·lula són citològics, com la pèrdua o la disminució de la presència de les crestes mitocondrials, la ruptura de la membrana mitocondrial externa, i una condensació de la membrana mitocondrial interna<sup>396-399</sup>. Aquestes anormalitats cel·lulars resulten de la pèrdua de permeabilitat selectiva de la membrana plasmàtica deguda a una intensa peroxidació lipídica a la membrana i un elevat estrès oxidatiu<sup>400</sup>, mentre que el nucli es manté de mida normal i sense condensació de la cromatina<sup>401</sup>. És un tipus de mort cel·lular independent de caspases, components de necrosi i autofàgia<sup>402</sup> i s'associa amb un alliberament consistent de patrons moleculars associats a dany ("damage-associated molecular patterns", DAMPs)<sup>403</sup>. Aquesta mort cel·lular pot ser activada per la privació de l'aminoàcid cisteïna a la cèl·lula o per la inhibició de la hidroxiperoxidasa de fosfolípids glutatió peroxidasa 4 ("glutathione peroxidase 4", GPX4)<sup>402</sup>.

El NCCD descriu la ferroptosi com un tipus de mort cel·lular regulada que és iniciat per perturbacions oxidatives intracel·lulars, està sota el control de GPX4 i pot ser inhibit per quelants de ferro i antioxidants lipofílics<sup>317</sup>.

### 4.13 Metuosi

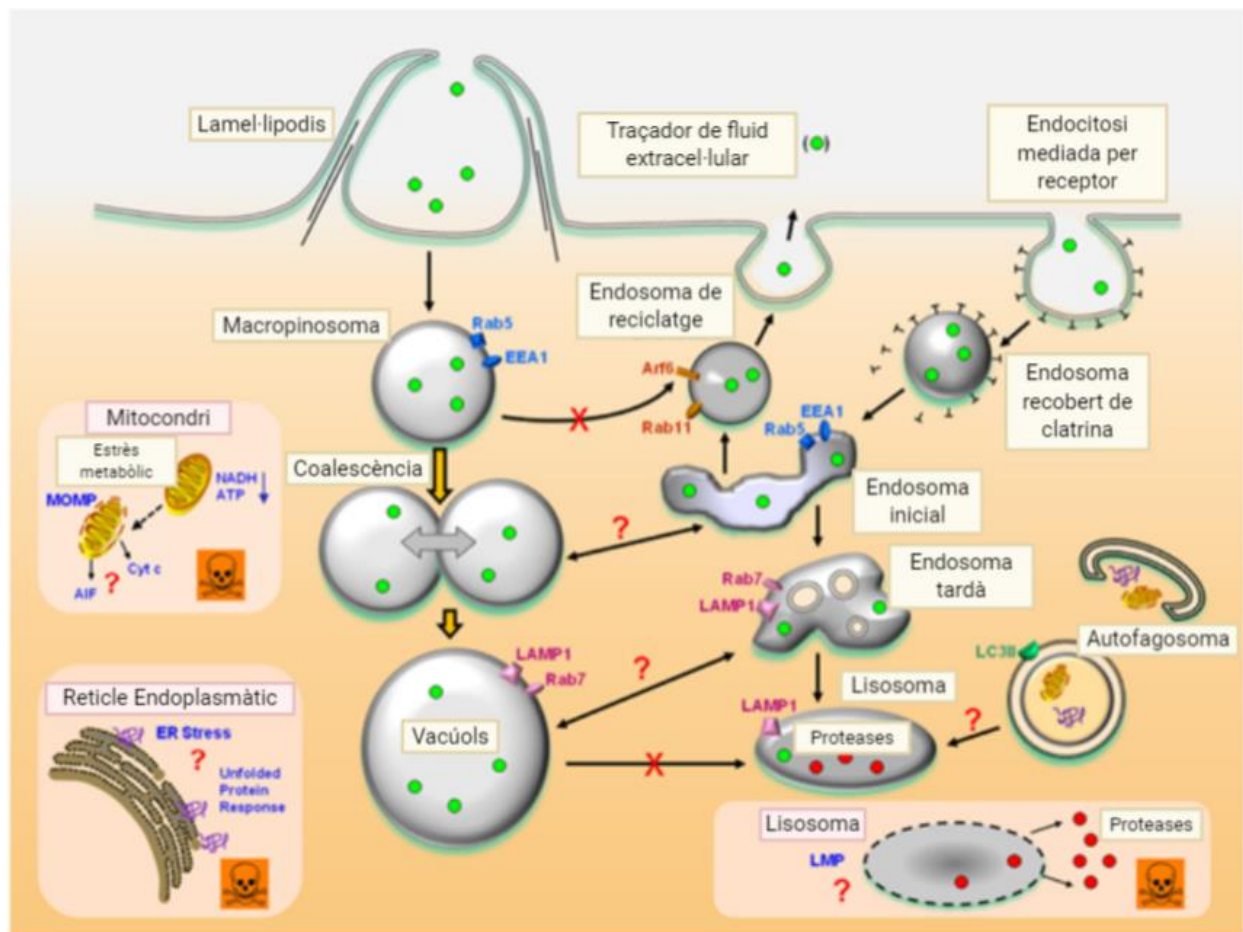
Un tipus de mort cel·lular que encara no ha estat inclòs en els informes del NCCD però ha guanyat força en l'última dècada és la metuosi<sup>404</sup>.

El mecanisme de mort cel·lular per metuosi va ser descrit per primer cop per Overmeyer i col. l'any 2008<sup>405</sup>. El nom metuosi, que deriva del grec "methuo" (beure fins a intoxicar-se), es va seleccionar perquè la característica principal de les cèl·lules que moren per metuosi és l'acumulació de vacúols citoplasmàtics plens de fluid que són de membrana simple (a diferència dels autofagosomes, que tenen una doble membrana) i que s'originen a partir de macropinosomes.

La macropinocitosi és un procés endocític independent de clatrina, dirigit per actina, pel qual les cèl·lules de mamífer internalitzen fluid extracel·lular, nutrients i proteïnes en vesícules (macropinosomes) generades a partir d'unes protrusions de la membrana plasmàtica anomenades lamel·lipodis<sup>406,407</sup> (del llatí "lamel·la", petita làmina, i del grec "podos", peu). Està relacionat amb el procés de fagocitosi, però es diferencien pel fet que la macropinocitosi internalitza fluid de manera no selectiva o controlada<sup>408</sup>, pot ser estimulada per factors de creixement, i se suprimeix per inhibidors d'intercanviadors de ions, com l'amilorida i els seus derivats, que inhibeixen específicament la macropinocitosi i no altres vies endocítiques<sup>406</sup>. A més, els macropinosomes són més grans que altres vesícules endocítiques (0,2-10 µm de diàmetre<sup>406</sup>) i poden ser marcats amb dextrans d'elevat pes molecular<sup>409</sup>, que són incorporats en vesícules més grans de 0,2 µm de diàmetre.

Tot i que el mecanisme precís que hi ha darrere d'aquesta vacuolització que s'observa en metuosi no es comprèn del tot, es creu que està relacionat amb desviacions en el trànsit de vesícules endocítiques independents de clatrina i una macropinocitosi elevada.

Un cop internalitzats, els macropinosomes adquireixen fosfatidilinositol-3-fosfat (PI3P) i la GTPasa Rab5. Aleshores entren a la via endocítica, on o bé són reciclats a la membrana plasmàtica o bé adquireixen característiques d'endosomes tardans (LAMP1 i Rab7) i s'acaben fusionant amb els lisosomes. El procés macropinocític, per això, no és funcional en metuosi i els macropinosomes no es reciclen a la membrana ni es fusionen amb els lisosomes sinó que es fusionen entre ells i donen lloc a vacúols progressivament més grans, com es veu a la **Figura 19**. Les vesícules van incrementant de mida i omplen l'espai citoplasmàtic, llavors les cèl·lules es desenganxen del suport i perden la integritat de la membrana plasmàtica de manera semblant a la necrosi, tot i que aquest procés no pot ser inhibit per necrostatina i, per tant, aquest tipus de mort cel·lular no és necroptosi<sup>410,411</sup>.



**Figura 19.** Model de metuosi. Els macropinosomes naixents generats pels lamel·lipidis entren a la cèl·lula i es fusionen per a formar vacúols grans plens de fluid. Aquests vacúols són incapaços de reciclar-se de manera normal, com els macropinosomes, però maduren ràpidament i formen una població estable de vacúols amb algunes característiques d'endosomes tardans (Rab7 i LAMP1). En contrast amb els endosomes tardans funcionals, aquests vacúols no segresten marcadors àcids (lysotracker i acridine orange) ni es fusionen amb els lisosomes pre-existents. Està per determinar si els vacúols tenen capacitat de perturbar el trànsit de proteïnes en la via dependent de clatrina o fusionar-se amb endosomes primerencs o endosomes tardans multivesiculars. Tot i que hi ha evidències que els vacúols derivats de macropinosomes són diferents dels autofagosomes, és important determinar si l'acumulació de vacúols o els canvis associats a l'estat metabòlic de la cèl·lula poden tenir un impacte en la macroautofàgia. Una qüestió central per estudis futurs és com la vacuolització dels macropinosomes o endosomes tardans porta a la pèrdua de la integritat de la membrana plasmàtica i la mort cel·lular semblant a necrosi. Factors contribuents, que no són mútuament excloents, podrien incloure metabolisme energètic mitocondrial compromès, permeabilitat de la membrana mitocondrial externa ("mitochondrial outer membrane permeability", MOMP), permeabilitat de la membrana lisosomal o estrès del RE. Cyt c, citocrom C. Adaptat de Maltese i col., 2014.

Els vacúols observats en la metuosi no s'originen ni a partir de membranes de RE ni de mitocondri, com és el cas en la paraptosi o l'oncosi<sup>368,412</sup>, ni comparteixen característiques similars amb els autofagosomes. Com en autofàgia, en la metuosi s'han detectat nivells elevats de l'expressió de la proteïna LC3-II, però la tinció per immunofluorescència i la inhibició genètica de l'autofàgia han demostrat que els dos processos són independents<sup>405</sup>. En la metuosi s'observen també algunes característiques típiques d'apoptosi, com activació de la caspasa 3 i truncament de substrats de caspases. Tot i així, en la metuosi, la viabilitat

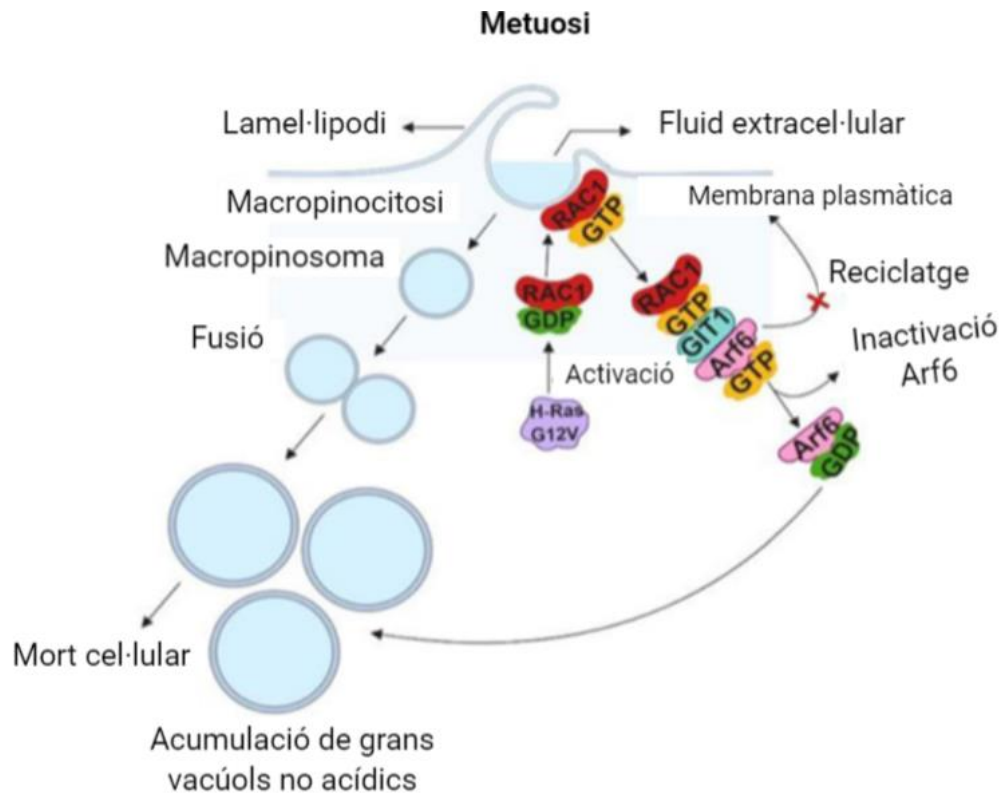
cel·lular no es pot prevenir per l'inhibidor de caspases z-VAD i, generalment, tampoc no s'observen altres característiques típiques d'apoptosi com encongiment cel·lular, condensació de cromatina i cossos apoptòtics<sup>410</sup>. Les característiques de la metuosi, comparades amb altres tipus de mort cel·lular no apoptòtica, s'han recollit a la **Taula 2** pel grup de Maltese<sup>410</sup>.

**Taula 2.** Característiques de la metuosi en comparació amb altres tipus de mort cel·lular no apoptòtics. <sup>a</sup>

	Metuosi	Oncosi	Paraptosi	Necroptosi	Ferroptosi	Pirocitosi	Parthanatos	Mort cel·lular per autofàgia
Vacúols visibles; origen	Sí; macropinosomes i endosomes	Sí; RE i mitoc.	Sí; RE i mitoc.	Sí; RE i mitoc.	No	No	No	Sí; Autofagosomes
Ruptura membrana plasmàtica	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	Varia
Inflament cel·lular	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	No	No
<i>Blebbing</i> a membrana	No	Sí	No	No	No	No	No	No
Condensació de cromatina	No	Sí	No	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí (tard)
Fragmentació del DNA	Varia	No	No	No	No	No	Sí	Varia
Activació de caspases executores (ocorre però no és un requeriment)	Sí	No	No	No	No	No	Sí	Varia
Acumulació d'autofagosomes	Sí	-	Sí	Sí	No	-	No	Sí
Permeabilització de la membrana mitocondrial	-	Sí	Sí	Sí	No	No	Sí	Varia
Permeabilització de la membrana lisosomal	-	Sí	No	Sí	No	No	-	Varia
Depleció ATP	Sí	Sí	Sí	Sí	Sí	No	Sí	Varia
Inhibidors	-	Glicina, inhibidors de PARP	-	Necrostatina	Ferros-tatina, quelants de ferro	Inhibidors de caspasa-1	Inhibidors de PARP	3MA, si-RNA d'Atg5, Beclin-1

<sup>a</sup> Extret de Maltese i col., 2014. RE, reticle endoplasmàtic; Mitoc, mitocondris; 3MA, 3-metiladenina.

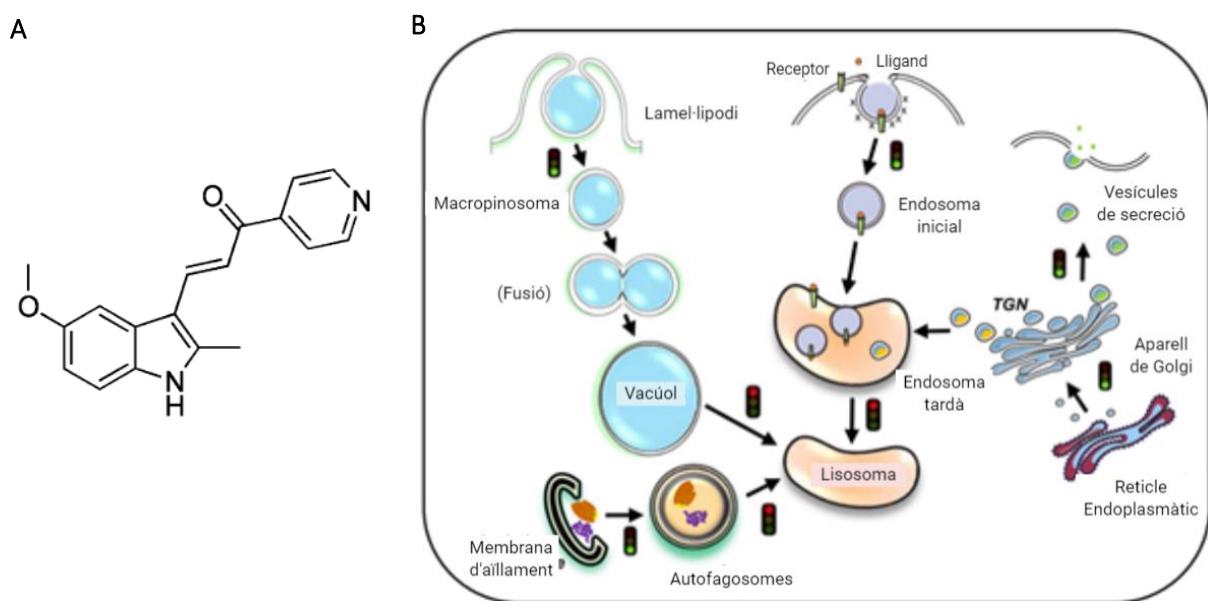
Aquests autors també van demostrar que l'activació de la GTPasa RAC1, dependent de Ras, induïx una forma similar de mort cel·lular en glioblastoma<sup>405</sup>, que és un dels tipus de càncer que mostren uns nivells de resistència més elevats a estímuls pro-apoptòtics<sup>413</sup>. Aquest tipus de mort independent d'apoptosi a través de la sobreactivació de Ras ja s'havia observat anys enrere, tot i que no s'havia definit encara el terme de metuosi<sup>414</sup>. Aquest procés, tot i que és dependent de la inducció de Ras, és independent de la via proliferativa associada a Ras (la via Ras-Raf-MEK-ERK1/2)<sup>410</sup>. En aquest cas, com es veu a la **Figura 20**<sup>315</sup>, la GTPasa Ras activa la GTPasa RAC1, que facilita la formació de macropinosomes. A més, Rac1 interacciona amb GIT1 (una proteïna adaptadora), que inhibeix la GTPasa Arf-6, la qual està involucrada en el reciclatge de macropinosomes a la membrana plasmàtica, i això comporta l'acumulació de macropinosomes a la cèl·lula<sup>410</sup>.



**Figura 20.** Metuosi. Aquest tipus de mort cel·lular no apoptòtica es caracteritza per una vacuolització extrema derivada de macropinosomes. En resposta a la sobreexpressió de la proteïna H-Ras, RAC1 promou la formació de macropinosomes i, a més, suprimeix l'activitat de reciclatge de macropinosomes d'Arf6 via GIT1. Conseqüentment, els macropinosomes s'acumulen i es fusionen per a formar vacúols no àcids, grans i plens de fluid, que porten a la mort de la cèl·lula. Adaptat de Nirmala i col., 2019.

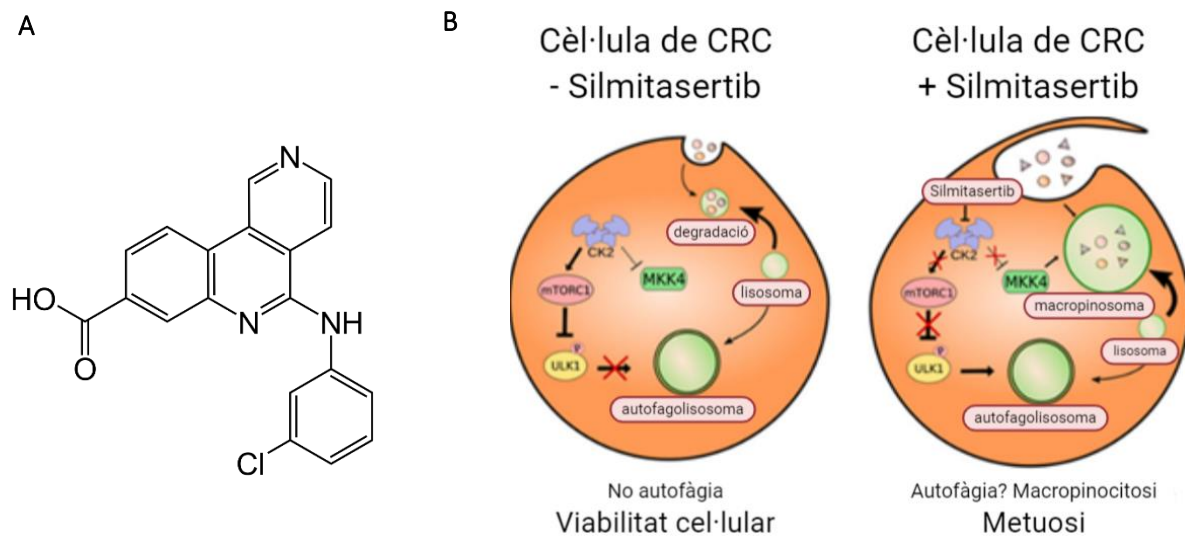


El mateix grup ha descrit eines farmacològiques (derivats de calcona) que indueixen metuosi en un ampli espectre de línies cel·lulars tumorals, incloent-n'hi també moltes de resistents a tractaments inductors d'apoptosi, com gliomes resistents a temozolomida<sup>415</sup> i càncer de mama resistent a doxorubicina<sup>416</sup>. El derivat més potent s'anomena MOMIPP (**Figura 21, A**) i promou metuosi a través de la disrupció del trànsit vesicular (**Figura 21, B**) i el processament de pro-catepsines<sup>417</sup>, i actua a través de la via de senyalització de JNK, que fosforila Bcl-2<sup>418</sup>. Es va identificar PIKFYVE, una fosfoinositol (PI) quinasa de classe III, com a diana del MOMIPP. L'homeòstasi del PI està altament regulada perquè la restricció espai-temporal de les diferents espècies de PI és crucial pel trànsit de la membrana per les vies secretora i endocítica<sup>419,420</sup>. La inhibició de PIKFYVE provoca una disrupció del trànsit d'endosomes o macropinosomes que indueix vacuolització cel·lular<sup>421</sup>.



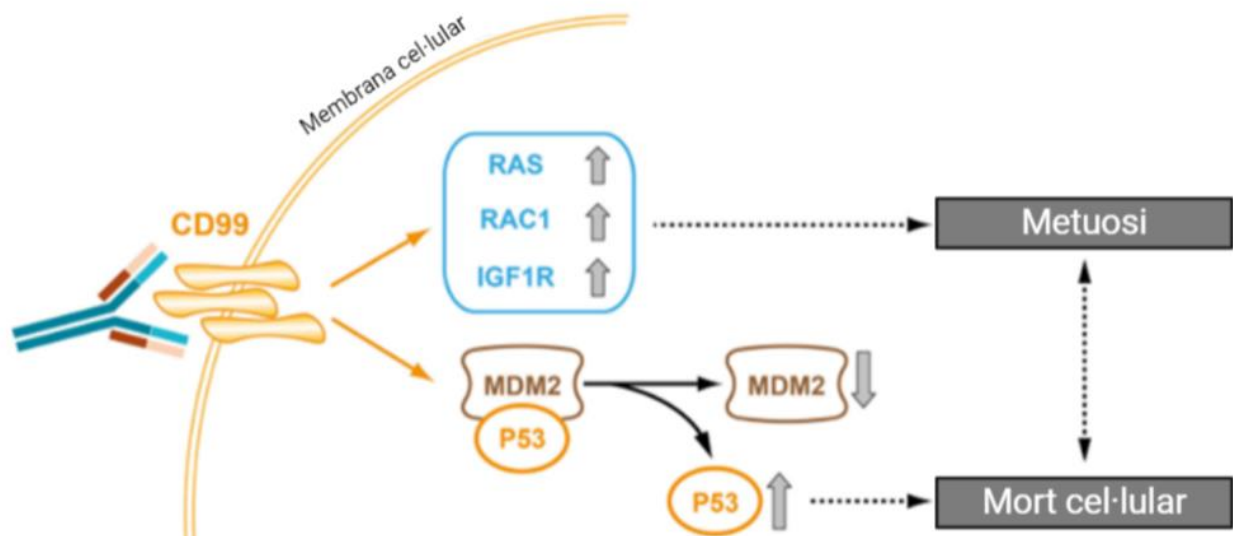
**Figura 21.** MOMIPP. **A)** Estructura química del MOMIPP. **B)** Model que descriu els efectes del MOMIPP en el trànsit vesicular segons els coneixements actuals. El MOMIPP inicialment estimula la biogènesi i la fusió homotípica dels macropinosomes. Els vacúols resultats, plens de fluid, no poden fusionar-se amb els lisosomes i, per tant, s'acumulen al citoplasma. S'ha indicat que alguns vacúols són derivats de l'expansió d'endosomes pre-existents. El transport de receptors de la superfície cel·lular als lisosomes està bloquejat, presumptament pel pas de fusió dels endosomes tardans amb els lisosomes. Igualment, precursors de proteases en ruta des de la xarxa trans-Golgi al lisosoma via compartiments d'endosomes tardans són incapaços d'arribar al seu destí pel procés final de processament/maduració. La fusió dels autofagosomes amb endosomes tardans i/o lisosomes també és inhibida en cèl·lules tractades amb MOMIPP, per tant s'acumulen autofagosomes. Un increment concomitant en la biogènesi d'autofagosomes pot contribuir a un increment dels nivells d'autofagosomes. En contrast amb la disrupció del trànsit endolisosomal, la via secretora RE → Golgi → membrana plasmàtica sembla quedar intacta en cèl·lules tractades amb MOMIPP. Adaptat de Mbah i col., 2017.

De manera similar, l'agent anticancerós silmitasertib (CX-4945) (**Figura 22, A**) pot induir metuosi en colangiocarcinoma<sup>422</sup> i línies cel·lulars de càncer colorectal<sup>423</sup>, sense induir apoptosi ni autofàgia, tot i que el mateix agent també indueix autofàgia en cèl·lules de càncer pancreàtic i apoptosi en cèl·lules no petites de càncer de pulmó<sup>424</sup> i ha estat provat en assajos clínics de fase I i fase II per colangiocarcinoma i mieloma múltiple (clinicaltrials.gov, identificador NCT02128282). El silmitasertib inhibeix la proteïna caseïna quinasa 2 ("casein kinase 2", CK2). La CK2 és una quinasa que està sobreexpressada en diversos tumors i està involucrada en diversos esdeveniments de senyalització relatius al cicle cel·lular, proliferació i apoptosi<sup>425</sup>. La sobreexpressió de CK2 atenua l'apoptosi en cèl·lules tumorals i la inhibició de la CK2 promou mort cel·lular. Per tant, la seva regulació és important per a determinar el destí de la cèl·lula tumoral<sup>426,427</sup>. Una diana coneguda de la CK2 és Akt, que està involucrada en la via de senyalització de PI3K/Akt/mTORC1. Per tant, com suggereixen Silva-Pavez i col. en línies cel·lulars de càncer colorectal, la inducció de metuosi en aquest cas podria ser a través de la via de senyalització d'mTOR (diana de rapamicina en mamífers)<sup>423</sup> (**Figura 22, B**), tot i que Lertsuwan i col., en colangiocarcinoma, asseguren que el silmitasertib indueix mort cel·lular per metuosi a través de vies independents de CK2, encara per determinar<sup>422</sup>.



**Figura 22.** Silmitasertib. **A)** Estructura química del Silmitasertib (CX-4945). **B)** Paper de la CK2 en la vida i la mort de cèl·lules de càncer colorectal regulant la metuosi. En cèl·lules no tractades (esquerra) hi ha una molt elevada expressió i activitat de CK2, que promou la regulació positiva d'mTORC1 i per tant la regulació negativa d'ULK-1; així es promou la viabilitat cel·lular de manera independent d'autofàgia. MKK4 també pot ser regulat negativament per CK2, per tant la macropinositosis no es veu afectada. En cèl·lules tractades amb Silmitasertib (dreta), però, es promou macropinositosis dependent d'MKK4 de manera putativa; llavors hi ha una formació massiva de vacúols àcids (LC3-II-/LAMP1+/Rab7+) que promouen parada del cicle cel·lular en fase G2/M i finalment la mort cel·lular per metuosi. Conseqüentment, les cèl·lules de càncer colorectal no són capaces de formar tumors. Figura adaptada de Silva-Pavez i col., 2019.

Hi ha un altre cas conegut de metuosi, el de CD99, que és una proteïna de la superfície cel·lular amb característiques úniques de la que es coneix només una part dels seus mecanismes d'acció. Aquesta molècula està involucrada en processos biològics crucials com adhesió cel·lular, migració, mort, diferenciació i diapedesi, i influeix processos associats amb inflamació, respostes immunitàries i càncer. Es troba freqüentment sobreexpressada en diferents tipus de càncer, particularment tumors pediàtrics, com sarcoma d'Ewing (un càncer ossi molt agressiu) i subtipus específics de leucèmia. Com que és una proteïna de membrana és fàcilment activable per anticossos. En el sarcoma d'Ewing, l'activació de CD99 per anticossos monoclonals específics activa la hiperestimulació de la macropinocitosi i porta a la mort de les cèl·lules tumorals a través d'una via independent de caspases i no apoptòtica, la metuosi<sup>428</sup>. A nivell molecular (**Figura 23** *Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.*), quan s'activa CD99 s'indueix el complex IGF-1R/Ras/RAC1, que és internalitzat en vacúols endocítics positius per RAB5 (GTPasa petita, marcador d'endosomes primerencs). Després, aquest complex es dissocia, l'IGF-1R es recicla a la membrana cel·lular, i CD99 i Ras/RAC1 passen a vacúols immadurs positius per LAMP1 que, quan s'acumulen excessivament, provoquen metuosi. Quan s'altera la via de senyalització d'IGF-1R s'inhibeix la metuosi, i s'activa quan s'estimula IGF-1. S'ha proposat induir apoptosi a través de CD99 per a tractar pacients de sarcoma d'Ewing que presenten resistència a agents inductors d'apoptosi<sup>429</sup>.



**Figura 23.** Representació esquemàtica de la senyalització de CD99 en cèl·lules de sarcoma d'Ewing. Es mostren les relacions entre l'activació de CD99 mitjançant anticossos i la mort cel·lular. Figura adaptada de Pasello i col., 2018.

Tots aquests resultats indiquen que la metuosi pot ser activada a través de diverses vies de senyalització, dependent del compost que la indueixi. Tot i que a partir dels coneixements actuals s'ha suggerit un mecanisme d'acció de la metuosi que pot ser activat a través de diferents vies de senyalització, és

necessari fer més estudis per a entendre millor el programa d'execució i per a respondre qüestions que romanen obertes sobre aquest tipus de mort cel·lular, ara per ara poc conegut. El mecanisme d'acció de la JB per a induir metuosi és desconegut fins al moment.

La identificació de mecanismes alternatius de mort cel·lular, tot i que no es defineixin per la seva importància fisiològica, comporten un interès significatiu en els camps de la toxicologia i la teràpia en càncer. De fet, representen mecanismes alternatius que les cèl·lules podrien utilitzar per a morir i proporcionar noves oportunitats per a manipular la mort cel·lular en un context terapèutic, per exemple, per a permetre matar aquelles cèl·lules tumorals resistents a apoptosi.



# OBJECTIUS



1. El paper que tenen les ceramidases en diferents malalties humanes va guanyant interès. Tot i així, la recerca en aquest àmbit ha estat obstaculitzada per la manca d'inhibidors i substrats específics per les diferents formes d'aquests enzims. Per aquest motiu, el primer objectiu plantejat en aquesta tesi fou el **descobriments de substrats i inhibidors específics de ceramidases amb activitat en cèl·lules intactes**.
2. S'ha descrit que la Jaspina B presenta una activitat citotòxica que podria implicar mort cel·lular per metuosi. En aquest context, per a determinar l'abast d'aquesta activitat i entendre millor el seu mecanisme molecular, el segon objectiu proposat en aquesta tesi fou la **determinació dels efectes cel·lulars de la Jaspina B i la via de senyalització implicada en la inducció de metuosi**, utilitzant la línia cel·lular d'adenocarcinoma de pulmó A549 com a model.





# RESULTATS



# CAPÍTOL 1

Nous substrats fluorogènics per les ceramidases neutra i alcalines i descobriment d'anàlegs de desoxiceramides com a inhibidors altament selectius per ACER3 en cèl·lules intactes

## ARTICLES

“New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases”

“Discovery of deoxyceramide analogs as highly selective ACER3 inhibitors in live cells”



## ARTICLE 1

**New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases**

Mireia Casasampere<sup>1,2</sup>, **Núria Bielsa**<sup>1,2</sup>, Daniel Riba<sup>1</sup>, Laura Bassas<sup>1</sup>, Ruijuan Xu<sup>3</sup>, Cungui Mao<sup>3</sup>, Gemma Fabriàs<sup>1,4</sup>, José Luis Abad<sup>1</sup>, Antonio Delgado<sup>1,2\*</sup> i Josefina Casas<sup>1,4\*</sup>

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

<sup>2</sup> Universitat de Barcelona (UB), Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Mèdica, Unitat de Química Farmacèutica (Unitat associada al CSIC), 08028 Barcelona, Espanya

<sup>3</sup> Departament de Medicina, Universitat Estatal de Nova York a Stony Brook, NY 11794-8155, Estats Units d'Amèrica

<sup>4</sup> Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa (CIBEREHD)

*Journal of Lipid Research (JLR)*. **2019**; 60(6):1174-1181

Factor d'impacte: 4,483

La contribució de la Núria Bielsa a aquest treball presentat com a part del capítol 1 d'aquesta tesi correspon al disseny d'experiments, i obtenció i elaboració de les dades resultants dels experiments d'activitat NC de la figura 5. També ha contribuït a l'escriptura del primer esborrany.

Josefina Casas Brugulat i Gemma Fabriàs Domingo

Directores de tesi

### RESUM

#### Nous substrats fluorogènics per les ceramidases neutra i alcalines

**Objectiu:** En articles previs del nostre grup s'havia descrit la síntesi i l'aplicació dels compostos RBM14 per determinar l'activitat de l'AC, la NC i l'ACER3. Els compostos RBM14 són anàlegs cumarínics de la Cer amb diferents longituds de la cadena d'*N*-acil. En aquest treball s'han presentat nous derivats acilats d'RBM14 i els compostos RBM15, i s'ha determinat l'habilitat de les diferents CDases per hidrolitzar-los amb l'objectiu de trobar substrats específics de les diferents CDases. Els compostos RBM15 són vinílegs dels RBM14, amb la qual cosa són més semblants a les Cer naturals i continuen experimentant la cadena de reaccions que condueixen a l'alliberament d'umbel·liferona.

**Metodologia:** L'activitat CDasa es va determinar mesurant la fluorescència alliberada pels substrats RBM14 o RBM15 un cop hidrolitzats i oxidada la base resultant. L'assaig es va realitzar en plaques de 96 pous utilitzant el tampó apropiat per a cada CDasa en funció del seu pH òptim d'activitat. Per avaluar l'activitat de la AC es van utilitzar lisats cel·lulars de la línia FD-AC, que sobreexpressa de manera estable l'AC. L'activitat NC es va mesurar en enzim recombinant humà així com en lisats cel·lulars i cèl·lules intactes de la línia HT29 transfectades amb el gen ASAH2, i en el cas de les cèl·lules intactes, en presència de metil- $\beta$ -ciclodextrina. D'altra banda, en el cas de les ACERs, es va treballar amb microsomes de lisats cel·lulars on les diferents ACERs estaven sobreexpressades o silenciades.

**Resultats:** Cap dels nous compostos RBM14 o RBM15 va resultar superior a l'RBM14C12 com a substrat de la AC, mentre que el compost RBM14C24:1 fou un substrat eficient i selectiu per la NC, tant en proteïna recombinant, com en lisats cel·lulars i cèl·lules intactes. D'altra banda, els substrats de la família RBM15 van mostrar una afinitat lleugerament inferior respecte als seus anàlegs RBM14. Els nous compostos RBM14 no van ser substrats de cap de les tres ACERs, però els RBM15 sí que van ser hidrolitzats per les ACER1 i ACER2, sent pràcticament estables davant de l'ACER3, enzim pel que només l'RBM15C16 es va comportar com a substrat, tot i que amb menor eficiència que el seu anàleg RBM14. Es va determinar que els compostos RBM15 amb cadenes d'*N*-acil llargues i insaturades (18:1 i 22:1) poden ser utilitzats per a mesurar activitats ACER1 i ACER2.

**Conclusions:** L'RBM14C24:1 és un substrat específic per la NC i permet mesurar la seva activitat en cèl·lules intactes. Els compostos RBM15C18:1 i RBM15C22:1 són hidrolitzats per les ACER1 i ACER2, però no per la AC ni l'ACER3. L'RBM15C18:1 és el més selectiu, ja que és molt poc hidrolitzat per la NC.



# New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases<sup>§</sup>

Mireia Casasampere,<sup>\*,†</sup> Núria Bielsa,<sup>\*,†</sup> Daniel Riba,<sup>\*</sup> Laura Bassas,<sup>\*</sup> Ruijuan Xu,<sup>§</sup> Cungui Mao,<sup>§</sup> Gemma Fabriàs,<sup>\*\*\*</sup> José-Luis Abad,<sup>\*</sup> Antonio Delgado,<sup>1,\*,†</sup> and Josefina Casas<sup>1,\*\*\*</sup>

Spanish National Research Council (CSIC),<sup>\*</sup> Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Department of Biological Chemistry, Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), 08034 Barcelona, Spain; Faculty of Pharmacy and Food Sciences,<sup>†</sup> Department of Pharmacology, Toxicology, and Medicinal Chemistry, Unit of Pharmaceutical Chemistry (Associated Unit to CSIC), University of Barcelona, 08028 Barcelona, Spain; Department of Medicine,<sup>§</sup> State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY 11794-8155; and Centro de Investigación Biomédica en Red (CIBEREHD),<sup>\*\*</sup> 28029 Madrid, Spain

ORCID IDs: 0000-0001-7162-3772 (G.F.); 0000-0002-8343-9611 (J-L.A.); 0000-0003-4586-6070 (A.D.); 0000-0002-7926-5209 (J.C.)

**Abstract** New fluorogenic ceramidase substrates derived from the *N*-acyl modification of our previously reported probes (RBM14) are reported. While none of the new probes were superior to the known RBM14C12 as acid ceramidase substrates, the corresponding nervonic acid amide (RBM14C24:1) is an efficient and selective substrate for the recombinant human neutral ceramidase, both in cell lysates and in intact cells. A second generation of substrates, incorporating the natural 2-(*N*-acylamino)-1,3-diol-4-ene framework (compounds RBM15) is also reported. Among them, the corresponding fatty acyl amides with an unsaturated *N*-acyl chain can be used as substrates to determine alkaline ceramidase (ACER)1 and ACER2 activities.<sup>¶¶</sup> In particular, compound RBM15C18:1 has emerged as the best fluorogenic probe reported so far to measure ACER1 and ACER2 activities in a 96-well plate format.—Casasampere, M., N. Bielsa, D. Riba, L. Bassas, R. Xu, C. Mao, G. Fabriàs, J-L. Abad, A. Delgado, and J. Casas. *New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases*. *J. Lipid Res.* 2019. 60: 1174–1181.

**Supplementary key words** substrate • sphingolipids • umbelliferone • ceramides

Besides their classically accepted role as structural cell components, sphingolipids are also a well-recognized group of bioactive lipids with significant implications in cell signaling and disease (1). This is the basis of the so-called sphingolipid rheostat, in which the relative levels of sphingosine (So) and sphingosine-1-phosphate (SIP) dictate the cell fate (2). Thus, while SIP results from phosphorylation of So by specific kinases (3), the intracellular

levels of So are regulated by ceramidases, a group of amido-hydrolases that catalyze the hydrolysis of ceramides (Cers) into So and fatty acids (4). According to their optimum pH, ceramidases are classified as acid, neutral, or alkaline. They differ in their primary structures because they are coded by different genes. The five human ceramidases described so far, one acidic [acidic ceramidase (AC)], one neutral [neutral ceramidase (NC)], and three alkaline [alkaline ceramidases (ACERs)] differ also on their tissue distribution (5). Thus, while AC is ubiquitously expressed, NC is highly expressed in the small intestine, while the three ACERs are exclusively expressed in the skin cells. Very recently, the structure of ACER3 has been disclosed (6). Apart from their optimum pH, ceramidases show different selectivity for Cers depending on the length and degree of saturation of the *N*-acyl side chain (4). Thus, AC prefers C12 and C14 Cers and NC prefers C16 and C18 Cers, while ACER1 prefers C20 to C24 chains (7). The remaining ACERs are less selective, because ACER2 deamidates Cers with saturated acyl chains (8) as well as dihydroceramides (dhCers) with C18 and C20 monounsaturated chains (9), while ACER3 also hydrolyzes phytoceramides with unsaturated acyl chains (10).

The role of some CDases as therapeutic targets (4) raises the interest for selective CDase inhibitors and, hence, the development of efficient protocols amenable to high-throughput screening (HTS) formats. In this context, in

Abbreviations: AC, acidic ceramidase; ACER, alkaline ceramidase; Cer, ceramide; dhCer, dihydroceramide; HTS, high-throughput screening; MBCD, methyl- $\beta$ -cyclodextrin; NC, neutral ceramidase; So, sphingosine; SIP, sphingosine-1-phosphate.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed.

e-mail: delgado@rubam.net (A.D.); fina.casas@iqac.csic.es (J.C.)

<sup>§</sup>The online version of this article (available at <http://www.jlr.org>) contains a supplement.

This work was partially supported by Spanish Ministry of Science and Innovation Grant CTQ2017-85378-R.

Manuscript received 29 January 2019 and in revised form 27 March 2019.

Published, *JLR Papers in Press*, March 29, 2019

DOI <https://doi.org/10.1194/jlr.D092759>

Copyright © 2019 Casasampere et al. Published under exclusive license by The American Society for Biochemistry and Molecular Biology, Inc.

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



previous works (11, 12), a series of first generation fluorogenic substrates (RBM14) with different *N*-acyl chains (from C8 to C16) were described as efficient CDase substrates with different selectivities. However, while RBM14C12 has been characterized as an efficient AC substrate (11, 13), the remaining substrates proved less selective toward NC, another interesting therapeutic target (14) for which no selective inhibitors have been developed so far. Moreover, selective substrates for the ACERs (ACER1–3) are also lacking.

Considering the above precedents and given our continued interest in the development of selective probes for the different ceramidases, we want to report on a series of new fluorogenic substrates derived from our previously reported RBM14 probes (11–13), as well as new probes derived from a homologated version thereof (RBM15) that also incorporates the 2-(*N*-acylamino)-1,3-diol-4-ene framework present in the natural Cers (Fig. 1).

In order to widen the scope of our previously reported RBM14 probes (11–13), longer and/or unsaturated *N*-acyl chain amides have been used in this study, in particular those from oleic acid (C18:1- $\omega$ 9), erucic acid (C22:1- $\omega$ 9), and nervonic acid (C24:1- $\omega$ 9). In addition, results from a recent report seem to indicate that ACER1<sup>-/-</sup> cells accumulate  $\alpha$ -hydroxy eicosanoic Cer (15). Because this observation can be related with a higher selectivity of ACER1 toward this type of side chain, we have also synthesized the corresponding (*R*)- and (*S*)-*N*-( $\alpha$ -hydroxyeicosanoyl) amides. For the sake of comparison, the same *N*-acyl substitution patterns have been applied to the new RBM15 series (Fig. 1).

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### Materials

The required carboxylic acids [oleic, erucic, nervonic, and ( $\pm$ )- $\alpha$ -hydroxyeicosanoic] were obtained from commercial sources. DMEM, FBS, methyl- $\beta$ -cyclodextrin (MBCD), and tetracycline were from Sigma. Zeocin was from Genaxxon Bioscience

and blasticidin from CalBiochem. Opti-MEM and lipofectamine 2000 were from Invitrogen. Recombinant human NC was obtained from R&D Systems. pCMV6 plasmid harboring the mouse Acer3 (MR218055) was from OriGene and the plasmid harboring ASAH2 was kindly provided by Dr. Daniel Canals and Prof. Yussuf Hannun (Department of Medicine, State University of New York at Stony Brook, Stony Brook, NY).

### Synthesis

The probes described in this work were obtained by acylation of RBM14 (11) or RBM15 with the suitable carboxylic acid. Probe RBM15 was obtained from deprotection of the corresponding *N*-Boc precursor (RBM15-*N*-Boc), obtained as described in (16).

**Deprotection of RBM15-*N*-Boc.** A solution of the starting material (382 mg, 942.2  $\mu$ mol) in methanol (60 ml) was treated with CH<sub>3</sub>COCl (500  $\mu$ l, 27.6 mmol) and the reaction was stirred at room temperature overnight. The mixture was concentrated in vacuo and the resulting crude was flash chromatographed (silica gel) with a step gradient of DCM/methanol (from 0% to 5% methanol at 1% increments). Compound RBM15 (262 mg, 855  $\mu$ mol, 91% yield) was obtained as a yellow oil; TLC (DCM:methanol, 9:1; R<sub>f</sub>: 0.13); [ $\alpha$ ]<sub>D</sub><sup>25</sup>: -3.86 (c 1.0, methanol). IR:  $\delta$  3,322 ( $\nu_{\text{O-H}}$  and  $\nu_{\text{N-H}}$ ), 2,934 ( $\nu_{\text{CH}_3}$ ), 1,698 ( $\nu_{\text{C=O}}$ , ester); <sup>1</sup>H NMR (CD<sub>3</sub>OD, 400 MHz):  $\delta$  7.89 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 7.54 (d, J = 8.5 Hz, 1H), 6.97-6.89 (m, 2H), 6.25 (d, J = 9.5 Hz, 1H), 5.97 (dtd, J = 15.2, 6.8, 1.3 Hz, 1H), 5.67 (ddt, J = 15.5, 6.6, 1.5 Hz, 1H), 4.34 (ddd, J = 6.1, 4.7, 1.2 Hz, 1H), 4.16 (t, J = 6.4 Hz, 2H), 3.81 (dd, J = 11.6, 4.1 Hz, 1H), 3.68 (dd, J = 11.6, 8.2 Hz, 1H), 3.23 (dt, J = 8.6, 4.4 Hz, 1H), 2.65-2.57 (m, 2H); <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub>, 400 MHz):  $\delta$  163.64, 163.31, 156.86, 145.79, 131.50, 131.31, 130.46, 114.04, 113.91, 113.22, 102.19, 70.77, 68.83, 59.48, 58.31, 32.92.

**HRMS.** Calculated for C<sub>16</sub>H<sub>20</sub>NO<sub>5</sub><sup>+</sup> [M+H]<sup>+</sup>: 306.1341; Found: 306.1328.

**General method for acylation of RBM14 and RBM15.** A solution of HOBt (40 mg, 285.3  $\mu$ mol), the corresponding carboxylic acid (280  $\mu$ mol), and EDC (70 mg, 380.4  $\mu$ mol) in anhydrous DCM (5 ml) was added dropwise to a solution of RBM14 or RBM15 (190  $\mu$ mol) in DCM (5 ml) and Et<sub>3</sub>N (100  $\mu$ l, equivalent to 717  $\mu$ mol) under argon atmosphere. For the amides of ( $\pm$ )- $\alpha$ -hydroxyeicosanoic acids, the solution of EDC and HOBt was added dropwise over a mixture of the starting amine and the carboxylic acid. In all cases, the reaction mixture was stirred at room temperature overnight, and the mixture was concentrated in vacuo. The resultant crude was flash-chromatographed (silica gel)

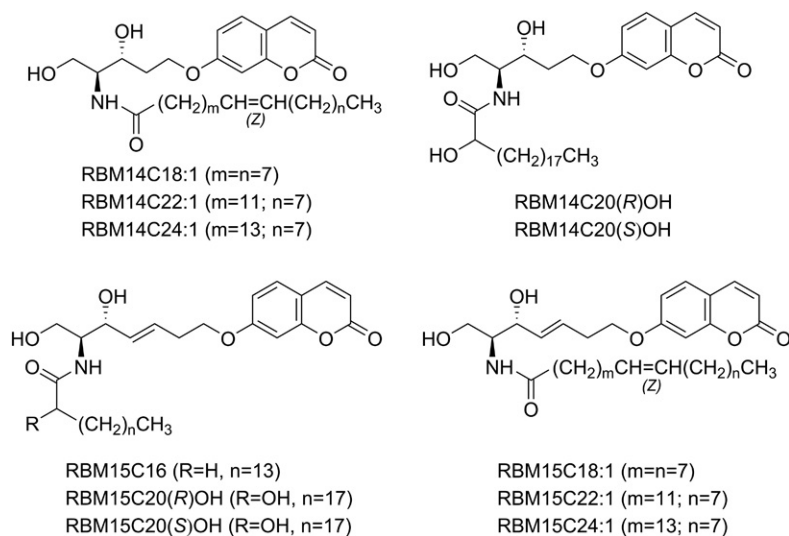


Fig. 1. Probes described in this work.

using a step gradient of DCM/methanol (from 0% to 3% methanol at 1% increments). The required amides were obtained as oils or waxy solids. Full characterization and NMR spectra can be found in the supplemental data.

## Cells

The FD-AC cell line stably overexpressing AC (provided by Prof. Thierry Levade, INSERM UMR1037 CRCT, Toulouse, France), HeLa T-Rex ACER1-TET-ON, HeLa T-Rex ACER2-TET-ON, HEK293T, and HT29 cells were cultured at 37°C in 5% CO<sub>2</sub> in DMEM medium supplemented with 10% FBS. The antibiotic selection of HeLa T-Rex TET-ON cells was performed with zeocin (25 µg/ml) and blasticidin (5 µg/ml). These antibiotics were removed during treatments.

## Enzyme source

Experiments with AC were performed in lysates of the FD-AC cell line stably overexpressing ASAH1. NC experiments were carried out in recombinant human NC and in HT29-overexpressing NC cells. To overexpress human NC, HT29 cells were transfected with 2.5 µg/well of a plasmid harboring the ASAH2 gene using 5 µl/well lipofectamine and Opti-MEM, following the manufacturer's instructions. Then, tetracycline (0.05 µM) was added for 24 h before use. In the case of ACERs, microsomes from three different cell lines were used. To overexpress mouse ACER3, HEK293T cells were transfected with 2.5 µg/well of a plasmid harboring the mouse ACER3 gene using 5 µl/well lipofectamine and Opti-MEM, following the manufacturer's instructions. To overexpress ACER1 and ACER2, tetracycline (0.05 µM) was added to HeLa T-Rex TET-ON cells for 24 h before use.

## Cell lysates

Cell pellets were resuspended in the appropriate volume of a 0.25 M saccharose solution with the protease inhibitors, aprotinin (1 mg/ml), leupeptin (1 mg/ml), and PMSF (100 mM). 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.

## Microsomal preparations

Cell lysates obtained from HeLa T-Rex ACER1-TET-ON, HeLa T-Rex ACER2-TET-ON, and HEK293T-overexpressing ACER3 cells were transferred to ultracentrifuge tubes and spun at 100,000 *g* for 1 h at 4°C. Pellets were resuspended in a 0.25 M saccharose solution and protein concentration was determined as specified below.

## Determination of protein concentration

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

## Ceramidase activities

Activity assays were carried out in 96-well plates at a final volume of 100 µl/well. Reaction buffers were: 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 (AC); 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 1% sodium cholate (NaChol) pH 7.4 (NC); and 50 mM HEPES and 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 9 (ACERs). The reaction mixtures contained 25 µl/well of protein (recombinant NC or cell lysate) and 75 µl/well of substrate. Substrates were tested at 40 µM concentration, prepared from 4 mM stock solutions in ethanol. The reaction mixture was incubated at 37°C for 3 h, except for the determination of *K<sub>M</sub>* and *V<sub>max</sub>* parameters (between 20 and 60 min, depending on the substrate). For the determination of ceramidase activity

with RBM14 substrates, reactions were stopped with 25 µl/well of methanol and then 100 µl/well of NaIO<sub>4</sub> (2.5 mg/ml in glycine-NaOH buffer, pH 10.6) were added. After incubation at 37°C for 30 min in the dark, 100 µl/well of 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 10.6) were added. To determine ceramidase activity with RBM15 substrates, reactions were stopped with 50 µl/well of NaIO<sub>4</sub> (2.5 mg/ml in methanol) and then 100 µl/well of KOH-methanol were added (0.1 M KOH-methanol solution in the case of NC and ACERs or 0.2 M KOH-methanol for AC). After incubation at 37°C for 30 min in the dark, 50 µl/well of 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 10.6) were added. In all cases, 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.

## Ceramidase activity in intact cells

To determine ceramidase activity in intact cells, 5 × 10<sup>5</sup> cells per well were seeded in a 12-well plate. HT29 cells were transfected with 1 µg/well of a plasmid harboring the ASAH2 gene using 2 µl/well lipofectamine and Opti-MEM, following the manufacturer's instructions. Then tetracycline (0.05 µM) was added for 24 h before use. Medium was replaced by MBCD at 1, 5, and 10 mM in DMEM with NaChol (500 µM) for 30 min. Then RBM14-C24:1 was added at a final concentration of 40 µM. The plate was incubated for 3 h at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. The reaction was stopped with 125 µl/well of methanol and then 500 µl/well of NaIO<sub>4</sub> (2.5 mg/ml in glycine-NaOH buffer, pH 10.6) were added. After incubation at 37°C for 1 h in the dark, 500 µl/well of 0.1 M glycine-NaOH buffer (pH 10.6) were added and fluorescence was measured spectrophotometrically at excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively. The same reaction mixtures without cells were used as blanks.

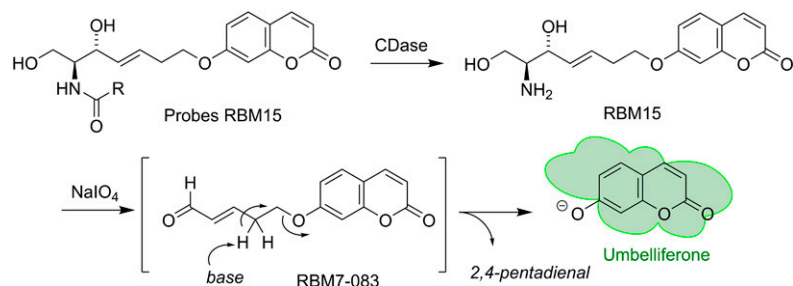
## Statistics

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 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).

## RESULTS

### Design and synthesis of the probes

Probes RBM14 were obtained by *N*-acylation of the free base with the required carboxylic acids, following previously reported protocols (12, 13). Probes RBM15 were inspired in our "second generation" probes for S1P lyase, in which the installation of a vinyl unit between the amino diol moiety and the umbelliferone reporter led to a significant increase of affinity, probably due to the closer similarity of the vinylogated probe with the natural substrate (16). The retro oxa-Michael reaction required for the release of the fluorescent reporter from probes RBM15 can be promoted under basic conditions (see below) by abstraction of one of the γ-protons of the intermediate aldehyde RBM7-083 (16) resulting from NaIO<sub>4</sub> oxidation of the amino diol RBM15 arising from hydrolysis of the probe by the target ceramidase (Fig. 2).



**Fig. 2.** Metabolic degradation of probes RBM15 and release of umbelliferone after oxidation of the free base and treatment of the transient aldehyde RBM7-083 with a base.

### Optimization conditions for umbelliferone release

Unlike our previously reported protocol with substrates RBM14 (11–13), the standard Gly-NaOH buffer (pH 10.6) proved inefficient to promote the complete release of the umbelliferone from the transient aldehyde RBM7-083 arising from oxidation of the aminodiol RBM15 (Fig. 2). Harsher basic conditions were required in this case to ensure acceptable levels of umbelliferone. The optimized conditions from RBM15 required the use of 0.2 M KOH-methanol (for AC) or 0.1 M KOH-methanol (for NC and ACERs), followed by a 30 min incubation at 37°C in the dark, prior to the addition of 0.2 M glycine-NaOH buffer (pH 10.6) (50  $\mu$ l/well). However, even under these optimized conditions, a fluorescence of around 65% of the theoretical maximum was observed (supplemental Fig. S2).

### Probes RBM14 and RBM15 as AC substrates

Probes RBM14 and RBM15 (Fig. 1) were tested as AC substrates in FD-AC cell lysates overexpressing AC. These probes were compared with RBM14C12, reported as AC substrate in previous work (12, 13). None of the new RBM14 probes were superior to RBM14C12 as AC substrates in lysates from FD-AC cells, as evidenced by the fluorescence values observed for the released umbelliferone (Fig. 3A). This was also true for probes RBM15, because RBM15C16, the best AC substrate of this series, gave values around three times lower than those from RBM14C12 (Fig. 3B). These results are in agreement with the known preference of AC for C12–C14 Cers (7) and also with the fact that long-chain Cers are not AC substrates (17).

### Probes RBM14 and RBM15 as NC substrates

Probes RBM14 and RBM15 were tested as substrates in human recombinant NC and HT29 cell lysates overexpressing NC and compared with RBM14C16, which was reported in a previous article as the most efficient NC substrate among the RBM14 probes (12). In all the experiments, similar results were obtained with recombinant NC (Fig. 3C, D) and with cell lysates (Fig. 3E, F), although the corresponding C16 and C18:1 probes of both series (RBM14 and RBM15) were somewhat better substrates in cell lysates, in comparative terms with the remaining probes. The kinetic parameters in human recombinant NC are shown in Table 1. Among RBM14 substrates, RBM14C24:1 proved slightly superior in terms of affinity ( $K_M$ ) and efficiency ( $K_{cat}$ ). The preference of human recombinant NC for this *N*-acyl side chain was surprising, given the preference of

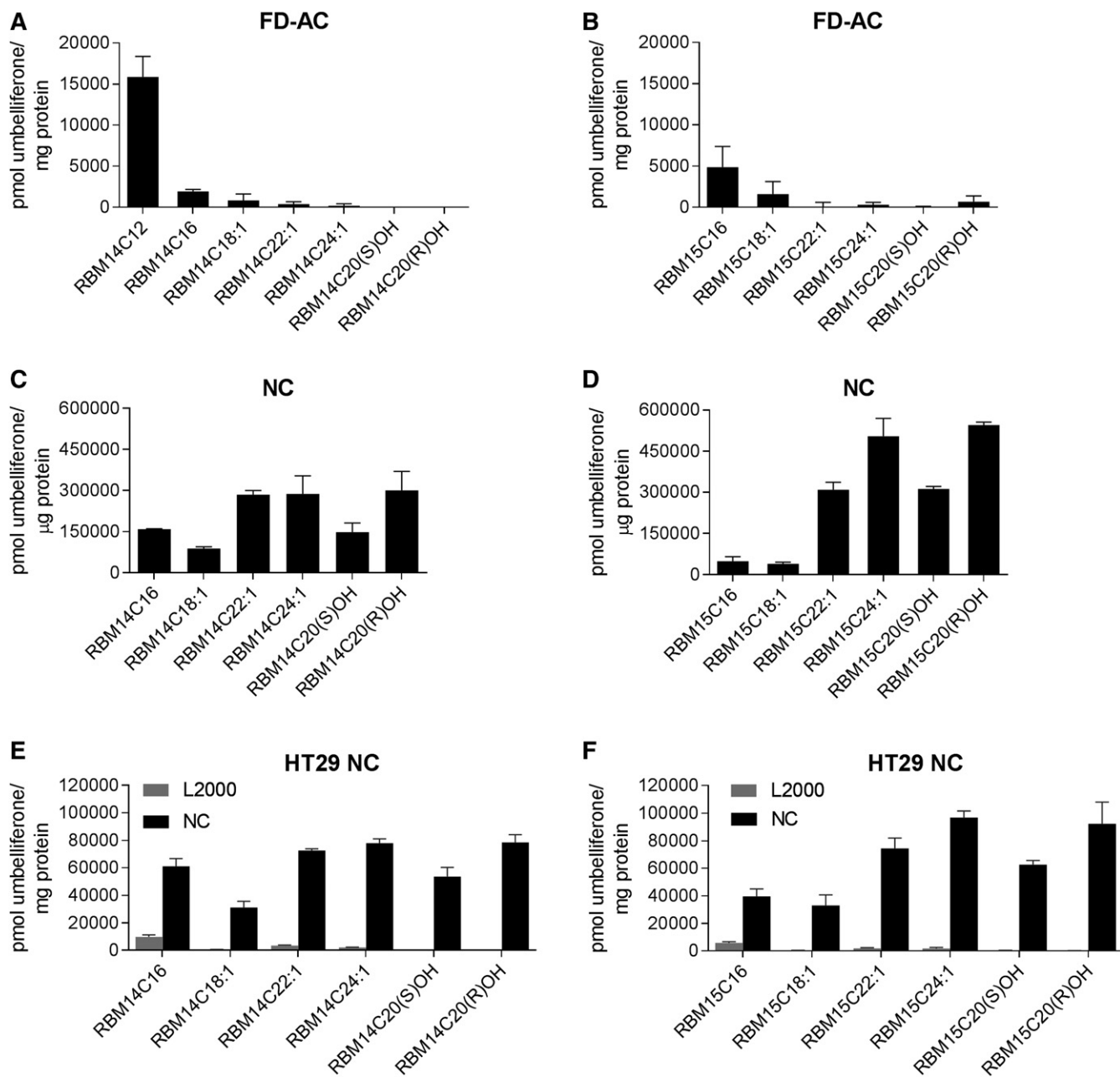
the enzyme for C16 and C18 Cers (7, 18). On the other hand, the vinylogated probes RBM15 showed a slightly lower affinity in comparison with the corresponding RBM14 probes, albeit with similar or even superior  $K_{cat}/K_M$  parameters. Interestingly, despite the vinylogated probes RBM15 being generally well tolerated by human recombinant NC, a striking drop in affinity was observed for RBM15C16, with  $K_M > 250$ . Finally, both (*R*)- and (*S*)- $\alpha$ -hydroxyeicosanoyl amides were well tolerated by NC, which showed a slight selectivity, in terms of  $K_{cat}$ , for the (*R*) isomer in the RBM15 series.

### Probes RBM14 and RBM15 as ACER substrates

Three different ACERs have been reported with an optimum activity at around pH 9. Because NC exhibits some residual CDase activity at basic pH, ACER-overexpressing systems were used to test the ability of our probes to act as ACER substrates. In a previous work (12), we showed that RBM14 probes of short to medium *N*-acyl chain lengths (C8 to C16) were inactive as ACER1 and ACER2 substrates, showing only a moderate activity as ACER3 substrates. In this work, RBM14 analogs with longer saturated or unsaturated *N*-acyl chains were devoid of activity as substrates toward all three ACER-overexpressing systems (Fig. 4; supplemental Fig. S3A, C, E). However, the vinylogated probes RBM15 have been revealed as new ACER1 and ACER2 substrates, being practically inactive toward ACER3. Only RBM15C16 behaved as an ACER3 substrate, although weaker than its RBM14 counterpart (Fig. 3; supplemental Fig. S3B, D, F). Overall, probes RBM15 having a long unsaturated *N*-acyl chain (18:1 and 22:1) can be used as substrates to determine ACER1 and ACER2 activities.

### Selectivity of probe RBM14C24:1 for NC

The probe RBM14C24:1 turned out to be one of the best substrates in kinetic terms on the recombinant human NC (Fig. 5) with the lowest  $K_M$  and a high  $K_{cat}/K_M$  ratio, compared with the rest of substrates tested (Table 1), and a high selectivity for NC (Fig. 5A). The above promising results prompted us to test this substrate in intact HT29 cells. However, no activity was observed after the initial assays (results not shown), which was attributed to the inability of the probe to cross the cell membrane. Encapsulation into liposomes, similarly as reported by us for a related probe (16), was not feasible due to the low solubility of RBM14C24:1 in the required solvent system. Gratifyingly, the use of MBCD, a well-known system used to increase the solubility of nonpolar substances, such as fatty acids, lipids,



**Fig. 3.** Determination of AC (A, B) and NC (C–F) activity using RBM14 and RBM15 substrates. AC activity was measured in cell lysates from FD-AC-overexpressing cells. Incubations were carried out with RBM14 (A) or RBM15 (B) substrates in 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5. NC activity was measured in recombinant NC (C, D) or cell lysates from HT29 control cells (L2000) and HT29 overexpressing ASAH2 (NC) (E, F). Incubations were carried out with RBM14 (C, E) or RBM15 (D, F) substrates in 50 mM HEPES, 150 mM NaCl, and 1% sodium cholate pH 7.4. New RBM14 substrates were compared with RBM14C12 (for AC) and RBM14C16 (for NC). Data correspond to the mean  $\pm$  SD of at least three different experiments with triplicates.

vitamins, and cholesterol, in several cell culture applications (19) proved efficient to allow the use of RBM14C24:1 as NC substrate in intact cells (Fig. 5B). A concentration-dependent effect for MBCD was observed, and an optimal concentration of 5 mM could be established.

## DISCUSSION

Cer is considered the hub of the intricate set of pathways that are implicated in the biosynthesis and degradation of

sphingolipids (20). Apart from the biosynthesis from simple structural moieties in the so-called de novo pathway, Cer can also be generated by the degradation of complex sphingolipids. Moreover, Cer, as well as dhCer (21), can also be degraded by CDases, a type of amido hydrolases that selectively convert Cers and dhCers into So and sphinganine, respectively, by hydrolysis of the *N*-fatty acyl chain present in the above sphingolipids. Interestingly, the removal of the *N*-acyl chain is important not only to control the relative levels of sphingolipids inside the cell but also to dramatically alter their intracellular mobility as a result of

TABLE 1. Kinetic parameters for the NC catalyzed hydrolysis of substrates RBM14 and RBM15

Probe	$K_M$	$K_{cat}$	$K_{cat}/K_M$
RBM14C16	16 ± 3.3 <sup>a</sup>	3,281 ± 298	205.1
RBM14C18:1	28 ± 3.0	432 ± 64	15.4
RBM14C20(S)OH	14 ± 0.2	3,075 ± 61	219.6
RBM14C20(R)OH	16 ± 1.7	2,655 ± 317	165.9
RBM14C22:1	28 ± 6.5	1,397 ± 219	49.9
RBM14C24:1	8 ± 1.7	1,581 ± 100	197.6
RBM15C16	> 250	—	—
RBM15C18:1	139 ± 7.2	3,761 ± 465	27.1
RBM15C20(S)OH	21 ± 1.9	7,257 ± 1,092	345.6
RBM15C20(R)OH	42 ± 0.02	22,954 ± 1,004	546.5
RBM15C22:1	33 ± 1.7	4,977 ± 515	150.8
RBM15C24:1	40 ± 0.9	8,415 ± 1,282	210.4

$K_M$  is given in micromol,  $K_{cat}$  as  $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ , and  $K_{cat}/K_M$  as  $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Recombinant NC (5 ng) was incubated between 20 and 60 min (depending on the substrate) at graded concentrations. Experiments were carried out as described in the methodology. Data are mean ± SD of three to five independent experiments with triplicates.

<sup>a</sup>See (12).

the changes in the physical properties after *N*-deacylation (22). Among the different CDases, overexpression of NC has been implicated in colon carcinogenesis (14) and,

hence, has emerged as a new therapeutic target. In this context, the discovery of selective inhibitors of this enzyme should be boosted by the development of efficient sensitive analytical methods amenable for HTS protocols. Based on our previous works addressed at the development of fluorogenic probes for CDases (11–13), we were interested in expanding the scope and selectivity of our first generation probes (RBM14) by using alternative *N*-acyl chains, based on the reported preferences of CDases for the different *N*-acyl Cers. Based on these premises, a collection of potential RBM14 substrates has been synthesized and tested on our different CDase models. Interestingly, despite NC being selective for C16 and C18 Cers (10), the *N*-acyl unsaturated probe RBM14C24:1 emerged as the first selective NC substrate for recombinant human NC (Table 1, Fig. 5A). Moreover, by using MBCD as adjuvant, this substrate is also suitable to measure NC activity in intact cells. The fact that the C24:1 acyl chain of nervonic acid increases the selectivity of RBM14 probes toward NC is in full agreement with the reported structural data for this enzyme in which a 20 Å deep hydrophobic active site pocket determines the higher selectivity of NC toward long-chain acyl Cer substrates (23).

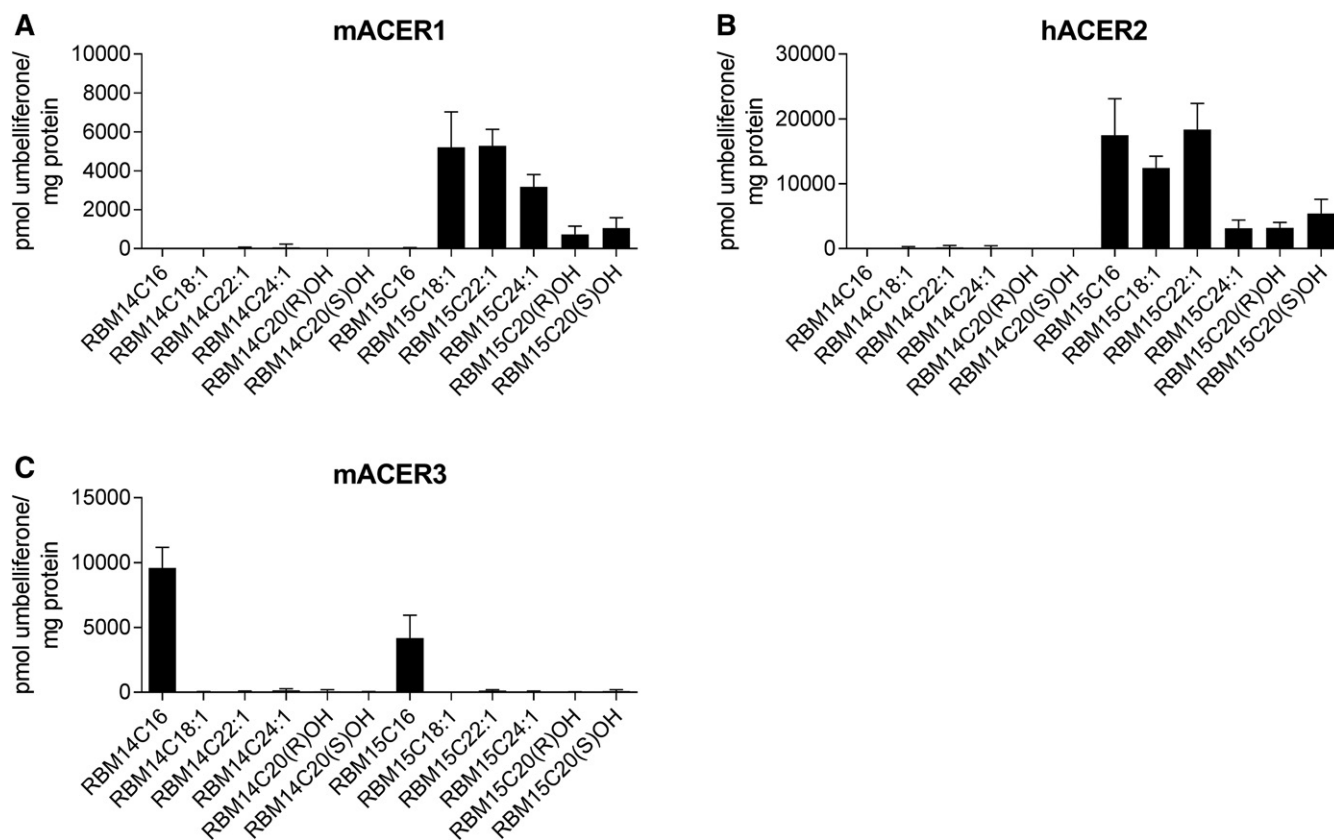
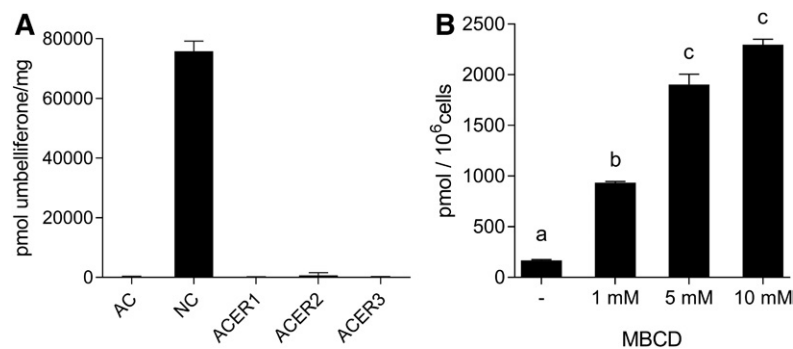



Fig. 4. Determination of ACER1 (A), ACER2 (B), and ACER3 (C) activity using RBM14 and RBM15 substrates. A: ACER1 activity was measured in microsomes isolated from mouse HeLa T-Rex ACER1-TET-ON cells grown in the absence or presence of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. Incubations were carried out with RBM14 or RBM15 substrates in 50 mM HEPES buffer with 1 mM  $\text{CaCl}_2$  at pH 9. B: ACER2 activity was measured in microsomes isolated from human HeLa T-Rex ACER2-TET-ON cells grown in the absence or presence of tetracycline (10 ng/ml) for 24 h. Incubations were carried out with RBM14 or RBM15 substrates in 50 mM HEPES buffer with 1 mM  $\text{CaCl}_2$  at pH 9. C: ACER3 activity was measured in microsomes isolated from mouse HEK293T control cells or HEK293T ACER3-overexpressing cells. Incubations were carried out with RBM14 or RBM15 substrates in 50 mM HEPES buffer with 1 mM  $\text{CaCl}_2$  at pH 9. Hydrolysis of RBM14C16 (12) by the different ACERs is also shown for comparison. Data correspond to the mean ± SD of at least three different experiments with triplicates. Data correspond to difference between control cells and ACER-overexpressing cells (see also supplemental Fig. S3).



**Fig. 5.** Hydrolysis of RBM14C24:1 by CDase. A: Incubations with RBM14C24:1 were carried out with cell lysates (AC and NC) or microsomes (ACERs) at acid, neutral, or alkaline pH, as described in the Experimental Procedures. The amount (picomoles) of umbelliferone released from RBM14C24:1 was measured. Data (mean  $\pm$  SD) were obtained from three different experiments with triplicates. B: NC activity in intact cells using RBM14C24:1 as substrate. HT29 cells were incubated for 30 min with MBCD at different concentrations in DMEM with NaChol (500  $\mu$ M), followed by 3 h treatment with 40  $\mu$ M of RBM14C24:1. Non-MBCD-treated cells were also tested. The amount (picomoles) of umbelliferone released from RBM14C24:1 was measured. Data correspond to the mean  $\pm$  SD of two different experiments with duplicates. Data were analyzed by one-way ANOVA ( $P < 0.0001$ ) followed by Bonferroni's multiple comparison test. Different letters denote a statistically significant difference between groups ( $P < 0.05$ ).

Based on these considerations, the C24:1 acyl chain would be too long to fit into the 13 Å cavity found in the AC active site (24).

To further expand the applicability of our probes, we designed a second generation set of potential substrates (compounds RBM15, see Fig. 1). As a differential feature, these modified substrates incorporate the characteristic C4-C5 vinyl unit present in the natural Cers. Because probes RBM15 can be regarded as the vinylogated analogs of probes RBM14, their design also fits into the essence of the well-established principle of vinylogy (25). In our effort to find selective CDase substrates, probes RBM15 were tested in our five CDase models and compared with the corresponding RBM14 counterparts. The most interesting results were obtained with probes RBM15 having long unsaturated *N*-acyl chains (18:1 and 22:1), which behaved as useful ACER1 and ACER2 substrates (Fig. 4A, B) and were totally devoid of activity on AC (Fig. 3A, B) and ACER3 (Fig. 4C). Because RBM15C18:1 showed much weaker activity as NC substrate (Fig. 3C-F), this probe has emerged as the best fluorogenic probe reported so far to measure ACER1 and ACER2 activities in a 96-well plate format. Although less studied than other CDases, recent studies have shown the implication of ACER1 in mammalian skin homeostasis and whole-body energy homeostasis (26) and that of ACER2 in DNA damage (27) and cell differentiation processes (28).

In summary, the fluorogenic probes reported in this work complement our previously reported probe for AC (RBM14C12) (11–13) by enlarging the scope of applicability with the discovery of RBM14C24:1 as a highly selective probe for NC and probe RBM15C18:1 for ACER1 and ACER2 with very low NC activity. These results represent a valuable addition to the available toolkit of fluorogenic CDase substrates and may enable the development of efficient HTS protocols for the screening of potential selective inhibitors of this relevant group of amidohydrolases. 

The authors acknowledge the experimental contributions from Mr. Alex García and Mr. Pedro Rayo.

## REFERENCES

- Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 2018. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**: 175–191.
- Newton, J., S. Lima, M. Maceyka, and S. Spiegel. 2015. Revisiting the sphingolipid rheostat: evolving concepts in cancer therapy. *Exp. Cell Res.* **333**: 195–200.
- Sanllehí, P., J. L. Abad, J. Casas, and A. Delgado. 2016. Inhibitors of sphingosine-1-phosphate metabolism (sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate lyase). *Chem. Phys. Lipids.* **197**: 69–81.
- Coant, N., W. Sakamoto, C. Mao, and Y. A. Hannun. 2017. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv. Biol. Regul.* **63**: 122–131.
- 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.
- Vasiliauskaitė-Brooks, I., R. D. Healey, P. Rochaix, J. Saint-Paul, R. Sounier, C. Grison, T. Waltrich-Augusto, M. Fortier, F. Hoh, E. M. Saied, et al. 2018. Structure of a human intramembrane ceramidase explains enzymatic dysfunction found in leukodystrophy. *Nat. Commun.* **9**: 5437.
- Mao, C., R. Xu, Z. M. Szulc, A. Bielawska, S. H. Galadari, and L. M. Obeid. 2001. Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase: a mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J. Biol. Chem.* **276**: 26577–26588.
- 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.
- 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.

12. Casasampere, M., L. Camacho, F. Cingolani, J. Casas, M. Egido-Gabás, J. L. Abad, C. Bedia, R. Xu, K. Wang, D. Canals, et al. 2015. Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic N-acylated coumarin-containing aminodiols. *J. Lipid Res.* **56**: 2019–2028.
13. 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.
14. García-Barros, M., N. Coant, T. Kawamori, M. Wada, A. J. Snider, J. P. Truman, B. X. Wu, H. Furuya, C. J. Clarke, A. B. Bialkowska, et al. 2016. Role of neutral ceramidase in colon cancer. *FASEB J.* **30**: 4159–4171.
15. Lin, C-L., R. Xu, J. K. Yi, F. Li, J. Chen, E. C. Jones, J. B. Slutsky, L. Huang, B. Rigas, J. Cao, et al. 2017. Alkaline ceramidase 1 protects mice from premature hair loss by maintaining the homeostasis of hair follicle stem cells. *Stem Cell Reports.* **9**: 1488–1500.
16. Sanllehí, P., M. Casasampere, J-L. Abad, G. Fabriàs, O. López, J. Bujons, J. Casas, and A. Delgado. 2017. The first fluorogenic sensor for sphingosine-1-phosphate lyase activity in intact cells. *Chem. Commun. (Camb.)* **53**: 5441–5444.
17. Momoi, T., Y. Ben-Yoseph, and H. L. Nadler. 1982. Substrate-specificities of acid and alkaline ceramidases in fibroblasts from patients with Farber disease and controls. *Biochem. J.* **205**: 419–425.
18. El Bawab, S., A. Bielawska, and Y. A. Hannun. 1999. Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **274**: 27948–27955.
19. Uekama, K. 2004. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)* **52**: 900–915.
20. Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 2011. Many ceramides. *J. Biol. Chem.* **286**: 27855–27862.
21. Fabrias, G., J. Munoz-Olaya, F. Cingolani, P. Signorelli, J. Casas, V. Gagliostro, and R. Ghidoni. 2012. Dihydroceramide desaturase and dihydrosphingolipids: debutant players in the sphingolipid arena. *Prog. Lipid Res.* **51**: 82–94.
22. Hannun, Y. A., and L. M. Obeid. 2008. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**: 139–150.
23. 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.
24. Gebai, A., A. Gorelik, Z. Li, K. Illes, and B. Nagar. 2018. Structural basis for the activation of acid ceramidase. *Nat. Commun.* **9**: 1621.
25. Krishnamurthy, S. 1982. The principle of vinylogy. *J. Chem. Educ.* **59**: 543–547.
26. Liakath-Ali, K., V. E. Vancollie, C. J. Lelliott, A. O. Speak, D. Lafont, H. J. Protheroe, C. Ingvorsen, A. Galli, A. Green, D. Gleeson, et al. 2016. Alkaline ceramidase 1 is essential for mammalian skin homeostasis and regulating whole-body energy expenditure. *J. Pathol.* **239**: 374–383.
27. Xu, R., K. Wang, I. Mileva, Y. A. Hannun, L. M. Obeid, and C. Mao. 2016. Alkaline ceramidase 2 and its bioactive product sphingosine are novel regulators of the DNA damage response. *Oncotarget.* **7**: 18440–18457.
28. 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.

## ARTICLE 2

**Discovery of deoxyceramide analogs as highly selective ACER3 inhibitors in live cells**

Núria Bielsa<sup>1</sup>, Mireia Casasampere<sup>1</sup>, Mazen Aseeri<sup>1</sup>, Josefina Casas<sup>1,2</sup>, Antonio Delgado<sup>1,3</sup>, José Luis Abad1 i Gemma Fabriàs<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup> Centre d'Investigació Biomèdica en Xarxa, Malalties Hepàtiques i Digestives (CIBEREHD, ISCIII), 28029 Madrid, Espanya

<sup>3</sup> Universitat de Barcelona (UB), Facultat de Farmàcia i Ciències de l'Alimentació, Departament de Farmacologia, Toxicologia i Química Mèdica, Unitat de Química Farmacèutica (Unitat associada al CSIC), 08028 Barcelona, Espanya

*European Journal of Medicinal Chemistry (EJMECH)*. 2021; Feb 24;216:113296. doi: 10.1016/j.ejmech.2021.113296

Factor d'impacte: 5,572

La contribució de la Núria Bielsa a aquest treball presentat com a part del capítol 1 d'aquesta tesi correspon al disseny d'experiments, i obtenció i elaboració de les dades presentades a les figures 2A, 3B, 3C, 5 i S2. També ha contribuït a l'escriptura del primer esborrany.

Josefina Casas Brugulat i Gemma Fabriàs Domingo

Directores de tesi



### RESUM

#### Descobriments d'anàlegs d'1-desoxiceramides com a inhibidors altament selectius de l'ACER3 en cèl·lules intactes

**Objectiu:** Les CDases AC, NC i ACER3 són les més ubíquies i el seu interès terapèutic com a dianes en diferents tipus de càncer ha anat guanyant pes. Així doncs, és important disposar d'inhibidors específics i potents de les diferents CDases per a fins terapèutics. Se n'han reportat alguns, però quasi tots van dirigits a la AC, i n'hi ha pocs per la NC. Per l'ACER3, en canvi, no hi ha cap inhibidor específic ben caracteritzat. Per això en aquest treball s'han testat dues llibreries de compostos amb l'objectiu de trobar inhibidors específics de CDases, especialment de la NC i l'ACER3, en cèl·lules intactes.

**Metodologia:** Les activitats CDasa es van determinar mesurant la fluorescència alliberada pels substrats RBM14 un cop 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. Per avaluar l'activitat de la AC es van utilitzar lisats cel·lulars de la línia FD-AC, que sobreexpressa l'enzim de manera estable. L'activitat NC es va mesurar en enzim recombinant humà de NC així com en lisats cel·lulars de la línia HT29 i cèl·lules intactes de la línia MEF-WT en comparació amb la línia MEF nul·la per ASAH2, que es va utilitzar per a mesurar l'activitat ACER3. Els diferents compostos es van incubar juntament amb els substrats durant el temps necessari en cada cas.

**Resultats:** El cribratge de dues quimiotèques de compostos (sèrie 1 i sèrie 2) com a inhibidors de la AC, la NC i l'ACER3 va resultar en el descobriment d'inhibidors d'ACER3 altament selectius en cèl·lules intactes. Els compostos **8**, **20**, **20l** i **20m** van inhibir l'activitat de l'enzim recombinant humà NC, però van perdre potència inhibidora de la NC en lisats cel·lulars, i van resultar inactius en cèl·lules intactes. D'alta banda, cap dels 4 compostos no va inhibir de manera significativa l'activitat AC en lisats cel·lulars ni en cèl·lules intactes. El compost **8** va inhibir molt poc l'activitat ACER3 en lisats cel·lulars, però els compostos **20l** i **20m** van resultar inhibidors en lisats i en cèl·lules intactes. Aquesta inhibició de l'activitat ACER3, mesurada per l'assaig d'activitat de fluorescència, es va corroborar mitjançant anàlisi dels nivells de Cer per LC/MS (cromatografia líquida acoblada a un espectròmetre de masses), que van augmentar en les mostres incubades amb qualsevol dels dos inhibidors.

**Conclusions:** Els compostos **20l** i **20m** són inhibidors específics de l'activitat ACER3 en cèl·lules intactes. Com a tals, augmenten els nivells cel·lulars de Cer. Curiosament, en presència de MBCD (metil- $\beta$ -ciclodextrina), però no en absència, els compostos **20l** i **20m** són molt citotòxics en cèl·lules HT29. Els

mecanismes d'aquesta citotoxicitat són encara desconeguts. Els cribratges de compostos sobre la NC s'haurien de realitzar en lisats cel·lulars o cèl·lules intactes, i no en enzim recombinant, ja que l'ús de l'enzim recombinant humà porta a resultats que no es corresponen amb els obtinguts amb l'enzim endogen, on els compostos són molt menys actius.





## Discovery of deoxyceramide analogs as highly selective ACER3 inhibitors in live cells

Núria Bielsa <sup>a,1</sup>, Mireia Casasampere <sup>a,1</sup>, Mazen Aseeri <sup>a</sup>, Josefina Casas <sup>a,b</sup>, Antonio Delgado <sup>a,c</sup>, José Luis Abad <sup>a,\*\*</sup>, Gemma Fabriàs <sup>a,b,\*</sup>

<sup>a</sup> Research Unit on BioActive Molecules, Department of Biological Chemistry, Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Jordi Girona 18, 08034, Barcelona, Spain

<sup>b</sup> Liver and Digestive Diseases Networking Biomedical Research Centre (CIBEREHD), ISCIII, 28029, Madrid, Spain

<sup>c</sup> Department of Pharmacology, Toxicology and Medicinal Chemistry, Unit of Pharmaceutical Chemistry (Associated Unit to CSIC). Faculty of Pharmacy. University of Barcelona (UB). Avda. Joan XXIII 27-31, 08028, Barcelona, Spain

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 6 November 2020

Received in revised form

27 January 2021

Accepted 12 February 2021

Available online 24 February 2021

#### Keywords:

Sphingolipid

Ceramide

Ceramidase

Inhibitor

Therapeutic target

Enzyme activity

### ABSTRACT

Acid (AC), neutral (NC) and alkaline ceramidase 3 (ACER3) are the most ubiquitous ceramidases and their therapeutic interest as targets in cancer diseases has been well sustained. This supports the importance of discovering potent and specific inhibitors for further use in combination therapies. Although several ceramidase inhibitors have been reported, most of them target AC and a few focus on NC. In contrast, well characterized ACER3 inhibitors are lacking. Here we report on the synthesis and screening of two series of 1-deoxy(dihydro)ceramide analogs on the three enzymes. Activity was determined using fluorogenic substrates in recombinant human NC (rhNC) and both lysates and intact cells enriched in each enzyme. None of the molecules elicited a remarkable AC inhibitory activity in either experimental setup, while using rhNC, several compounds of both series were active as non-competitive inhibitors with  $K_i$  values between 1 and 5  $\mu$ M. However, a dramatic loss of potency occurred in NC-enriched cell lysates and no activity was elicited in intact cells. Interestingly, several compounds of Series 2 inhibited ACER3 dose-dependently in both cell lysates and intact cells with  $IC_{50}$ 's around 20  $\mu$ M. In agreement with their activity in live cells, they provoked a significant increase in the amounts of ceramides. Overall, this study identifies highly selective ACER3 activity blockers in intact cells, opening the door to further medicinal chemistry efforts aimed at developing more potent and specific compounds.

© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

## 1. Introduction

Besides playing structural roles, sphingolipids are acknowledged as a family of bioactive lipids. Ceramides are the central

**Abbreviations:** AC, acid ceramidase; ACER3, alkaline ceramidase 3; ASAH2, neutral ceramidase gene; C6-urea-ceramide, D-erythro-N-[2-(1,3-dihydroxy-4E-octadecene)]-N'-hexane-urea; D-e-DMAPP, (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol; LC/MS, liquid chromatography coupled to mass spectrometry; MEF, mouse embryonic fibroblasts; NC, neutral ceramidase; rhNC, recombinant human NC.

\* Corresponding author. Research Unit on BioActive Molecules Department of Biological Chemistry Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC), Spain.

\*\* Corresponding author.

E-mail addresses: [jose Luis.abad@iqac.csic.es](mailto:jose Luis.abad@iqac.csic.es) (J.L. Abad), [gemma.fabriàs@iqac.csic.es](mailto:gemma.fabriàs@iqac.csic.es) (G. Fabriàs).

<sup>1</sup> Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113296>

0223-5234/© 2021 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

molecules in sphingolipid metabolism. They can be generated via three different pathways, the *de novo* pathway, hydrolysis of complex sphingolipids, and the salvage pathway from sphingosine 1-phosphate [1]. The canonical *de novo* pathway begins with the condensation of palmitoyl CoA with L-serine catalyzed by serine palmitoyltransferase. Mutations in this enzyme induce a permanent shift in the substrate specificity of the enzyme from L-serine to L-alanine and glycine, resulting in increased production of 1-deoxysphingolipids [2].

After their synthesis, ceramides are converted to complex sphingolipids (sphingomyelin, ceramide 1-phosphate and glycosphingolipids) by substitution at the C1-hydroxyl group with polar groups. Due to the absence of this function, the addition of a head group to form complex sphingolipids is precluded in 1-deoxysphingolipids. Moreover, while ceramides are degraded to ethanolamine phosphate and a fatty aldehyde via sequential hydrolysis of ceramides, phosphorylation of the resulting long chain

base to the corresponding phosphate and final irreversible retroaldolic cleavage by sphingosine-1-phosphate lyase [1], this pathway is not possible for 1-deoxysphingolipids, as the essential catabolic intermediate, sphingosine 1-phosphate, cannot be formed from the 1-deoxybases [2].

Hydrolysis of ceramides occurs by the action of ceramidases, which are encoded by five known genes and are distinguished by the pH required for optimal activity (acid ceramidase (AC, ASAH1), neutral ceramidase (NC, ASAH2) and alkaline ceramidases 1, 2 and 3 (ACER1, ACER2 and ACER3) [3]. Conversely, 1-deoxy(dihydro) ceramides are exclusively hydrolyzed by AC [4]. Amongst the five different enzymes, AC, NC and ACER3 are the most ubiquitous and their therapeutic interest as targets in cancer diseases has been well sustained [5].

AC is a glycosylated 50 kDa enzyme belonging to the N-terminal nucleophile (Ntn) superfamily of hydrolases. It is synthesized in the ER as an inactive proenzyme that is activated in the lysosome through autocleavage, rendering a mature heterodimeric enzyme containing  $\alpha$ - and  $\beta$ -subunits [6]. The crystal structures have shown that the catalytic center is buried in the proenzyme, while autocleavage triggers a conformational change exposing the active site hydrophobic channel [7]. Genetic loss-of-function mutations in AC are the underlying cause of two severe rare diseases: Farber disease and spinal muscular atrophy with progressive myoclonic epilepsy [8]. Furthermore, changes in the expression levels of AC has been found to be relevant in melanoma [9–12], prostate cancer [13–16] and acute myeloid leukemia [17–19].

NC is a single transmembrane domain glycoprotein highly expressed in the small intestine and colon and it appears to regulate the levels of bioactive sphingolipid metabolites in the intestinal tract [20]. Its crystal structure revealed a catalytic domain, a short linker, and an immunoglobulin-like domain. The structure also revealed that the active site of human NC is composed of a narrow, 20 Å deep, hydrophobic pocket with a  $Zn^{2+}$  ion at the bottom [21]. Besides a few other roles [22–26], a function of NC in cancer is supported by the findings that NC downregulation is involved in gemcitabine-induced growth suppression [27] and by recent studies showing that NC regulates cell survival in colon cancer cells [28,29]. These studies demonstrated that inhibition of NC in a xenograft model delayed tumor growth and that mice lacking NC were protected from azoxymethane-induced tumor formation [28].

ACER3 is a seven-transmembrane domain with an intracellular N-terminus exposed to the cytoplasm and the C-terminus facing the lumen of the endoplasmic reticulum or Golgi apparatus. The protein contains functionally connected catalytic  $Zn^{2+}$  and  $Ca^{2+}$ -binding sites, providing a structural explanation for the known regulatory role of  $Ca^{2+}$  on ACER3 enzymatic activity [30,31]. Genetic ACER3 deficiency leads to progressive leukodystrophy in early childhood [32], a rare disease for which no treatment is available. Furthermore, ACER3 has been reported to contribute to hepatocellular carcinoma [33] and acute myeloid leukemia pathogenesis [34] and its downregulation has been shown to inhibit cell proliferation [35].

The role of ceramidases in human diseases is gaining increasing attention. However, current research in this field has been hampered by the lack of specific inhibitors for some of these enzymes. Although several inhibitors of ceramidases have been discovered [36], most of them target AC. Over the last two decades, a number of NC inhibitors have been reported, but their potency is low, their specificity has not been thoroughly investigated and none has reached clinical effect [36]. A recent article reports on a large (>650,000 small molecules) high-throughput screening assay for NC inhibitors that has resulted in interesting leads [37]. Unfortunately, no chemical structures are provided and further investigation of hits in cell free systems and intact cells has not been

performed. On the other hand, only one inhibitor of alkaline ceramidases (ACER) has been reported, namely (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol (D-e-DMAPP) [38], but the specific ACER target has not been identified and a few articles claim that D-e-DMAPP inhibits also AC [39] and NC [40]. Thus, the identification of new tools should significantly advance our knowledge on the function of the different ceramidases, allow a better understanding of their role in the regulation of biological processes and in addition, may potentially lead to novel therapeutic strategies.

From the biological stand point, 1-deoxysphingolipids are relevant in diseases such as hereditary sensory and autonomic neuropathy, a genetic condition caused by mutations in serine palmitoyltransferase (see above). Furthermore, several clinical studies showed that 1-deoxysphingolipids are altered the metabolic syndrome and in type 2 diabetes [41]. Moreover, plasma 1-deoxysphingolipids are also elevated in von Gierke disease [42], and appear to be also relevant in the progress from hepatosteatosis to steatohepatitis [2].

In the light of these overall precedents, we envisioned that 1-deoxysphingolipid analogs might provide compounds with interesting biological properties. Herein, we report on the screening of 1-deoxysphingolipid analogs (Fig. 1) on AC, NC and ACER3 that yield to the identification of highly selective ACER3 inhibitors acting both in lysates and intact cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Chemical synthesis

Synthesis and characterization of compounds is detailed in the supplementary materials.

### 2.2. Cell culture

The A375 cell line stably overexpressing ASAH1 under the control of a doxycycline-responsive promoter was kindly provided by Dr. Carmen Bedia and Prof. Thierry Levede. HT29 cells were obtained from ATCC, Farber disease (FD) cells transformed to stably overexpress AC (FD10X) were a kind gift of Prof. Jeff Medin and ASAH2<sup>(-/-)</sup> mouse embryonic fibroblasts (MEF) were kindly provided by Prof. Richard Proia. In the latter, experiments were conducted at least two weeks after thawing. All cells were maintained in DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) supplemented with 10% FBS (Fetal Bovine Serum). Cells were kept at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> and routinely grown up to 70% confluence.

### 2.3. Cell transfection

The antibiotic selection in the A375 cell line stably overexpressing ASAH1 under the control of a doxycycline-responsive promoter was performed with blasticidin (3 µg/mL) and hygromycin B (250 µg/mL). Ectopic expression of AC was induced with doxycycline at 1 µg/mL for 24 h before use.

Transient transfections with the ASAH2-containing plasmid were performed with Lipofectamine® 2000 (Invitrogen) in a 12-well plate format. One day before transfection, 3 × 10<sup>5</sup> cells/mL were plated in growth medium without antibiotics, so that cells would be 90–95% confluent at the time of transfection. For each transfection sample, cDNA was diluted in 50 µL of Opti-MEM®I without serum; lipofectamine (2 µL) was diluted in 50 µL of Opti-MEM®I Medium and incubated for 5 min at 25 °C. Next, both solutions were combined, mixed gently, and incubated for 20 min at 25 °C. The resulting solution was mixed with 400 µL of medium and it was added to cells. After 4 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, 1 mL of medium

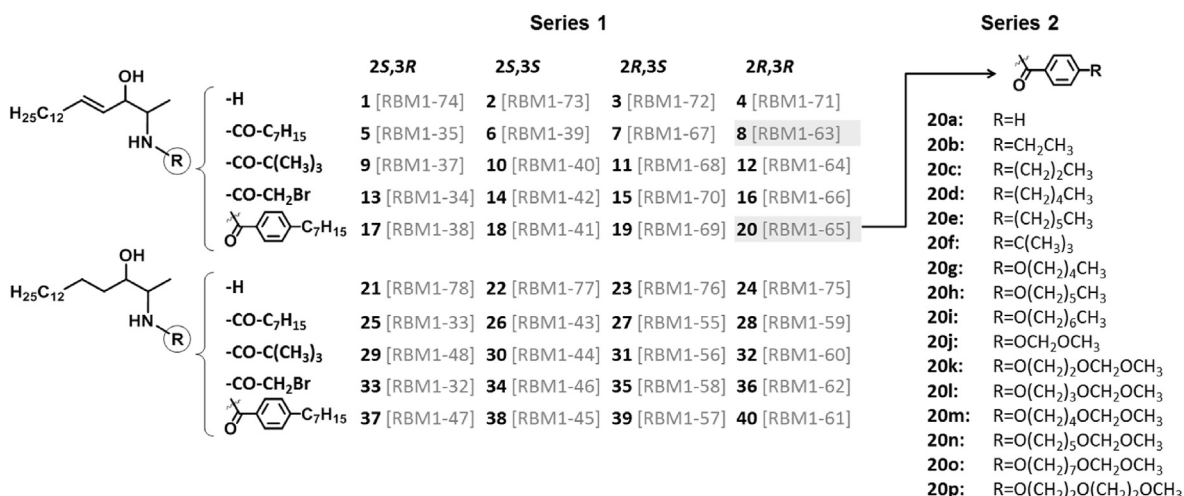


Fig. 1. Chemical structures of the 1-deoxyceramides studied in this work. Internal codes are shown in grey between brackets.

containing 10% FBS and tetracycline (10 ng/mL) was added. Cells were incubated for 24 h prior to testing for transgene expression and compounds addition for inhibitory activity determination.

#### 2.4. Cell viability

Cells (0.1–0.25 × 10<sup>6</sup>/ml) were seeded in 96 well plates (0.1 ml/well) and grown for 24 h. Cell viability was examined in triplicate samples by the MTT method after treatment with the indicated compounds or with the corresponding percentage of vehicle (≤0.25% ethanol)

#### 2.5. Fluorogenic ceramidase activity assay in vitro

Experiments with rhNC (R&D Systems, >95% pure) were carried out with 5 ng of protein (MW = 83 kDa) in 0.1 mL of buffer (see below), which affords a protein concentration of 0.6 nM for a substrate concentration of 20 μM. These conditions (substrate concentration much larger than protein concentration) are appropriate to use the Lineweaver-Burk plot to study the enzyme kinetics.

To prepare the lysates, cell pellets were resuspended in the appropriate volume of a 0.25 M saccharose solution containing the protease inhibitors aprotinin (1 mg/mL), leupeptin (1 mg/mL) and PMSF (100 mM). The suspension was submitted to three cycles of a 5 s sonication (probe) at 10 W/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 with BSA as a standard using a BCA protein determination kit (Thermo Scientific) according to the manufacturer's instructions.

All the enzyme activity assays were carried out in 96-well plates at a final volume of 100 μL/well. Reaction buffers were: 25 mM sodium acetate buffer pH 4.5 (AC), 25 mM phosphate buffer 150 mM NaCl 1% sodium cholate (NaChol) pH 7.4 (NC) and 50 mM HEPES 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 9 (ACERs). The reaction mixtures contained 25 μL/well of protein (5 ng recombinant NC or 25 μg cell lysate), 70 μL/well of substrate (prepared from 4 mM stock solutions in ethanol) and 5 μL/well of inhibitor (tested at concentrations indicated in the figure legends, prepared from 10 mM stock solutions in ethanol). The following fluorogenic substrates were used at the concentrations specified in the figure legends: for AC, RBM14C12 [43]; for NC, RBM14C24:1 [44] and for ACER, RBM14C16 [45]. Reaction mixtures were incubated at 37 °C for 1 h (recombinant NC

or 3 h (cell lysates). In all cases, reactions were stopped with 25 μL/well of MeOH and then 100 μL/well of NaIO<sub>4</sub> (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.

#### 2.6. Fluorogenic ceramidase activity assay in intact cells

To determine ceramidase activity in intact cells, 2 × 10<sup>4</sup> cells/well were seeded in 96-well plates 24 h prior to the assay and maintained at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Medium was replaced by 100 μL of fresh medium (DMEM 10% FBS) containing 10 μM of the corresponding RBM14 substrate and different concentrations of the indicated test compounds. The plate was incubated for 3 h at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>. The reaction was stopped with 25 μL/well of MeOH and then 100 μL/well of NaIO<sub>4</sub> (2.5 mg/mL in glycine-NaOH buffer, pH 10.6) were added. After incubation at 37 °C for 1 h in the dark, 100 μL/well of 100 mM glycine-NaOH buffer (pH 10.6) were added and fluorescence was measured spectrophotometrically at excitation and emission wavelengths of 355 and 460 nm, respectively. The same reaction mixtures without cells were used as blanks. The following fluorogenic substrates were used at the concentrations specified in the figure legends: for AC, RBM14C12 [43] and for NC and ACER3, RBM14C16 [45]. Both substrates and test compounds were added simultaneously to the cell culture.

#### 2.7. Lipid analysis

Cells were seeded at 0.2 × 10<sup>6</sup> cells/mL in 6 well plates (1 mL/well). After 24 h, medium was replaced with fresh medium containing either the treatment of interest or the corresponding vehicle as a control. After the indicated incubation times, medium was removed and cells were washed with PBS. Cells were collected by trypsinization. Ten μL of the cell suspension were used to count cells for each sample. Sphingolipid extracts, fortified with internal standards (*N*-dodecanoylsphingosine, *N*-dodecanoylglucosylsphingosine, *N*-dodecanoylsphingosylphosphorylcholine, C17-sphinganine (0.2 nmol each) were added and lipids were analyzed by LC/MS with the reported equipment and instrument conditions [46].

### 3. Results

#### 3.1. Synthesis

Due to the interesting properties, biological activity and improved metabolic stability of 1-deoxysphingolipids, as well as to the finding that 1-deoxydihydroceramides with the natural stereochemistry are exclusively hydrolyzed by AC [4], a small library of derivatives was prepared based on the structure of 1-deoxysphingosine and 1-deoxysphinganine covering the four possible stereoisomers. The *N*-acyl moieties were chosen because of our previous reports showing that the corresponding (dihydro) ceramides are ceramidase inhibitors [15,47]. Sphingoid bases were prepared as previously reported [48] and deoxyceramide analogs (Fig. 1) were synthesized by amidation of the proper enantiopure sphingoid base with the corresponding acid derivative according to the previously described methodology (Scheme 1).

#### 3.2. Studies in recombinant protein and cell lysates

Given the interest of AC, NC and ACER3 as therapeutic targets in cancer, Series 1 was first screened over these three enzymes at equimolar concentrations with the appropriate substrates. The activity over AC was tested in lysates from AC-overexpressing cells using RBM14C12, as the best AC fluorogenic substrate [43]. As shown in Figure S1, none of the compounds exhibited a remarkable inhibition of AC, even when the inhibitor/substrate molar ratio was increased to (2:1) (data not shown). Intriguingly, the bromoacetyl derivatives of 1-deoxysphingosine and 1-deoxysphinganine with the natural configuration (**13** and **33**, Fig. 1) did not inhibit AC, in contrast to their analogs containing the C1–OH, which are potent activity based irreversible AC inhibitors [15,49].

Activity over NC was initially tested using recombinant human NC (rhNC) and RBM14C16, as the best NC fluorogenic substrate [45]. Two compounds, **8** and **20**, completely blocked NC activity when tested at a substrate/inhibitor ratio of 1:1 (20  $\mu$ M) and provoked a 70 and 90% inhibition, respectively, at 5  $\mu$ M (20  $\mu$ M substrate) (data not shown). Reducing **8** and **20** concentrations to 1  $\mu$ M (substrate/inhibitor molar ratio of (20:1)) provoked a 50% and 70% inhibition of NC, respectively (Figure S1). It is worth noting that the two compounds are 1-deoxyceramides, while the corresponding saturated analogs were inactive at inhibiting NC, indicating that the C4-double bond is required for inhibition. Furthermore, they have a (2*R*,3*R*) configuration, different from that of the natural substrate (2*S*,3*R*), which agrees with a non-competitive inhibition where the inhibitor binds the enzyme at allosteric sites (see below).

Next, compounds were screened against ACER3 using lysates of *ASAH2*-null (*ASAH2*<sup>(-/-)</sup>) mouse embryonic fibroblasts (MEF). These cells are considered a suitable model to screen ACER3 inhibitors since they lack NC, and ACER3 is the only alkaline ceramidase detected [45]. No significant ACER3 inhibition was elicited by these compounds at basic pH, in the presence of Ca<sup>2+</sup> and at a substrate/inhibitor molar ratio of (1:1) (Figure S1).

Based on the structure of one of the most potent compound identified (**20**) as NC inhibitor, a focused library of analogs was next prepared including a set of more hydrophilic derivatives (Table S1) by modification of the benzene *para*-substituent by either shortening the chain length or introducing oxygen atoms. In this case, *O*-alkylbenzoic acids bearing a alkyl/polyoxygenated side chain were obtained by coupling of *p*-hydroxybenzoic acid methyl ester with the respective halogen derivatives using a two-step sequence (condensation and saponification) (Scheme 1).

Compounds belonging to this Series 2 were again screened against AC, NC and ACER3. None of the compounds inhibited AC at equimolar (Fig. S1) or two-fold molar (not shown) concentrations

with the substrate (20  $\mu$ M) when assayed in cell lysates from AC overexpressing cells. However, compounds **20** and **20l** were slightly inhibitory at 40  $\mu$ M (Fig. 3A). Conversely, several inhibitors were also identified in the screening of Series 2 against recombinant NC, although none of them was more active than **20** (Fig. 2A). These results provided some insights into structure-activity relationships on the recombinant protein. Hence, decreasing the *p*-alkylphenyl substituent chain length (**20a**, **20b** and **20c**) resulted in reduction of the inhibitory activity, as compared to **20**, while compounds **20d** and **20e** had a similar activity to the reference compound. Introduction of one oxygen atom in the *p*-alkylphenyl substituent afforded compounds with similar inhibitory activity, while addition of two additional oxygen atoms resulted in reduction of activity (compare **20k** vs **20g**; **20l** vs **20h**, and **20m** vs **20i**). In addition, changing the oxygen position along the chain had also a negative effect on NC inhibitory activity (compare **20l** vs **20p**). Interestingly, the screening of the focused library on ACER3 also identified some inhibitors, mostly corresponding to the  $\omega$ -methoxymethoxy family (Fig. 2B). Furthermore, activity against ACER3 was shown to be dose dependent for the two compounds examined (**20l** and **20m**) (Fig. 3C).

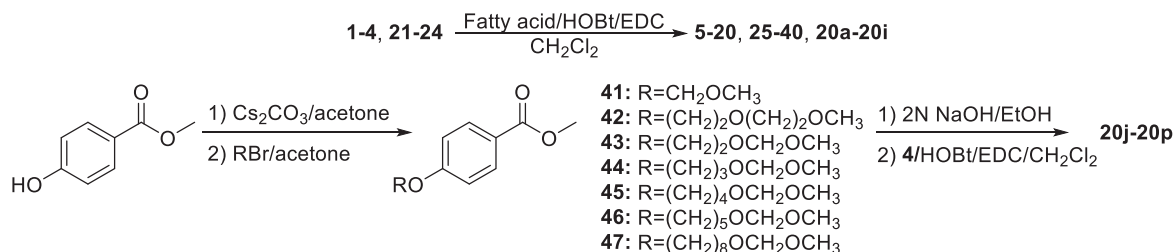
To get a deeper insight into the mode of inhibition against NC and ACER3, kinetic experiments were then conducted with **8**, **20**, **20l** and **20m**, two of the identified NC/ACER3 inhibitors<sup>2</sup>. Incubation of rhNC with different amounts of inhibitor at varied substrate concentrations resulted in modified  $V_{max}$  without significant changes in the  $K_m$  values (Fig. 4A), indicating that compounds **8**, **20**, **20l** and **20m** were non-competitive inhibitors of NC with  $K_i$  values of 2.0, 0.8, 5.4 and 3.6  $\mu$ M, respectively. A similar outcome was observed for the two compounds active on ACER3, which behaved also as non-competitive inhibitors with apparent  $K_i$  values of 25.5  $\mu$ M (**20l**) and 34.3  $\mu$ M (**20m**) (Fig. 4B).

To compare the effects observed on ACER3 containing lysates (Fig. 2B), the inhibitory activity of **8**, **20**, **20l** and **20m** was then tested in lysates of HT29 cells transiently transfected to overexpress NC (Fig. 3B). A specific NC substrate, bearing a nervonic acid amide (RBM14C24:1) was employed in this case, thereby enabling only the measurement of NC activity [44]. Surprisingly, only **20l** and **20m** were shown to dose-dependently inhibit the hydrolysis of RBM14C24:1 (10  $\mu$ M) at neutral pH (Fig. 3B) whereas no inhibition was observed with **8** and the parent compound **20**. Moreover, a remarkable reduction in potency was found in cell lysates, as compared to the recombinant enzyme, since a >40  $\mu$ M concentration was necessary to achieve a 50% inhibition (Fig. 3B). A similar outcome occurred with the C6-urea-ceramide (D-*erythro*-N-[2-(1,3-dihydroxy-4*E*-octadecene)]-N'-hexane-urea-sphingosine), a reported NC inhibitor [50], which inhibited rhNC and NC from cell lysates with IC<sub>50</sub>'s of 18 nM and 366 nM, respectively (Fig S2A). This decrease of potency observed when using cell lysates as compared to recombinant purified protein suggest that caution should be taken when interpreting data obtained with recombinant NC protein.

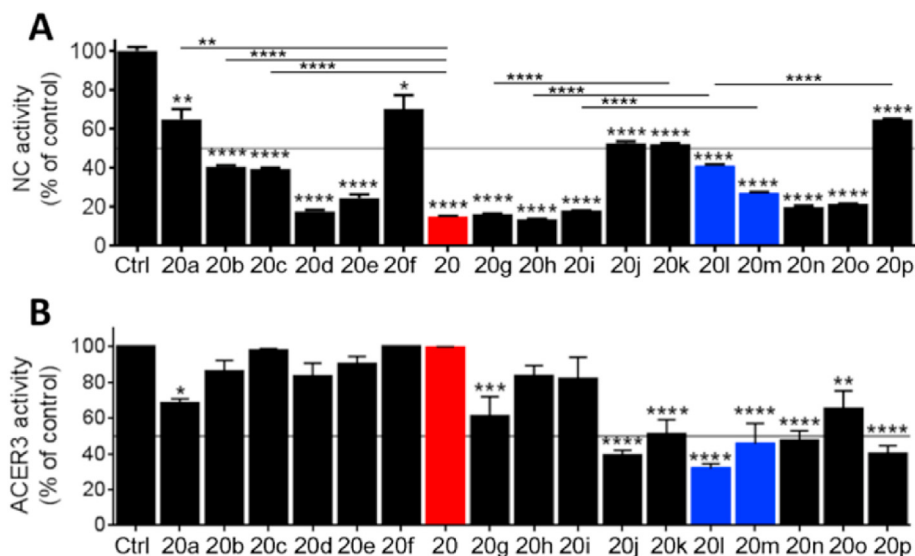
#### 3.3. Studies in intact cells

Since cell-based assays consider the biological complexity of the cell and include factors, such as uptake and concentration by intracellular compartmentalization, that might have a positive impact on both inhibitory potency and selectivity, the activity of **8**,

<sup>2</sup> With the idea of testing the compounds in intact cells, we chose compounds **20l** and **20m** as they have similar lipophilicity to that of cell permeable *N*-octanoyl-sphingosine (Table S1) [56,57] with the lowest reduction in NC inhibitory activity, as compared to **20**.



**Scheme 1.** Synthesis of compounds used in this study and shown in Fig. 1. The preparation of the free bases 1–4 and 21–24 was conducted as reported [48].



**Fig. 2.** Activity of Series 2 over rhNC (A) and ACER3 (ASAH2-null cell lysates) (B). Concentration of substrate was 20  $\mu\text{M}$  (A) or 10  $\mu\text{M}$  (B) and that of test compounds was 1  $\mu\text{M}$  (A) and 20  $\mu\text{M}$  (B). Suitable buffers and pH were used for each specific activity. Data (mean  $\pm$  SD) were obtained from two to three experiments with triplicates. Asterisks above the SD bars denote statistical significance over controls at \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ , while statistical significance between specific groups is indicated with asterisks above lines (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test).

**20**, **20l** and **20m** was next examined in intact cells. Like in the studies with cell lysates, test compounds and substrates were added simultaneously to the appropriate cell lines and incubations proceeded for 3 h. By using similar conditions, both in lysates and intact cells, we could get an estimation of the global effects of uptake and compartmentalization of the compounds on their inhibitory activity. However, a real analysis of both factors would require the use of fluorescent derivatives and the study of their subcellular distribution to confirm that they reach the organelles containing the target enzymes.

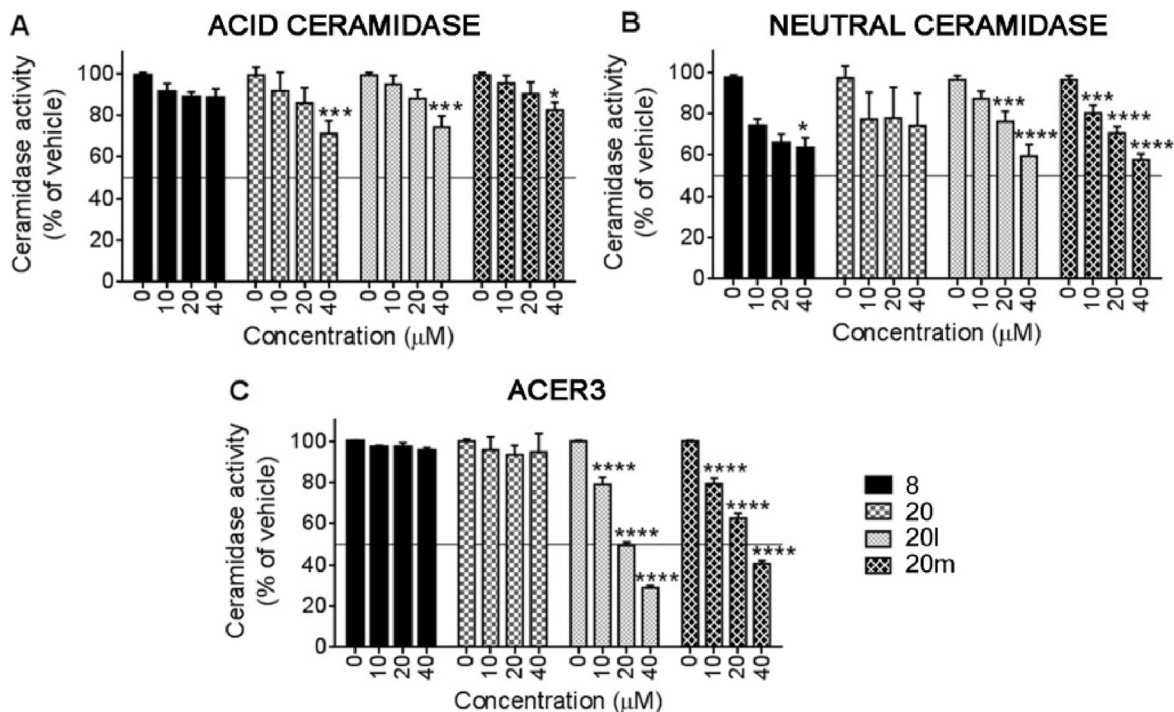
Activity over AC was tested using AC overexpressing A375 cells (A375/+Dox) and the fluorogenic substrate RBM14C12. No inhibition could be observed with **20**, whereas **20l** and **20m** exhibited very weak AC inhibitory activity ( $\text{IC}_{50}$ 's > 200  $\mu\text{M}$ ) (Fig. 5A).

Preliminary experiments to investigate the compounds' effect on NC revealed that they were very toxic in the presence of methyl- $\beta$ -cyclodextrin, the co-solvent required for the administration of the specific fluorogenic NC substrate (RBM14C24:1) in intact cells [44]. Since the NC specific substrate could not be used, RBM14C16 (substrate for both NC and ACER3) was employed and the inhibition experiments were carried out in ASAH2-null MEF (ACER3) and their wild type counterparts (WT-MEF) (NC and ACER3). Data comparison should allow discerning between NC and ACER3 inhibitory activity. As shown in Fig. 5B and C, compounds **8** and **20** exhibited insignificant inhibition of either NC or ACER3 while **20l** and **20m**, otherwise, both inhibited the hydrolysis of RBM14C16, and thereby

umbelliferone production, in both cell lines (Fig. 5C). Statistical comparison of the dose-response data revealed that the four curves and their corresponding  $\text{IC}_{50}$  values were not statistically different ( $P = 0.2206$ ). As the combined inhibition of both ACER and NC should result in higher inhibition rates in WT-MEF, these results, showing similar activities in both WT-MEF (which contain NC and ACER3 activity) and ASAH2-null MEF (lacking the NC gene), support that NC inhibition by **20l** and **20m** in intact cells is negligible and that ceramidase inhibition observed in intact cells is solely due to their action over ACER3 in both cell lines.

To confirm the effect of these two compounds on intracellular ceramide levels, a lipidomic analysis was performed in ASAH2-null MEF and in AC overexpressing A375 cells treated with either **20l** or **20m**. To this end, compounds were administered to cells and lipids were extracted and analyzed (LC/MS) after 3 h of treatment. Gratifyingly, in agreement with the results found with the fluorogenic assays, a significant 1.5–2-fold increase in the total amounts of ceramides was provoked by both **20l** and **20m** in ASAH2-null MEF, but no effect could be detected on sphingosine, sphingomyelin and glucosylceramide levels (Fig. 6A). Regarding the ceramides species, all of them were elevated by treatment with the compounds over vehicle controls, except for C24:0-ceramide, which was unaffected (Fig. 6B). Conversely, only a small effect on ceramide levels was provoked by **20l** in AC-overexpressing A375-cells (Fig. S3).





**Fig. 3.** Dose response of compounds on ceramidase activities in cell lysates. Experiments were carried out for 3 h (A, C) or 1 h (B) using 25 µg of lysates of AC overexpressing A375 cells (A), NC overexpressing HT29 cells (B) and ASAH2-null MEF (ACER3) (C), in 25 mM sodium acetate buffer, pH 4.5 (A), 25 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 1% sodium cholate, pH 7.4 (B), or 50 mM HEPES 1 mM CaCl<sub>2</sub>, pH 9 (C). Concentration of substrates (A, RBM14C12; B, RBM14C24:1; C, RBM14C16) was 10 µM. Data (mean ± SEM) was obtained from three to four experiments with triplicates. Asterisks denote statistical significance over controls at \*, p < 0.05; \*\*, p < 0.01; \*\*\*, p < 0.001; \*\*\*\*, p < 0.0001 (One-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparisons test).

#### 4. Discussion

In our endeavour towards developing ceramidase inhibitors of pharmacological interest, two series of 1-deoxy(dihydro)ceramides were synthesized and screened against NC, AC and ACER3, the most ubiquitous ceramidases identified as therapeutic targets in cancer diseases [5]. Series 1 includes several diastereomeric *N*-acyl 1-deoxysphingosine and 1-deoxysphinganine amide derivatives, while Series 2 contains analogs of **20** with presumably improved bioavailability. An important feature of both libraries is their metabolic stability in front of enzymes acting at the C1–OH level to produce sphingomyelin, ceramide 1-phosphate, glycosphingolipids and the long chain base phosphates [51].

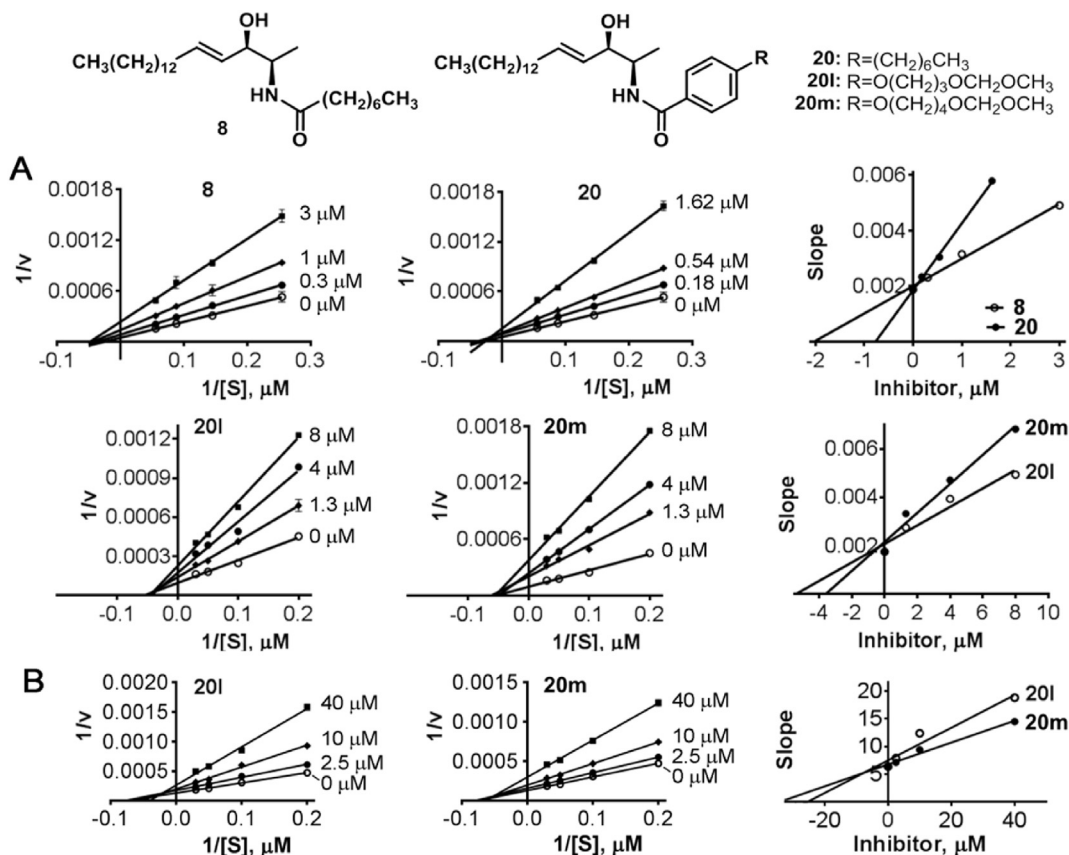
Whereas some compounds caused a significant and potent non-competitive inhibition of recombinant NC, studies performed in cell lysates with the most active inhibitors indicated a dramatic loss of potency, while several compounds of Series 2 inhibited ACER3. The identified selective ACER3 inhibitors, mostly belonging to the ω-methoxymethoxy family of Series 2, have a (2*R*,3*R*) configuration, different from that of the natural substrate (2*S*,3*R*), which suggests that the inhibitors bind the enzyme at allosteric sites in agreement with kinetic experiments showing that both **20l** and **20m** do not compete with the substrate active center.

This selective effect on ACER3 was further confirmed in studies with **20l** and **20m** using intact cells both in activity assays and after measurement of sphingolipid levels using mass-spectrometry methods, showing the expected increase in ceramides upon treatment with both compounds. However, no selective accumulation of long chain unsaturated ceramides was induced by **20l** and **20m**, which is at odds with reported data showing that ACER3 preferentially hydrolyzes these particular species [35] and that ACER3 upregulation prevents the buildup of C18:1-ceramide in mouse

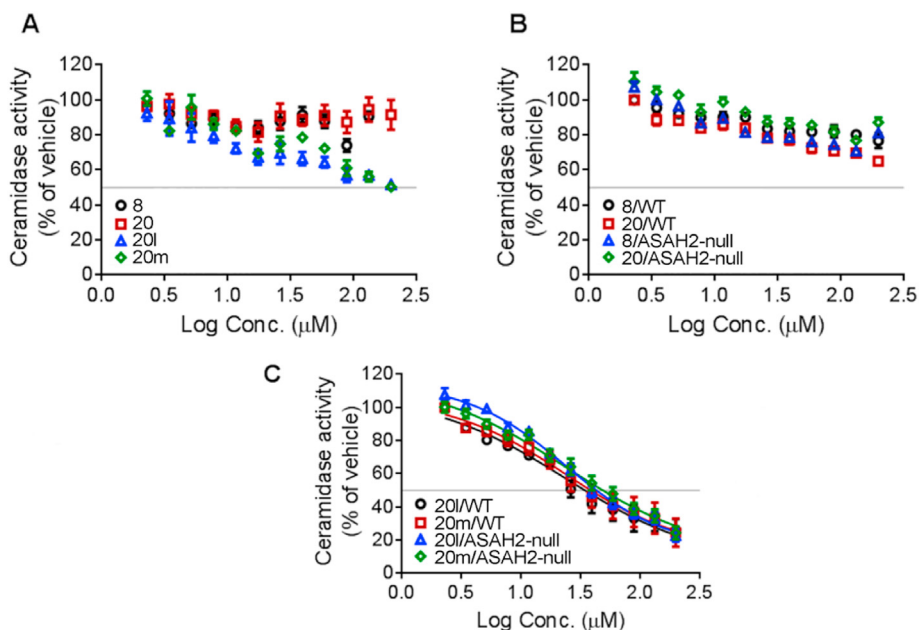
hepatocytes, while loss of ACER3 specifically augments C18:1-ceramide and C20:1-ceramide without affecting other ceramide species [52]. However, in another study showing that ACER3 is involved in aging-associated neurodegenerative disorders in humans [53], the effect of ACER3 knockout on the levels of ceramides and sphingosine was found to depend on both the age and the part of the brain examined, with the highest changes occurring in older tissues. However, no specific accumulation of long chain unsaturated ceramides was observed in ACER3 knock-outs as compared to wild types.

On the other hand, neither **20l** nor **20m** provoked the expected reduction in the amounts of sphingosine. A similar outcome was observed in ACER3-knockout mouse hepatocytes [52] and in 6 week old brains of ACER3 knockout mice [53]. Conversely, the expected reduction in sphingosine [35] or its phosphate [33] was observed in other ACER3 knockout cell models. Overall, although C18:1-ceramide is clearly involved in some biological actions of ACER3, the effects of up- and downregulation of this enzyme on ceramide species and their catabolic products seem to depend on the cell type, the type of stimulus and the biological context.

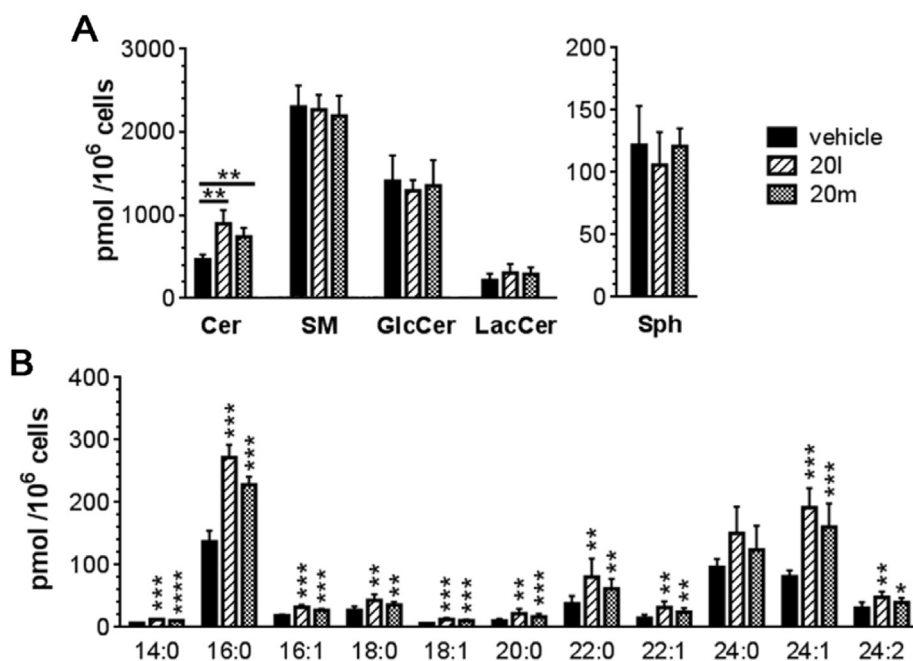
It is worth noting that the three cell permeable compounds, namely **8**, **20l** and **20m**, were very toxic when tested in the presence of methyl-β-cyclodextrin, a cholesterol depleting agent, in HT29 cells overexpressing NC. A study reported by Romiti et al. [54] showed that endothelial cell treatment with cyclodextrin enhanced NC activity in caveolin-enriched membranes, indicating a negative role for cholesterol in NC regulation. It is possible that methyl-β-cyclodextrin removes cholesterol from membrane pools leading to NC activation, the inhibition of which by the compounds would lead to ceramide increases and subsequent cell death. However, ceramide analysis by LC/MS did not show the expected increase in cells treated with the compounds in the presence of methyl-β-



**Fig. 4.** Kinetics of inhibition of NC and ACER3 by **8**, **20**, **20l** and **20m**. Experiments were carried out using recombinant NC (5 ng, 0.6 nM) in 25 mM phosphate buffer, 150 mM NaCl, 1% sodium cholate, pH = 7.5 (A) or lysates from ASAH2-null MEFs (25 μg) in 50 mM HEPES 1 mM CaCl<sub>2</sub> pH 9 (B). Concentrations of substrate (RBM14C16) were 3.9, 6.9, 11.3 and 18 μM (**8** and **20**) and 5, 10, 20 and 40 μM (**20l** and **20m**). Data (mean ± SD) were obtained from four experiments with triplicates. K<sub>i</sub>, as determined from the slope of the regression lines at each inhibitor concentration, were **8**, 2.0 μM; **20**, 0.8 μM; **20l**, 5.4 μM and **20m**, 3.6 μM in NC and **20l**, 25.5 μM and **20m**, 34.3 μM in ASAH2-null MEFs. Similar values were obtained using the x-intercept values.



**Fig. 5.** Effect of inhibitors on umbelliferone production from fluorogenic substrates in intact cells. AC overexpressing A375 cells (A), WT-MEF (B,C) and ASAH2-null MEF (B,C) were incubated with the fluorogenic substrate (A, RBM14C12 (10 μM); B and C, RBM14C16 (10 μM)) and different concentrations of the specified compounds in DMEM 10% FBS for 3 h and enzyme activity was determined by the fluorogenic assay. Data were normalized by protein quantification (SRB assay, >90% cell viability). Data (mean ± SD) were obtained from three experiments with triplicates. In C, statistical comparison of fits concluded that the LogIC<sub>50</sub> was the same for all data sets (p = 0.2206) and the IC<sub>50</sub> had a best fit value of 23.7 μM.



**Fig. 6.** Effect of inhibitors on sphingolipid levels in lysates of ASAH2-null MEF. Cells were treated with 50  $\mu$ M of compound and vehicle (control) in DMEM 10% FBS. After 3 h, lipids were extracted and analyzed by LC/MS. Data (mean  $\pm$  SD) were obtained from two experiments with triplicates. Asterisks indicate statistical significance over vehicle at \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$  (unpaired, two-tailed  $t$ -test). Total lipids are shown in A and ceramides species are represented in B.

cyclodextrin (data not shown). This suggests that cell death is provoked by the compounds independently of their effect on ceramide metabolism and that cells are sensitized to the molecules by the disturbance of cell membranes induced by cholesterol depletion.

An additional important finding of this article is the remarkable decrease of potency experienced by the NC inhibitors when used in NC-overexpressing cell lysates as compared to rhNC. Importantly, such activity reduction also occurred with C6-urea-ceramide, a competitive NC inhibitor [50], indicating that it is not exclusive to the non-competitive inhibitors reported here. The reason for this potency loss may lie in the structural differences between the commercially available rhNC and the natural enzyme. While NC is bound to the plasma membrane with a single transmembrane helix [21], rhNC lacks a part of the N-terminus that includes a few aminoacids of the transmembrane domain (Fig. S4). The truncated protein is soluble in aqueous buffers and it is possible that the inhibitor binding domain conformation in rhNC has a higher affinity for the inhibitors than in the membrane bound enzyme. In this regard, as an example, removal of the membrane anchor in calnexin to create a soluble protein resulted in changes in the profile of substrate binding [55]. In their library screening, Otsuka et al. [37] used secreted NC purified from Sf9 insect cells [21]. Their protein corresponds to the extracellular region (residues 99–780) of human NC with a C-terminal hexahistidine tag and an N-terminal secretory signal. Whether the inhibitors discovered in that high throughput screen retain activity over the natural protein in cell free systems or in live cells has not been reported. This would be interesting to know, as in case of activity reduction, it would alert against the convenience of using genetically modified soluble NC in screening programs and would sustain that studies in cell lysates or preferably live cells must be conducted to avoid false expectations in terms of inhibitory potency on the natural, membrane bound enzyme.

Efforts of numerous groups over the last two decades have enabled the identification of several ceramidase inhibitors.

However, in contrast to the better-characterized AC or NC, selective inhibitors of ACER3 are still lacking. Herein, we report that the screening of two series of deoxy(dihydro)ceramides against AC, NC and ACER3 resulted in the discovery of highly selective ACER3 inhibitors in live cells and discloses a scaffold for further medicinal chemistry efforts aimed at improving the ACER3 inhibitory potency. Such efforts should lead compounds devoid of off-target activities in cellulo as expected for **20l** and **20m** due to the high concentrations required for activity in the cell-based assay. Docking studies against the crystal structure of ACER3 [31] should aid in the design of the best ligands for further use in the study or treatment of diseases linked to ACER3 alterations. These include enzyme blockers in the event of overexpression and chemical chaperones in case of genetic deficiencies. Our results also alert about the importance of performing NC inhibitors screening programs in cell free systems and preferably, intact cells, since the use of rhNC affords results which are not recapitulated over the endogenous enzyme.

#### Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

#### Acknowledgments

This work has been partly funded by the Spanish Ministry of Economy, Industry and Competitiveness (grant CTQ2017-85378-R) and Fundaci3n BBVA (grant 35\_2018). We thank Dr. Gemma Triola for critically reading the manuscript, and Alexandre Garcia, Pedro Rayo, Neus Roca and Eva Dalmau for their excellent technical assistance.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2021.113296>.

## References

- [1] S.F. Morad, M.C. Cabot, Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells, *Nat. Rev. Canc.* 13 (2013) 51–65, <https://doi.org/10.1038/nrc3398>.
- [2] M.A. Lone, T. Santos, I. Alecu, L.C. Silva, T. Hornemann, 1-Deoxysphingolipids, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1864 (2019) 512–521, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2018.12.013>.
- [3] C. Mao, L.M. Obeid, Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate, *Biochim. Biophys. Acta* 1781 (2008) 424–434.
- [4] M. Casasampere, E. Izquierdo, J. Casas, J.L. Abad, X. Liu, R. Xu, C. Mao, Y.-T. Chang, A. Delgado, G. Fabrias, Click and count: specific detection of acid ceramidase activity in live cells, *Chem. Sci.* 11 (2020) 13044–13051, <https://doi.org/10.1039/D0SC03166F>.
- [5] N. Coant, W. Sakamoto, C. Mao, Y.A. Hannun, Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease, *Adv. Biol. Regul.* 63 (2017) 122–131, <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2016.10.002>.
- [6] N. Shtraizent, E. Eliyahu, J.-H.H. Park, X. He, R. Shalgi, E.H. Schuchman, Autoproteolytic cleavage and activation of human acid ceramidase, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 11253–11259, <https://doi.org/10.1074/jbc.M709166200>.
- [7] A. Gebai, A. Gorelik, Z. Li, K. Illes, B. Nagar, Structural basis for the activation of acid ceramidase, *Nat. Commun.* 9 (2018) 1621, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-03844-2>.
- [8] F.P.S. Yu, S. Amintas, T. Levade, J.A. Medin, Acid ceramidase deficiency: Farber disease and SMA-PME, *Orphanet J. Rare Dis.* 13 (2018) 121, <https://doi.org/10.1186/s13023-018-0845-z>.
- [9] C. Bedia, J. Casas, N. Andrieu-Abadie, G. Fabrias, T. Levade, Acid ceramidase expression modulates the sensitivity of A375 melanoma cells to dacarbazine, *J. Biol. Chem.* 286 (2011) 28200–28209, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.216382>.
- [10] N. Realini, F. Palese, D. Pizzirani, S. Pontis, A. Basit, A. Bach, A. Ganesan, D. Piomelli, Acid ceramidase in melanoma: expression, localization and effects of pharmacological inhibition, *J. Biol. Chem.* 291 (2016) 2422–2434, <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.666909>.
- [11] M. Lai, N. Realini, M. La Ferla, I. Passalacqua, G. Matteoli, A. Ganesan, M. Pistello, C.M. Mazzanti, D. Piomelli, Complete Acid Ceramidase ablation prevents cancer-initiating cell formation in melanoma cells, *Sci. Rep.* 7 (2017) 7411, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07606-w>.
- [12] J. Leclerc, D. Garandeau, C. Pandiani, C. Gaudel, K. Bille, N. Nottet, V. Garcia, P. Colosetti, S. Pagnotta, P. Bahadoran, G. Tondeur, B. Mograbi, S. Dalle, J. Caramel, T. Levade, R. Ballotti, N. Andrieu-Abadie, C. Bertolotto, Lysosomal acid ceramidase ASAH1 controls the transition between invasive and proliferative phenotype in melanoma cells, *Oncogene* 38 (2018) 1282–1295, <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0500-0>.
- [13] X. Liu, J.C. Cheng, L.S. Turner, S. Eloejimy, T.H. Beckham, A. Bielawska, T.E. Keane, Y.A. Hannun, J.S. Norris, Acid ceramidase upregulation in prostate cancer: role in tumor development and implications for therapy, *Expert Opin. Ther. Targets* 13 (2009) 1449–1458, <https://doi.org/10.1517/14728220903357512>.
- [14] T.H. Beckham, P. Lu, J.C. Cheng, D. Zhao, L.S. Turner, X. Zhang, S. Hoffman, K.E. Armeson, A. Liu, T. Marrison, Y.A. Hannun, X. Liu, Acid ceramidase-mediated production of sphingosine 1-phosphate promotes prostate cancer invasion through upregulation of cathepsin B, *Int. J. Canc.* 131 (2012) 2034–2043, <https://doi.org/10.1002/ijc.27480>.
- [15] L. Camacho, O. Meca-Cortes, J.L. Abad, S. Garcia, N. Rubio, A. Diaz, T. Celiaterassa, F. Cingolani, R. Bermudo, P.L. Fernandez, J. Blanco, A. Delgado, J. Casas, G. Fabrias, T.M. Thomson, Acid ceramidase as a therapeutic target in metastatic prostate cancer, *J. Lipid Res.* 54 (2013) 1207–1220, <https://doi.org/10.1194/jlr.M032375> [pii]10.1194/jlr.M032375 [doi].
- [16] J.C. Cheng, A. Bai, T.H. Beckham, S.T. Marrison, C.L. Yount, K. Young, P. Lu, A.M. Bartlett, B.X. Wu, B.J. Keane, K.E. Armeson, D.T. Marshall, T.E. Keane, M.T. Smith, E.E. Jones, R.R.D. Jr, A. Bielawska, J.S. Norris, X. Liu, Radiation-induced acid ceramidase confers prostate cancer resistance and tumor relapse, *J. Clin. Invest.* 123 (2013) 4344–4358, <https://doi.org/10.1172/JCI64791DS1>.
- [17] S.-F. Tan, X. Liu, T.E. Fox, B.M. Barth, A. Sharma, S.D. Turner, A. Awwad, A. Dewey, K. Doi, B. Spitzer, M.V. Shah, S.A.F. Morad, D. Desai, S. Amin, J. Zhu, J. Liao, J. Yun, M. Kester, D.F. Claxton, H.-G. Wang, M.C. Cabot, E.H. Schuchman, R.L. Levine, D.J. Feith, T.P. Loughran, Acid ceramidase is upregulated in AML and represents a novel therapeutic target, *Oncotarget* 7 (2016) 83208–83222, <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13079>.
- [18] S.F. Tan, W. Dunton, X. Liu, T.E. Fox, S.A.F. Morad, D. Desai, K. Doi, M.R. Conaway, S. Amin, D.F. Claxton, H.G. Wang, M. Kester, M.C. Cabot, D.J. Feith, T.P. Loughran, Acid ceramidase promotes drug resistance in acute myeloid leukemia through NF- $\kappa$ B-dependent P-glycoprotein upregulation, *J. Lipid Res.* 60 (2019) 1078–1086, <https://doi.org/10.1194/jlr.M091876>.
- [19] J.M. Pearson, S.-F. Tan, A. Sharma, C. Annageldiyev, T.E. Fox, J.L. Abad, G. Fabrias, D. Desai, S. Amin, H.-G. Wang, M.C. Cabot, D.F. Claxton, M. Kester, D.J. Feith, T.P. Loughran, Ceramide analogue SACLAC modulates sphingolipid levels and MCL-1 splicing to induce apoptosis in acute myeloid leukemia, *Mol. Canc. Res.* 18 (2020) 352–363, <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-19-0619>.
- [20] M. Kono, J.L. Dreier, J.M. Ellis, M.L. Allende, D.N. Kalkofen, K.M. Sanders, J. Bielawski, A. Bielawska, Y.A. Hannun, R.L. Proia, Neutral ceramidase encoded by the *Asah2* gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 7324–7331, <https://doi.org/10.1074/jbc.M508382200>.
- [21] M.V. Airola, W.J. Allen, M.J. Pulkoski-Gross, L.M. Obeid, R.C. Rizzo, Y.A. Hannun, Structural basis for ceramide recognition and hydrolysis by human neutral ceramidase, *Structure* 23 (2015) 1482–1491, <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.06.013>.
- [22] S.A. Novgorodov, C.L. Riley, J. Yu, K.T. Borg, Y.A. Hannun, R.L. Proia, M.S. Kindy, T.I. Gudiz, Essential roles of neutral ceramidase and sphingosine in mitochondrial dysfunction due to traumatic brain injury, *J. Biol. Chem.* 289 (2014) 13142–13154, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530311>.
- [23] K. Sundaram, A.R. Mather, S. Marimuthu, P.P. Shah, A.J. Snider, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, L.J. Beverly, L.J. Siskind, Loss of neutral ceramidase protects cells from nutrient and energy deprivation-induced cell death, *Biochem. J.* 473 (2016) 743–755, <https://doi.org/10.1042/BJ20150586>.
- [24] K. Tanaka, K. Tamiya-Koizumi, K. Hagiwara, H. Ito, A. Takagi, T. Kojima, M. Suzuki, S. Iwaki, S. Fujii, M. Nakamura, Y. Banno, R. Kannagi, T. Tsurumi, M. Kyogashima, T. Murate, Role of down-regulated neutral ceramidase during all-trans retinoic acid-induced neuronal differentiation in SH-SY5Y neuroblastoma cells, *J. Biochem.* 151 (2012) 611–620, <https://doi.org/10.1093/jb/mvs033>.
- [25] A.J. Snider, B.X. Wu, R.W. Jenkins, J.A. Sticca, T. Kawamori, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, Loss of neutral ceramidase increases inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease, *Prostag. Other Lipid Mediat.* 99 (2012) 124–130, <https://doi.org/10.1016/j.prostaglandins.2012.08.003>.
- [26] Y. Osawa, H. Uchinami, J. Bielawski, R.F. Schwabe, Y.A. Hannun, D.A. Brenner, Roles for C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate in regulating hepatocyte apoptosis in response to tumor necrosis factor- $\alpha$ , *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 27879–27887, <https://doi.org/10.1074/jbc.M503002200>.
- [27] B.X. Wu, Y.H. Zeidan, Y.A. Hannun, Downregulation of neutral ceramidase by gemcitabine: implications for cell cycle regulation, *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell Biol. Lipids* 1791 (2009) 730–739, <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2009.03.012>.
- [28] M. Garcia-Barros, N. Coant, T. Kawamori, M. Wada, A.J. Snider, J.-P. Truman, B.X. Wu, H. Furuya, C.J. Clarke, A.B. Bialkowska, A. Ghaleb, V.W. Yang, L.M. Obeid, Y.A. Hannun, Role of neutral ceramidase in colon cancer, *Faseb. J.* 30 (2016) 4159–4171, <https://doi.org/10.1096/fj.201600611R>.
- [29] N. Coant, M.G. Qifeng, Z. Lina, Y.A. Hannun, AKT as a key target for growth promoting functions of neutral ceramidase in colon cancer cells, *Oncogene* 37 (2018) 3852–3863, <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0236-x>.
- [30] W. Sun, R. Xu, W. Hu, J. Jin, H.A. Crellin, J. Bielawski, Z.M. Szulc, B.H. Thiers, L.M. Obeid, C. Mao, Upregulation of the human alkaline ceramidase 1 and acid ceramidase mediates calcium-induced differentiation of epidermal keratinocytes, *J. Invest. Dermatol.* 128 (2008) 389–397, <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5701025>.
- [31] I. Vasiliaskaitė-Brooks, R.D. Healey, P. Rochemaix, J. Saint-Paul, R. Sounier, C. Grison, T. Waltrich-Augusto, M. Fortier, F. Hoh, E.M. Saied, C. Arenz, S. Basu, C. Leyrat, S. Granier, Structure of a human intramembrane ceramidase explains enzymatic dysfunction found in leukodystrophy, *Nat. Commun.* 9 (2018) 5437, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07864-w>.
- [32] S. Edvardson, J.K. Yi, C. Jalas, R. Xu, B.D. Webb, J. Snider, A. Fedick, E. Kleinman, N.R. Treff, C. Mao, O. Elpeleg, Deficiency of the alkaline ceramidase ACER3 manifests in early childhood by progressive leukodystrophy, *J. Med. Genet.* 53 (2016) 389–396, <https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2015-103457>.
- [33] Y. Yin, M. Xu, J. Gao, M. Li, Alkaline ceramidase 3 promotes growth of hepatocellular carcinoma cells via regulating S1P/S1PR2/PI3K/AKT signaling, *Pathol. Res. Pract.* 214 (2018) 1381–1387, <https://doi.org/10.1016/j.prp.2018.07.029>.
- [34] C. Chen, Y. Yin, C. Li, J. Chen, J. Xie, Z. Lu, M. Li, Y. Wang, C.C. Zhang, ACER3 supports development of acute myeloid leukemia, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 478 (2016) 33–38, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2016.07.099>.
- [35] W. Hu, R. Xu, W. Sun, Z.M. Szulc, J. Bielawski, L.M. Obeid, C. Mao, Alkaline ceramidase 3 (ACER3) hydrolyzes unsaturated long-chain ceramides, and its down-regulation inhibits both cell proliferation and apoptosis, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 7964–7976, <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.063586>.
- [36] E.M. Saied, C. Arenz, Inhibitors of ceramidases, *Chem. Phys. Lipids* 197 (2016) 60–68, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2015.07.009>.
- [37] Y. Otsuka, M.V. Airola, Y.-M. Choi, N. Coant, J. Snider, C. Cariello, E.M. Saied, C. Arenz, T. Bannister, R. Rahaim, Y.A. Hannun, J. Shumate, L. Scampavia, J.D. Haley, T.P. Spicer, Identification of small-molecule inhibitors of neutral ceramidase (nCDase) via target-based high-throughput screening, *SLAS Discov. Adv. Sci. Drug Discov.* (2020), <https://doi.org/10.1177/2472555220945283>, 2472555220945283.
- [38] A. Bielawska, M.S. Greenberg, D. Perry, S. Jayadev, J.A. Shayman, C. McKay, Y.A. Hannun, (1S, 2R)-D-erythro-2-(N-myrystoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 12646–12654, accessed September 19, 2018, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8647877>.
- [39] M. Raisova, G. Goltz, M. Bektas, A. Bielawska, C. Riebeling, A.M. Hossini,

- J. Eberle, Y.A. Hannun, C.E. Orfanos, C.C. Geilen, Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes, *FEBS Lett.* 516 (2002) 47–52, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)02472-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)02472-9).
- [40] F. Thayyullathil, S. Pallichankandy, A. Rahman, J. Kizhakkayil, S. Chathoth, M. Patel, S. Galadari, Caspase-3 mediated release of SAC domain containing fragment from Par-4 is necessary for the sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells, *J. Mol. Signal.* 8 (2013) 2, <https://doi.org/10.1186/1750-2187-8-2>.
- [41] J. Mwinyi, A. Boström, I. Fehrer, A. Othman, G. Waeber, H. Marti-Soler, P. Vollenweider, P. Marques-Vidal, H.B. Schiöth, A. Von Eckardstein, T. Hornemann, Plasma 1-deoxysphingolipids are early predictors of incident type 2 diabetes mellitus, *PLoS One* 12 (2017), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175776>.
- [42] T. Hornemann, I. Alecu, N. Hagenbuch, A. Zhakupova, A. Cremonesi, M. Gautschi, H.H. Jung, F. Meienberg, S. Bilz, E. Christ, M.R. Baumgartner, M. Hochuli, Disturbed sphingolipid metabolism with elevated 1-deoxysphingolipids in glycogen storage disease type I – A link to metabolic control, *Mol. Genet. Metabol.* 125 (2018) 73–78, <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.07.003>.
- [43] C. Bedia, L. Camacho, J.L. Abad, G. Fabrias, T. Levade, A simple fluorogenic method for determination of acid ceramidase activity and diagnosis of Farber disease, *J. Lipid Res.* 51 (2010) 3542–3547, <https://doi.org/10.1194/jlr.D010033> [pii]10.1194/jlr.D010033 [doi].
- [44] M. Casasampere, N. Bielsa, D. Riba, L. Bassas, R. Xu, C. Mao, G. Fabriàs, J.L. Abad, A. Delgado, J. Casas, New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases, *J. Lipid Res.* 60 (2019) 1174–1181, <https://doi.org/10.1194/jlr.D092759>.
- [45] M. Casasampere, L. Camacho, F. Cingolani, J. Casas, M. Egado-Gabás, J.L. Abad, C. Bedia, R. Xu, K. Wang, D. Canals, Y.A. Hannun, C. Mao, G. Fabriàs, Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic N -acylated coumarin-containing aminodiols, *J. Lipid Res.* 56 (2015) 2019–2028, <https://doi.org/10.1194/jlr.D061564>.
- [46] J.M. Munoz-Olaya, X. Matabosch, C. Bedia, M. Egado-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, <https://doi.org/10.1002/cmdc.200700325>.
- [47] C. Bedia, D. Canals, X. Matabosch, Y. Harrak, J. Casas, A. Llebaria, A. Delgado, G. Fabriàs, Cytotoxicity and acid ceramidase inhibitory activity of 2-substituted aminoethanol amides, *Chem. Phys. Lipids* 156 (2008) 33–40, <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2008.07.012>.
- [48] J.L. Abad, I. Nieves, P. Rayo, J. Casas, G. Fabrias, A. Delgado, Straightforward access to spisulosine and 4,5-dehydrosipisulosine stereoisomers: probes for profiling ceramide synthase activities in intact cells, *J. Org. Chem.* 78 (2013) 5858–5866, <https://doi.org/10.1021/jo400440z>.
- [49] Y.F. Ordóñez, J.L. Abad, M. Aseeri, J. Casas, V. Garcia, M. Casasampere, E.H. Schuchman, T. Levade, A. Delgado, G. Triola, G. Fabrias, Activity-based imaging of acid ceramidase in living cells, *J. Am. Chem. Soc.* 141 (2019) 7736–7742, <https://doi.org/10.1021/jacs.8b11687>.
- [50] J. Usta, S. El Bawab, P. Roddy, Z.M. Szulc, Y.A. Hannun, A. Bielawska, Structural requirements of ceramide and sphingosine based inhibitors of mitochondrial ceramidase, *Biochemistry* 40 (2001) 9657–9668.
- [51] S. Ballereau, T. Levade, Y. Genisson, N. Andrieu-Abadie, Alteration of ceramide 1-O-functionalization as a promising approach for cancer therapy, *Anticancer. Agents Med. Chem.* 12 (2012) 316–328, accessed April 15, 2014, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21554198>.
- [52] K. Wang, C. Li, X. Lin, H. Sun, R. Xu, Q. Li, Y. Wei, Y. Li, J. Qian, C. Liu, Q. Zhang, S. Yu, Z. Cui, X. Huang, B. Zhu, J. Zhou, C. Mao, Targeting alkaline ceramidase 3 alleviates the severity of nonalcoholic steatohepatitis by reducing oxidative stress, *Cell Death Dis.* 11 (2020) 1–15, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-2214-9>.
- [53] K. Wang, R. Xu, J. Schrandt, P. Shah, Y.Z. Gong, C. Preston, L. Wang, J.K. Yi, C.-L. Lin, W. Sun, D.D. Spyropoulos, S. Rhee, M. Li, J. Zhou, S. Ge, G. Zhang, A.J. Snider, Y.A. Hannun, L.M. Obeid, C. Mao, Alkaline ceramidase 3 deficiency results in purkinje cell degeneration and cerebellar ataxia due to dyshomeostasis of sphingolipids in the brain, *PLoS Genet.* 11 (2015), e1005591, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005591>.
- [54] E. Romiti, E. Meacci, G. Tanzi, L. Becciolini, S. Mitsutake, M. Farnararo, M. Ito, P. Bruni, Localization of neutral ceramidase in caveolin-enriched light membranes of murine endothelial cells, *FEBS Lett.* 506 (2001) 163–168, [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)02878-2](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)02878-2).
- [55] U.G. Danilczyk, M.F. Cohen-Doyle, D.B. Williams, Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 13089–13097, <https://doi.org/10.1074/jbc.275.17.13089>.
- [56] J.W. Antoon, J. Liu, M.M. Gestaut, M.E. Burow, B.S. Beckman, M. Foroozesh, Design, synthesis, and biological activity of a family of novel ceramide analogues in chemoresistant breast cancer cells, *J. Med. Chem.* 52 (2009) 5748–5752, <https://doi.org/10.1021/jm9009668>.
- [57] Y.C. Chang, Y. Fong, E.M. Tsai, Y.G. Chang, H.L. Chou, C.Y. Wu, Y.N. Teng, T.C. Liu, S.S. Yuan, C.C. Chiu, Exogenous C8-ceramide induces apoptosis by overproduction of ROS and the switch of superoxide dismutases SOD1 to SOD2 in human lung cancer cells, *Int. J. Mol. Sci.* 19 (2018) 3010, <https://doi.org/10.3390/ijms19103010>.

# CAPÍTOL 2

## Vies de senyalització i proteïnes diana de la JB

### ARTICLE

“Jaspine B induces methuosis through activation of AMPK”

### RESULTATS ADDICIONALS

Identificació de proteïnes diana de la Jaspina B



## ARTICLE 3

**Jaspine B induces methuosis through activation of AMPK**

Núria Bielsa<sup>1</sup>, José Luis Abad<sup>1</sup>, Gemma Fabriàs<sup>1,2</sup>, Jose Miguel Lizcano<sup>3</sup> i Josefina Casas<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Research Unit on Bioactive Molecules (RUBAM), Departament de Química Biològica. Institut de Química Avançada de Catalunya, Consell Superior d'Investigacions Científiques (IQAC-CSIC), 08034 Barcelona, Espanya

<sup>2</sup> Centro de Investigación Biomédica en Red, Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD). ISCIII. 28029 Madrid, Espanya.

<sup>3</sup> Protein Kinases and Signal Transduction Laboratory, Departament de Bioquímica i Biologia Molecular i Institut de Neurociències. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra (Barcelona), Espanya

*En preparació per a International Journal of Molecular Sciences*

Factor d'impacte: 4,556

La contribució de la Núria Bielsa a aquest treball presentat com a part del capítol 2 d'aquesta tesi correspon al disseny d'experiments, i obtenció i elaboració de les dades resultants dels experiments realitzats. També ha escrit el primer esborrany.

Josefina Casas Brugulat i Gemma Fabriàs Domingo

Directores de tesi



### RESUM

#### La JB indueix metuosi a través de l'activació d'AMPK

**Objectiu:** S'ha descrit que la Jaspina B té un efecte citotòxic que podria causar mort per metuosi en diverses línies cel·lulars. La via de senyalització de Ras s'ha vist implicada en algun cas de metuosi. En aquest context, l'objectiu d'aquest treball ha estat caracteritzar els efectes cel·lulars així com la via de senyalització en la que està implicada la JB a la línia cel·lular A549, que és mutant per K-RAS.

**Metodologia:** En aquest estudi es va utilitzar, a més de cèl·lules A549, la línia cel·lular HGC27, així com línies cel·lulars modificades genèticament incapaces de presentar apoptosi o autofàgia. La viabilitat cel·lular es va avaluar en diferents condicions per l'assaig de l'MTT a 4 h i a 24 h. Per a determinar la distribució subcel·lular de la JB, es va sintetitzar i emprar un anàleg fluorescent de la JB (JB-Bodipy). Pels estudis de co-localització, es van utilitzar els marcadors Lucifer Yellow (LY), lysotracker (LT) i GFP. Per a la inhibició de necrosi, apoptosi, autofàgia i macropinocitosi es van fer servir necrostatina-1, z-VAD, 3MA (3-metiladenina) i EIPA (5-[N-etil-N-isopropil] amilorida), respectivament. Per analitzar els nivells d'expressió de diferents proteïnes al llarg del temps d'incubació amb JB, es van recollir mostres de cèl·lules A549 i HGC27 incubades amb JB 5  $\mu$ M (o vehicle) a diferents temps i es van analitzar els nivells d'expressió per Western Blot, amb anticossos específics per a cada proteïna d'interès. Finalment, per a inhibir mTORC1, Akt, i mTORC1/2 es van utilitzar everolimus, MK-2206 i AZD-2014, respectivament. Per a activar AMPK es va emprar fenformina.

**Resultats:** En primer lloc es va comprovar que la JB era citotòxica i induïa vacuolització provinent de l'augment d'activitat macropinocítica en cèl·lules A549, de manera independent de l'efecte inhibidor de la JB sobre la CerS. Així es va confirmar la independència respecte K-RAS de la mort cel·lular induïda per JB. Seguidament es va comprovar que aquests vacúols no es fusionaven amb lisosomes ni amb autofagosomes, i que no contenien JB-Bodipy. Es va observar que la JB induïa poca apoptosi tardana en A549, però la inhibició d'apoptosi amb z-VAD no va recuperar la pèrdua de viabilitat en cèl·lules tractades amb JB. Aquests resultats van suggerir que l'apoptosi no era la causa principal de mort cel·lular induïda per la JB. Això es va corroborar comparant la viabilitat d'una línia incapaç de presentar apoptosi amb la seva corresponent línia salvatge, ambdues tractades amb JB, que va resultar similar, descartant el paper de l'apoptosi en la citotoxicitat de la JB. D'altra banda, es va observar que la JB induïa autofàgia dinàmica (per augment dels nivells d'expressió d'LC3II). La inhibició de l'autofàgia, tant amb 3MA com amb una línia cel·lular incapaç de presentar autofàgia, tampoc no va disminuir la mort cel·lular induïda per JB,

indicant que l'autofàgia tampoc no era una causa primordial de mort. Finalment, es van analitzar els nivells d'expressió de diferents proteïnes (per Western Blot) en cèl·lules tractades amb JB i es va detectar un augment de l'expressió de pAMPK i una disminució dels nivells d'expressió de pS6 i pAkt, posicionant la JB com a inhibidora de l'eix PI3K/Akt/mTORC1 tant en cèl·lules A549 com en HGC27. No obstant, la implicació d'aquesta via en la mort induïda per JB es va descartar, ja que la inhibició d'mTORC1 amb everolimus, la d'Akt amb MK-2206 i la d'mTORC1/2 amb AZD-2014 no va induir vacuolització. En canvi, la fenformina, que activa AMPK, sí que va induir vacuolització provinent de macropinositosis de manera semblant a la JB, indicant que l'augment d'expressió de pAMPK és crucial pel procés de vacuolització induït per la JB.

**Conclusions:** En aquest treball s'ha demostrat que la JB induïx vacuolització i mort cel·lular de manera independent de K-RAS. La JB provoca apoptosi i autofàgia a la línia cel·lular A549, però la inhibició de la necrosi, l'apoptosi o l'autofàgia no recupera la pèrdua de viabilitat en cèl·lules tractades amb JB, amb la qual cosa cap d'aquests tipus de mort cel·lular programada està implicat en la citotoxicitat de la JB. A més, s'ha identificat que la JB inhibeix l'eix PI3K/Akt/mTORC1, però que la inducció de metuosi per part de la JB té lloc de manera independent a l'efecte inhibidor sobre aquest eix. Finalment, s'ha comprovat que l'activació d'AMPK és crucial per la vacuolització induïda per JB.



## **Jaspine B induces methuosis through activation of AMPK**

Núria Bielsa<sup>1</sup>, José Luis Abad<sup>1</sup>, Gemma Fabriàs<sup>1,2</sup>, José M Lizcano<sup>3\*</sup> and Josefina Casas<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Research Unit on BioActive Molecules. Department of Biological Chemistry. Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC). Jordi Girona 18. 08034-Barcelona, Spain.

<sup>2</sup>*Liver and Digestive Diseases Networking Biomedical Research Centre (CIBEREHD)*. ISCIII. 28029 Madrid, Spain.

<sup>3</sup> Protein Kinases and Signal Transduction Laboratory, Departament De Bioquímica i Biologia Molecular and Institut De Neurociències. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), 08193 Bellaterra (Barcelona), Spain

\*To whom correspondence should be addressed.

### **Corresponding authors' contact information:**

Jose M Lizcano

Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Institut de Neurociències,  
Universitat Autònoma de Barcelona,  
Barcelona 08193, Spain

Email: [josemiguel.lizcano@uab.es](mailto:josemiguel.lizcano@uab.es)

Josefina Casas

Research Unit on BioActive Molecules  
Department of Biological Chemistry  
Institute for Advanced Chemistry of Catalonia (IQAC-CSIC)

Phone: 93-4006115

Email: [fina.casas@iqac.csic.es](mailto: fina.casas@iqac.csic.es)

## INTRODUCTION

In living organisms there is a regulated equilibrium between the generation of new cells by cell division and the elimination of the damaged ones. The most well-known mechanism of programmed cell death is apoptosis<sup>1</sup>. In the last decades, however, new types of cell death independent of apoptosis have gained interest for their potential importance in pathological processes, toxicology and cancer therapy<sup>2</sup>.

One of the latest additions to the list of phenotypes of cell death is methuosis<sup>3</sup>, first described by Overmeyer *et al.* in 2008<sup>4</sup>. The name derives from the Greek *methuo*, which means “to drink to intoxication”, because in this type of cell death, the cell cytoplasm is occupied by fluid-filled vacuoles that originate from macropinosomes.

Macropinocytosis is a clathrin-independent endocytic process by which cells internalize extracellular fluid, nutrients and proteins in vesicles (macropinosomes) generated from protrusion of the plasma membrane<sup>2</sup>. Normally, macropinosomes enter the endocytic pathway and are recycled to the plasma membrane or they mature and become late endosomes that eventually fuse with lysosomes<sup>5</sup>. In methuosis, endosomal trafficking is not functional and the vacuoles that are originated from the rise of macropinocytic activity, are accumulated in the cytoplasm and they fuse with each other giving larger vacuoles that end up occupying most of the cytoplasm. These large vacuoles end up provoking cellular disruption with characteristics of necrosis, like loss of metabolic capacity and plasma membrane integrity, without cellular shrinkage and nuclear fragmentation, typical of apoptosis<sup>6</sup>.

Appearance of vacuoles can resemble autophagy but, in contrast to autophagosomes that have double membranes surrounding luminal cytoplasmic contents, methuosis vacuoles have a single membrane<sup>6</sup>. Other types of cell death have cytoplasmic vacuoles, like paraptosis and oncosis, but in these cases vacuoles are originated from endoplasmic reticulum or mitochondria<sup>2</sup> instead of macropinocytosis.

Ever since methuosis was originally described in glioblastoma cells after ectopic expression of activated Ras, small molecules that can induce methuosis have been described for many cancerous cell lines, even apoptosis-resistant ones. Among them, indol-based chalcones have been explored in human glioblastoma cells U251<sup>7,8</sup>, Silmitasertib in colorectal cancer cells<sup>9</sup>.

Jaspine B (pachastrissamine) is a natural anhydrous derivative that can be isolated from marine sponge *Jaspis sp.* Jaspine B (JB), a sphingolipid with the capacity of inducing cytoplasmic vacuolation<sup>10</sup>, has cytotoxic activity in several cancer? cell lines<sup>10-12</sup>.

Sphingolipid (SL) metabolism is a complex network of regulated reactions. SLs, apart from being important constitutive elements of the cellular membranes, display roles as bioactive molecules and

intervene in several signalling pathways. JB interferes in SL metabolism as a competitive inhibitor of CerS<sup>10</sup>.

Alterations in the SL metabolism have been associated with cell death by apoptosis and autophagy<sup>11,12</sup>. In HGC27 human gastric cancer cell line, JB has been induces cytoplasmic vacuolation without correlation with the alterations observed in the SL metabolism<sup>10</sup>. Importantly, JB's capacity of inducing vacuolation has been demonstrated in several cell lines, which suggest the generality of the effect<sup>12</sup>.

It has been suggested that JB induces methuosis independently of the alterations in the SL metabolism<sup>10</sup>.

Few small molecules have been reported capable of inducing methuosis<sup>6,9,13-16</sup>. However, most of the protein targets of these compounds remain to be identified. Among them, inhibition of class III phosphoinositide (PI) kinase PIKFYVE (inhibited by Indolyl-Pyridinyl-Propenone<sup>7</sup>) triggers vacuolization, a hallmark of methuosis. CK2 inhibition by Silmitasertib also induces methuosis<sup>9</sup>. However, the signalling pathways by which these molecules induce methuosis is not fully described, although implication of Ras, Rac<sup>4,17</sup> and Akt-mTORC1<sup>9</sup> pathways have been suggested.

Macropinocytosis is prominent in many types of cancer cells. It supports the growth of cells transformed by oncogenic K-RAS, which constitutively exhibit macropinocytosis<sup>18</sup>. To assess if the rise of macropinocytic activity observed with JB was K-RAS dependent, experiments were conducted in A549 cell line, which is mutant for K-RAS.

It is important to investigate methods to induce non-apoptotic cell death to the tumours that have developed resistance to apoptosis. Methuosis is an emergent type of cell death for the design of antitumoral therapies and thus there is a high interest in knowing the molecular mechanisms involved, as well as the targets of the compounds that induce it.

That is the reason why we wanted to further study and characterise the death process as well as the signalling pathways in which JB is involved.

## RESULTS

### Induction of cell vacuolization by JB in A549 cells

Cytoplasmic vacuolization is a well-known morphological phenomenon occurring in mammalian cells after exposure to different inputs, including several low-molecular-weight compounds. Vacuolization can

be transient or irreversible. Irreversible vacuolization produces different types of caspase-independent cell death, including methuosis, paraptosis, oncosis, and necroptosis<sup>19</sup>.

Previously, we reported that JB induced cytoplasmic vacuolization in the gastric cancer HGC27 cell line<sup>10</sup>, which is wild type for K-RAS<sup>20</sup>, the first human oncogene identified in human cancer and a member of the Ras superfamily<sup>21</sup>. As it has been published that Ras can be implicated in methuosis<sup>4,17</sup>, we studied whether the effect of JB was dependent of K-RAS, in lung adenocarcinoma A549 cells, which are mutant for K-RAS. They were treated with different concentrations of JB (**Figure 1A**) and analysed for vacuolization at different time points. In agreement with the results found in HGC27 cells, a concentration of 5  $\mu$ M (4 h) of JB induced formation of vacuoles (**Figure 1B**) with a cellular viability of approximately 80% in A549 cells, compared to control. These conditions were selected for vacuolization induction in further experiments.

JB has been reported to interfere with SLs metabolism, by inhibiting CerS<sup>10</sup>. To assess the possibility that induction of vacuolation by JB is due to its inhibitory activity over CerS, we investigated whether vacuolization was also induced by Fumonisin B1 (FB1), a commonly used inhibitor of CerS<sup>22</sup>. As shown in **Figure 1B**, no vacuoles were observed in A549 cells treated with FB1, indicating that inhibition of CerS by JB is not responsible for its capacity to induce cytoplasmic vacuolation.

To demonstrate that the vacuoles formed in cells treated with JB were originated from the rise of the macropinocytic activity, we stained vacuoles with the fluorescent dye Lucifer Yellow (LY), a fluid-phase tracer that is incorporated in cells during macropinocytosis<sup>4,23</sup>. Fluorescence microscopy analysis showed that rounded-shaped vacuoles filled with the fluorescent tracer LY matched with those observed by contrast phase imaging (**Figure 1C**). This result indicates that vacuoles exhibit characteristics of macropinosomes, as reported for other cancer cell lines<sup>10</sup>.

Our results rule out cell death induced by paraptosis<sup>24,25</sup> or oncosis<sup>26</sup>, wherein vacuoles are derived from the endoplasmic reticulum and mitochondria membranes and do not incorporate LY.

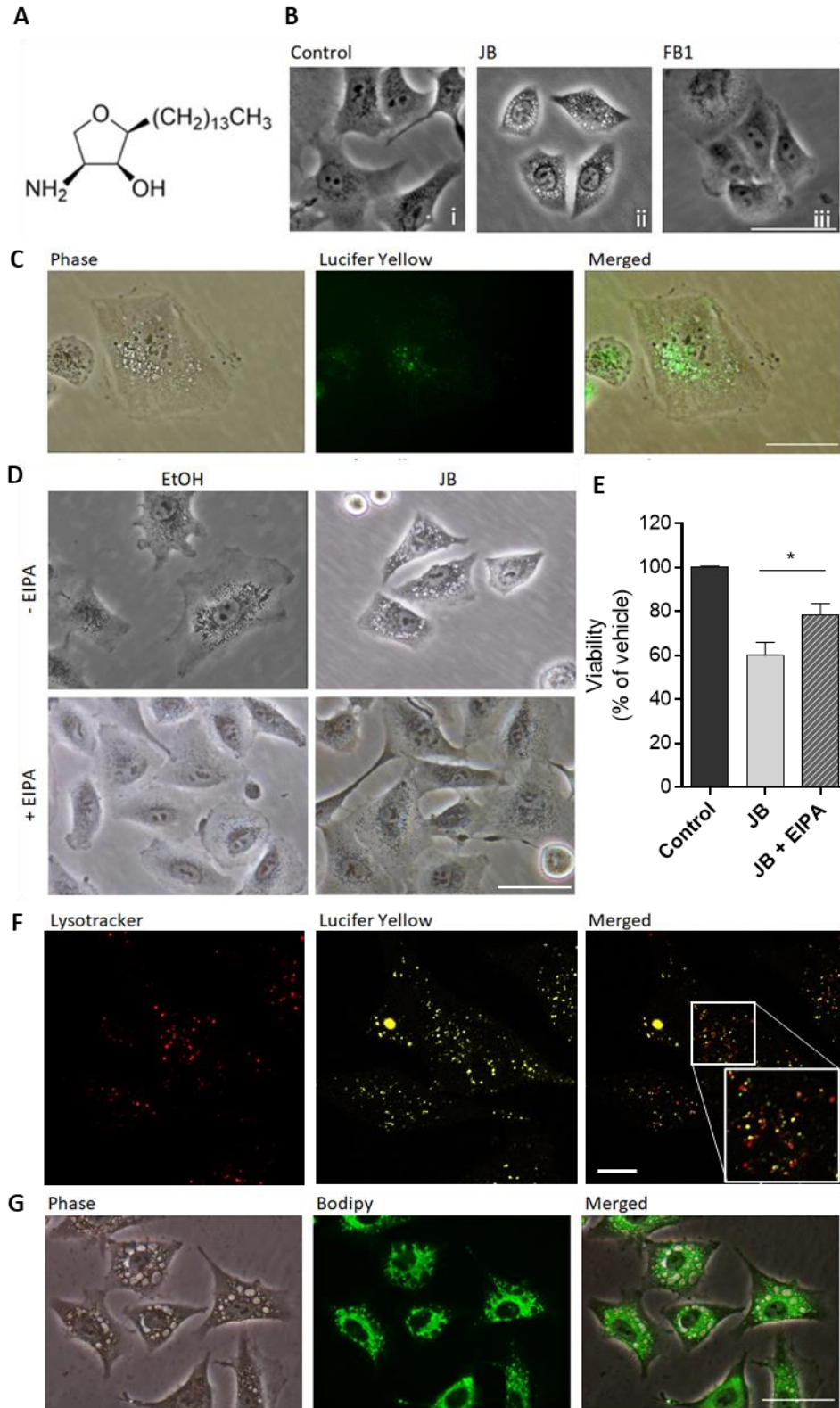
To confirm that JB-induced vacuolization occurred via macropinocytosis, we used EIPA (5-[N-ethyl-N-isopropyl] amiloride), a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger inhibitor that blocks macropinocytosis<sup>27,28</sup>. Incubation of cells with EIPA inhibited the vacuolization induced by JB (**Figure 1D**). Furthermore, EIPA rescued viability of cells treated with JB, indicating that vacuolization by macropinocytosis is implicated in JB cytotoxicity (**Figure 1E**).

When the endocytic pathway is functional, the vacuoles internalized by macropinocytosis are either recycled to the plasma membrane, or they mature and become late endosomes that eventually fuse with

lysosomes<sup>29,30</sup>. Despite the rise of the macropinocytic activity, methuosis induces a dysfunctional macropinocytotic process, so the nascent macropinosomes do not recycle or fuse with lysosomes<sup>4</sup>. To investigate whether the cytoplasmic vacuolization induced by JB is related to methuosis, cells were treated with JB, and the fusion of vacuoles with lysosomes was examined by confocal microscopy. As illustrated in **Figure 1F**, the vacuoles originated by JB treatment (stained with LY) did not colocalize with the lysosomal marker lysotracker. This suggests that JB disrupts the endocytic pathway of cytoplasmic vacuolization, which is indicative of methuosis<sup>4</sup>.

In order to characterize the JB-induced vacuolization process, we tracked the JB subcellular distribution using the JB fluorescent analogue JB-Bodipy. JB-Bodipy induced a dose-dependent decrease of cell viability with an IC<sub>50</sub> of 20  $\mu$ M (MTT, 24 h). Next, A549 cells were treated with JB-Bodipy for a short (2 h) time were examined by phase contrast microscopy. JB-Bodipy induced cellular vacuolization but, unlike JB-induced vacuoles, the vacuoles did not contain JB-Bodipy. In turn, JB-Bodipy stain was localized in distinct vesicular structures (**Figure 1G**). These results agree with those reported by Rozié et al in 2018<sup>31</sup>, that found JB to localize in cytoplasmatic aggregates.





**Figure 1. Induction of cell vacuolization by JB in A549 cells.** A) Chemical structure of JB. B) Phase contrast images of A549 cells treated with 0.05% ethanol 24 h, 5  $\mu$ M JB 4 h or 50  $\mu$ M FB1 24 h, representative of three experiments. Scale bar: 50  $\mu$ m. C) Incorporation of LY in A549 cells incubated with 5  $\mu$ M JB and 0.5 mg/ml LY for 4 h. Scale bar: 50  $\mu$ m. D) Phase-contrast images of A549 cells pre-treated with 25  $\mu$ M EIPA (or methanol) for 1 h and then treated with 5  $\mu$ M JB (or ethanol) for 24 h.

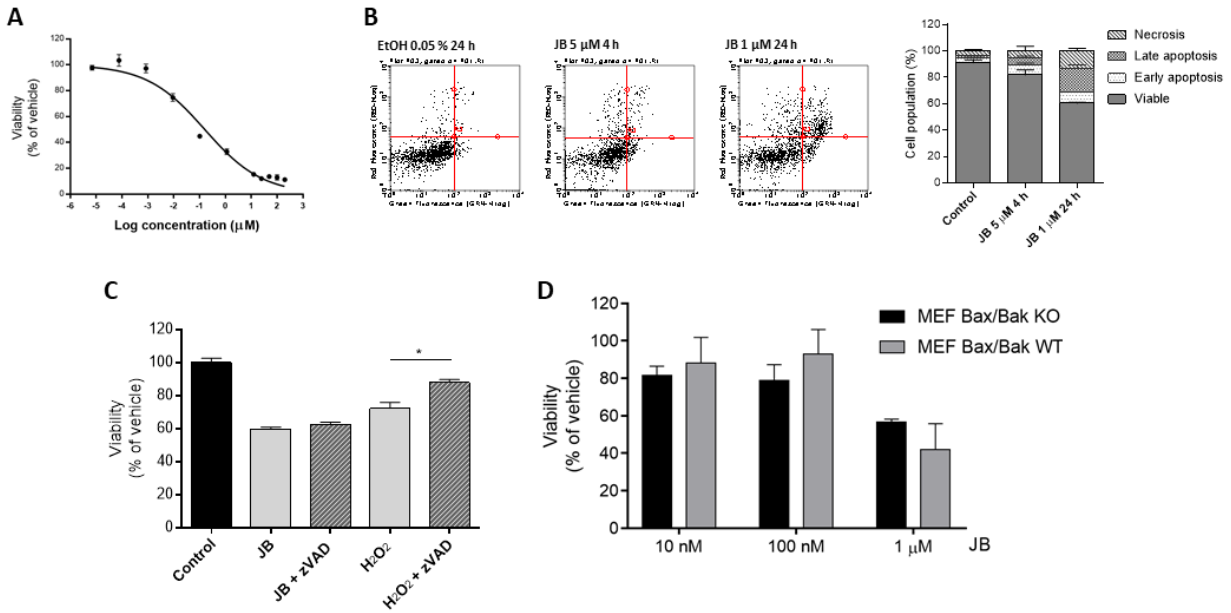
representative of two independent experiments performed in triplicate. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . **E**) Viability of A549 cells pre-treated with 25  $\mu\text{M}$  EIPA (or methanol) for 1 h and then treated with 5  $\mu\text{M}$  JB (or ethanol) for 24 h, assessed by MTT. Results are the mean  $\pm$  SD of two experiments in triplicate. \* $P < 0.0005$ . **F**) A549 cells were treated with 5  $\mu\text{M}$  JB and 0.5 mg/ml LY for 4 h. 75 nM LT was added 0.5 h prior to visualization. Scale bar: 10  $\mu\text{m}$ . **G**) A549 cells treated with 30  $\mu\text{M}$  JB-Bodipy for 2 h. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ . Images are representative of six separate experiments.

### **JB induces cytotoxicity**

JB induced cytotoxicity (MTT) in A549 with an  $\text{IC}_{50}$  of 0.33  $\mu\text{M}$  (**Figure 2A**). This result is similar to those reported for other cancer cell lines such as HT29<sup>32</sup>, MCF7<sup>33</sup>, HEK293T<sup>10</sup>, A-375<sup>40</sup>, HeLa<sup>42</sup>, and HGC27<sup>10</sup>. In all the cases, the reported  $\text{IC}_{50}$  values were in the micromolar to sub-micromolar ranges.

Next, we investigated the type of cell death induced by JB. Several authors have reported that JB does not cause death by necrosis<sup>2,4,9,10,17,34,35</sup>. This is in agreement with our observation that necrostatin-1 does not recover loss cytotoxicity caused by methuosis in A549 cells (**Supplementary Figure 1**).

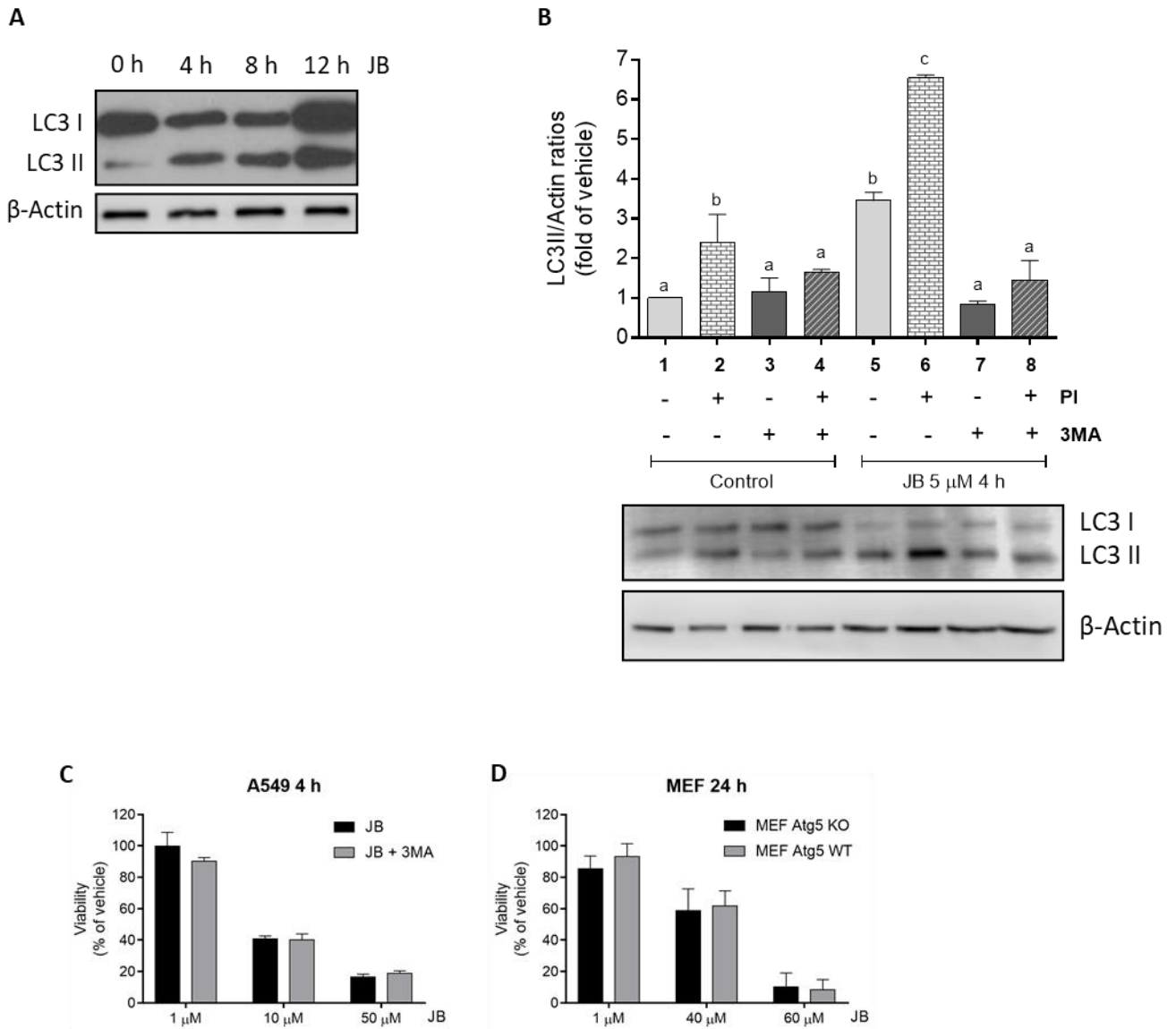
JB has been reported to induce apoptosis in different cancer cell lines<sup>10-12</sup>. Therefore, we evaluated apoptosis in JB-induced A549 cell death by flow cytometry (**Figure 2B**). While JB had a poor pro-apoptotic effect at short (4 h) incubation time, discrete late apoptosis was detected at 24 h treatment. To investigate the possible role of apoptosis in JB-induced cytotoxicity, we used the pancaspase inhibitor z-VAD. As shown in (**Figure 2C**), z-VAD recovered cell death induced by  $\text{H}_2\text{O}_2$  (a known apoptotic inducer), but did not recover viability of cells treated with JB (**Figure 2C**). This result suggests that JB is a poor inductor of apoptosis, and that apoptosis is not the main cause of cell death observed upon JB treatment. To further confirm this observation we used a genetic approach, using  $\text{BAX}^{-}/\text{BAK}^{-}$  transformed MEF cells. MEF cells lacking Bax and Bak cannot undergo apoptosis, as they are essential regulators of pro-apoptotic signalling<sup>36</sup>. First, we confirmed that JB induced micropinocytosis-induced vacuolization in  $\text{BAX}^{+/+}/\text{BAK}^{+/+}$  (WT) and  $\text{BAX}^{-}/\text{BAK}^{-}$  (KO) MEF cells (**Supplementary Figure 2**). No difference in cell viability was observed when WT and KO MEF cells were treated with JB (**Figure 2D**), confirming that apoptosis is not involved in JB cytotoxicity. Our results agree with previous works showing that cell death induced by methuosis is not prevented by apoptosis inhibitors<sup>2,4,6,10,37</sup>.



**Figure 2. Analysis of apoptosis induced by JB in A549 cells.** **A)** A549 cells were treated with different concentrations of JB for 4 h and cell viability was assessed by MTT assay. Results are the mean  $\pm$  SD for three experiments performed in triplicate and are expressed as the percentage of the viability compared to the control. **B)** A549 cells were incubated with 0.05% EtOH 24 h (control), 5  $\mu$ M JB 4 h or 1  $\mu$ M JB 24 h and then stained with annexin V (AV)/PI. Fluorescence was analysed by flow cytometry. Data obtained from 2 experiments in triplicate. **C)** Determination of cell viability by MTT assay in A549 cells treated for 24 h with 1  $\mu$ M JB +/- 100  $\mu$ M z-VAD or 10  $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> +/- 100  $\mu$ M z-VAD. Results are the mean  $\pm$  SD for two experiments performed in triplicate and are expressed as the percentage of the viability compared to the control. \*P < 0.005. **D)** Determination of cell viability by MTT assay in MEF Bax/Bak KO and MEF Bax/Bak WT incubated with different concentrations of JB for 24 h. Results are the mean  $\pm$  SD of two experiments in triplicate.

Autophagy is a highly conserved cellular process characterized by self-degradation of intracellular components that are included in double-membrane vesicles known as autophagosomes<sup>38</sup>. In some cases, autophagy can trigger cell death, a process so called autophagy-mediated cell death or cytotoxic autophagy<sup>39</sup>. Interestingly, autophagy has also been described to occur in methuosis<sup>10</sup>. Therefore, we next studied whether JB induced autophagy in our cells. One of the hallmarks of autophagy is conjugation of the soluble form of LC3 with phosphatidylethanolamine and conversion to autophagosomal membrane-associated form (LC3-II), which can be monitored by immunoblot analysis. As shown in **(Figure 3A)**, treatment of A549 cells with JB resulted in rapid (4 h) elevated LC3II levels **(Figure 3A)**. To demonstrate that JB induced autophagy flux, cells were also incubated with the lysosomal inhibitors pepstatin A (PA) and E64d, to block the final step of autolysosomal degradation. Incubation with PA and E64d further increased LC3-II levels **(Figure 3B, 1 vs 2, 5 vs 6)**, indicating that JB induces dynamic autophagy in A549 cells.

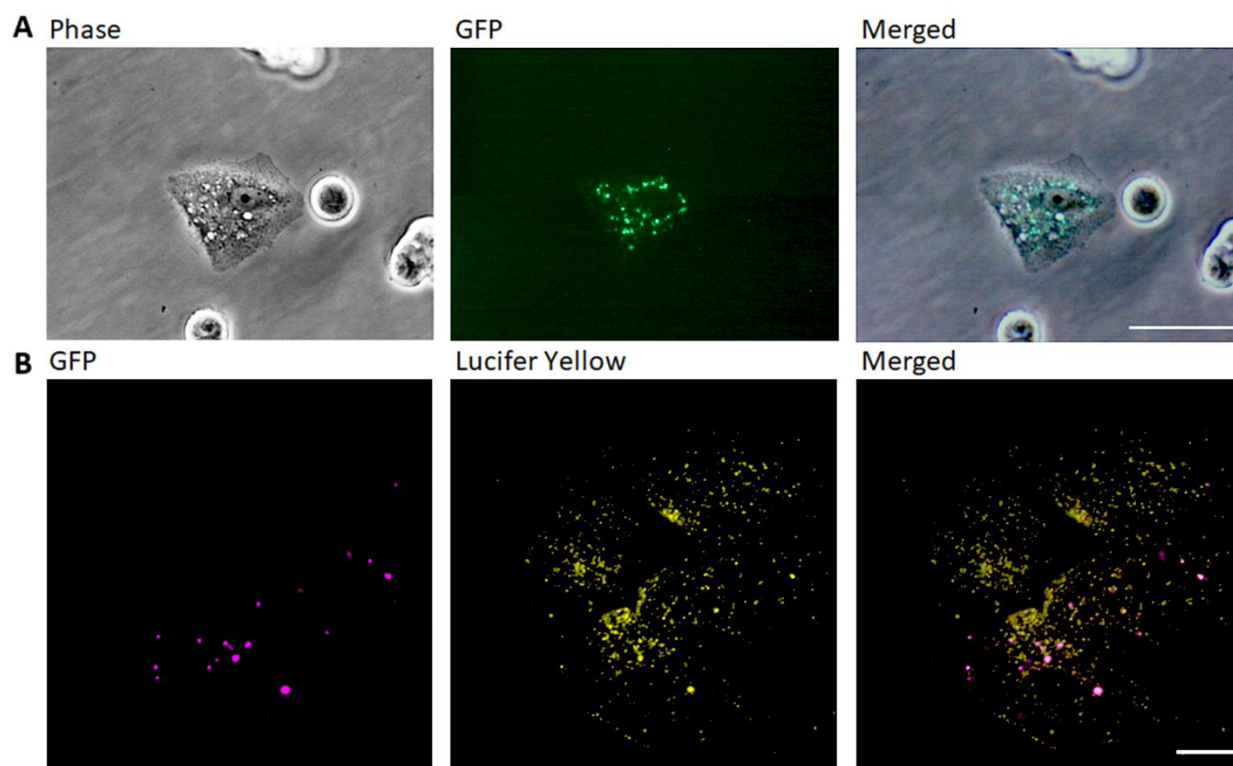
We used a pharmacological approach to block the formation of autophagosomes by inhibiting class III PI3K Vps34, an essential protein for cellular autophagy. Incubation of cells with 3-MA (3-methyladenine) resulted in a decrease in JB-induced LC3-II expression levels (**Figure 3B**, 5 vs 7, 6 vs 8). However, 3-MA did not recover the loss of cell viability in response to JB (**Figure 3C**). In parallel, and in order to obtain genetic evidence of whether the JB induces cytotoxic autophagy, we used autophagy-deficient ATG5<sup>-/-</sup> MEF cells. Atg5 protein plays an essential role in the elongation of the phagophore and its maturation into the complete autophagosome<sup>40</sup>. JB induced macropinocytic vacuoles in both wild type ATG5<sup>+/+</sup> and KO ATG5<sup>-/-</sup> MEF cells (**Supplementary Figure 2**), and ATG5 gene deletion showed no effect on JB-induced cytotoxicity with vacuoles originated by macropinocytosis. Cell viability experiments (**Figure 3D**). Overall, our results suggest that JB does not induced an autophagy-mediated cell death, in agreement with previous reports showing that autophagy does not mediate methouosis-induced cell death<sup>4,10,17,34</sup>.



**Figure 3. Analysis of autophagy induced by JB in A549 cells.** **A)** Analysis of LC3II expression by Western Blot in A549 cells treated with JB 5 μM at different times for up to 12 h. **B)** Analysis of LC3II expression by Western Blot in A549 cells pre-treated or not for 2 h with PI (10 μg/mL E-64-D and 5 μg/mL Pepstatin A) and/or for 0.5 h with 5 mM 3MA and then treated with JB (5 μM, 4 h) or vehicle (0.05% EtOH). Results are representative of three experiments. **C)** Determination of cell viability by MTT assay in A549 pre-incubated or not with 5 mM 3MA for 0.5 h and treated with JB at different concentrations for 4 h. Results are the mean ± SD of two experiments in triplicate. **D)** Determination of cell viability by MTT assay in MEF Atg5 KO and MEF Atg5 WT incubated with different concentrations of JB for 24 h. Data (+/-SD) of three experiments in triplicate.

Finally, to investigate whether the JB-induced vacuoles fuse with autophagosomes, we performed fluorescence microscopy co-localization experiments using a MCF7 cancer cell line that stably overexpresses GFP-tagged LC3-II. As shown in **Figure 4A**, vacuoles and autophagosomes did not colocalize, indicating that they are different subcellular structures. Same type of analysis was carried out

by confocal microscopy, to examine co-localization of LC3II-GFP and LY-stained structures. **Figure 4B** shows that vacuoles (stained in yellow by LY) and autophagosomes (stained in magenta by LC3II-GFP) did not colocalize (Mander's test: LY on GFP 0.048; GFP on LY 0.469).



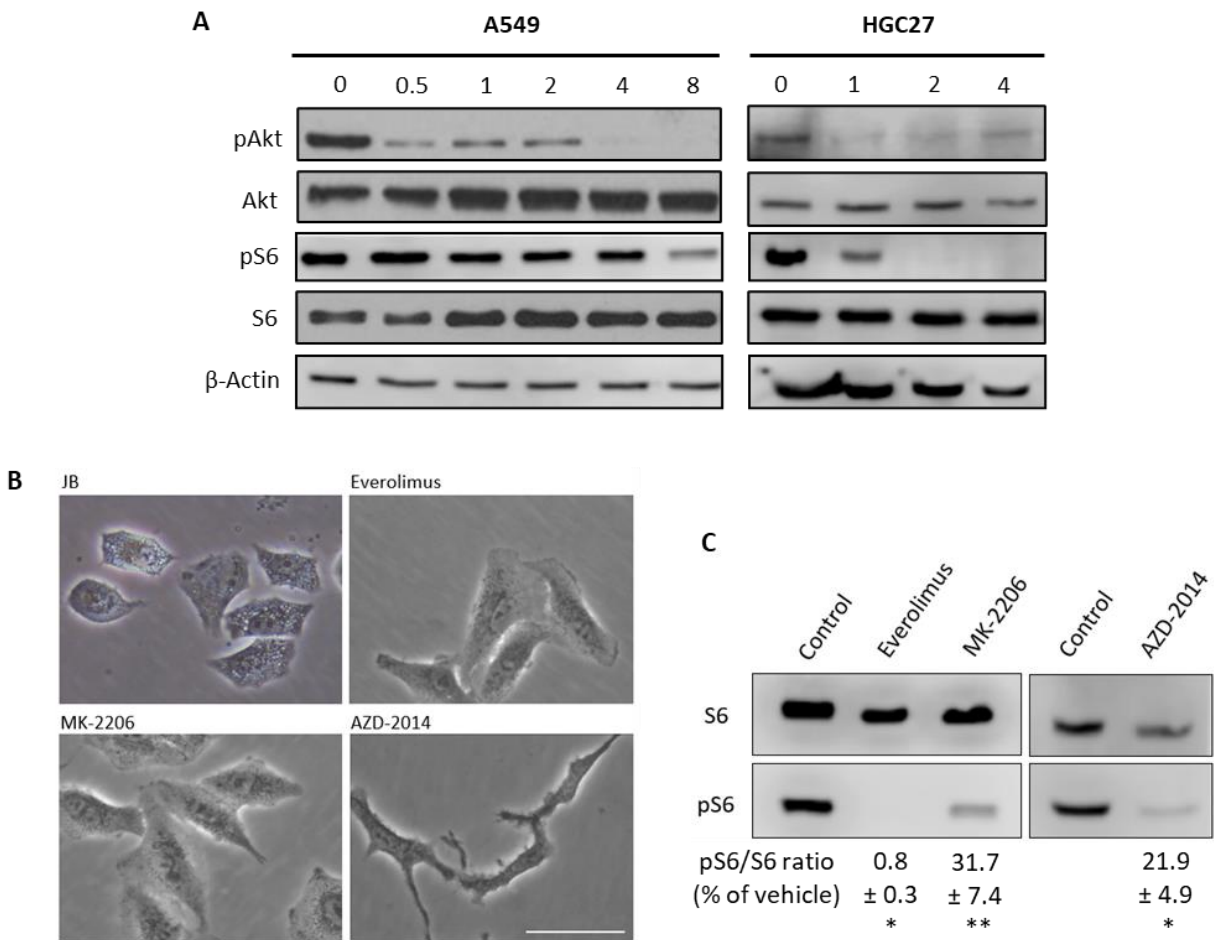
**Figure 4.** Analysis of vacuoles and autophagosomes in MCF7 cells. **A)** MCF7 cells stably transfected with LC3II marked with GFP were incubated with JB (10  $\mu$ M, 2 h). Vacuoles were observed under a phase microscopy and autophagosomes, marked with GFP, were analysed by fluorescence microscopy. Scale bar: 50  $\mu$ m. **B)** MCF7 cells stably transfected with LC3II marked with GFP were incubated with 10  $\mu$ M JB and 0.5 mg/ml LY for 2 h and analysed by confocal microscopy. Images are representative of at least two experiments. Scale bar: 10  $\mu$ m.

All in all, our findings strongly suggest that the vacuoles formed in response to JB do not merge with lysosomes or autophagosomes, and that JB cytotoxic activity occurs by methuosis. Thus, we propose JB as a methuosis-inducing agent, as it has been proposed for other small molecules, such as 3-(5-methoxy-2-methyl-1H-indol-3-yl)-1-(4-pyridinyl)-2-propene-1-one (MOMIPP)<sup>14</sup>, silmitasertib (CX-4945)<sup>15</sup>.

### **JB Signalling pathway**

Recent studies have demonstrated that macropinocytosis contributes to cell growth by stimulating mTORC1 activity<sup>41</sup>. Although in our model macropinocytosis seems to be the cause of cell death, rather than contribute to cell growth, mTORC1 pathway was assessed.

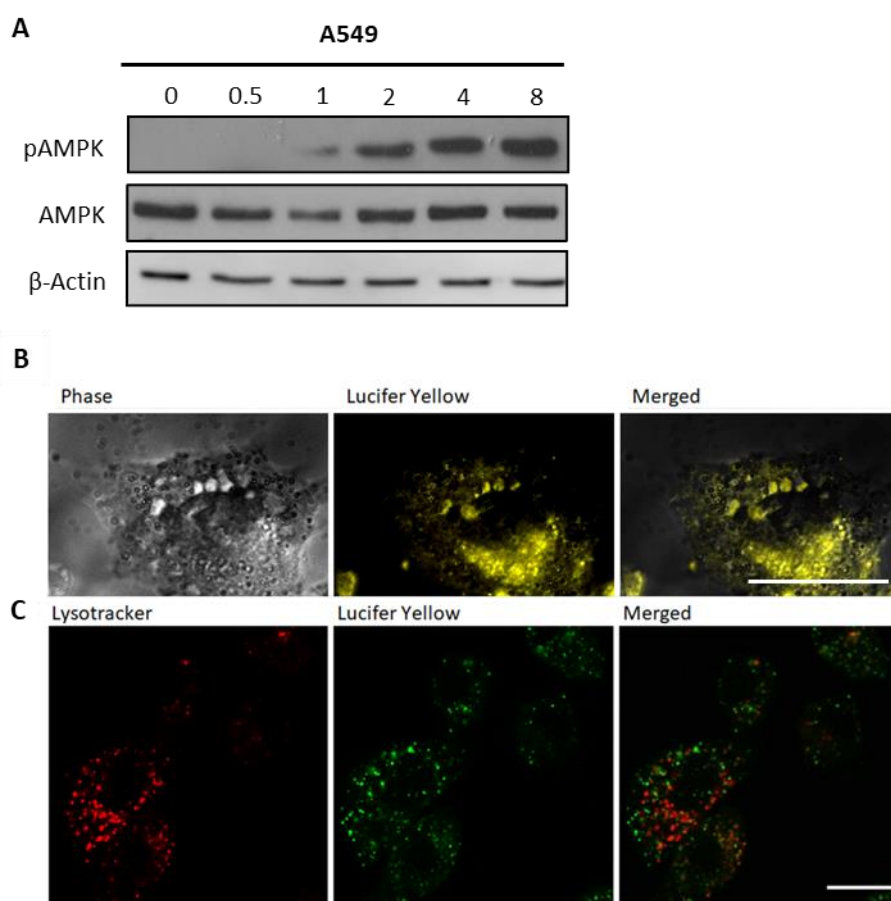
To assess whether the Akt/mTORC1 signalling pathway is involved in JB cytotoxicity, Akt and S6 phosphorylation was analysed by immunoblot. JB treatment of A549 cells resulted in a rapid reduction of phosphorylated Akt (at 30 min) and S6 proteins (at 8 h) (**Figure 5A**, left panels). These results were confirmed in the HGC27 human gastric cancer cell line, where JB inhibited Akt and S6 phosphorylation after 1 h or 2 h incubation, respectively (**Figure 5A**, right panels). To investigate the role of Akt/mTORC1 pathway inhibition in JB-induced cell vacuolization, we tested everolimus (mTORC1 inhibitor), MK-2206 (Akt inhibitor) and AZD-2014 (mTORC1/2 inhibitor) in A549 cells. None of Akt or mTORC1 inhibitors provoked vacuolization (**Figure 5B**), in spite of inhibition of mTORC1 (**Figure 5C**). These results indicate that the Akt/mTORC1 signalling pathway is not involved in the induction of vacuolization in our model.



**Figure 5.** **A)** A549 and HGC27 cells treated with vehicle (0, 0.05% EtOH 24 h) or 5  $\mu$ M JB at the indicated times (h) were lysed, and the levels of total and phosphorylated Akt and S6 proteins were analysed by immunoblotting.  $\beta$ -Actin was used as loading control. Results are representative of two to three independent experiments. **B)** A549 cells were treated for 24 h with 1  $\mu$ M everolimus, 10  $\mu$ M MK-2206 or 100 nM AZD-2014 and compared to 4 h with 5  $\mu$ M JB. Phase-contrast images representative of two experiments performed in triplicate. Scale bar: 50  $\mu$ m. **C)** Protein extracts were analysed by immunoblotting for phospho-S6 and total S6. Numbers denote quantification of levels of phospho-S6 normalized by S6 protein, expressed as percentage of vehicle. Results are representative of two experiments. \*  $P < 0.01$ , \*\* $P < 0.0001$ .

Recent work has proposed the AMP-dependent kinase (AMPK) as an upstream inducer of autophagy. AMPK activates ULK/Atg1 by two different mechanisms: inhibition of mTORC1 by phosphorylation, and by direct phosphorylation of ULK<sup>42</sup>. Therefore, we first studied whether JB induced AMPK activity in our model, by immunoblot analysis of phosphorylated AMPK (Thr172). JB induced AMPK phosphorylation in A549 at soon as 1h incubation (**Figure 6A**).

Given the fact that vacuoles can be observed within 1-2 h of treatment with JB, and than mTORC1 activity was affected after 8h treatment, we next investigated if activation of AMPK was necessary for the vacuolization of the cells induced by JB. Interestingly, incubation of A459 or HGC72 cells with the known AMPK activator phenformin resulted in a similar induction of vacuoles to that induced by JB (**Supplementary Figure 3**), implicating active AMPK as player in cellular vacuolization. Furthermore, phenformin-induced vacuoles were confirmed to be formed by macropinocytosis (**Figure 6B**) and not to merge with lysosomes (**Figure 6C**), as it happened for the vacuoles formed by JB.



**Figure 6.** **A**) A549 and HeLa cells treated with vehicle (0, 0.05% EtOH 24 h) or 5  $\mu$ M JB at the indicated times (h) were lysed, and the levels of total and phosphorylated AMPK were analysed by immunoblotting.  $\beta$ -Actin was used as loading control. Results are representative of two to three independent experiments. **B**) A549 cells were treated with 10 mM phenformin and 0.5 mg/ml LY and staining of the vacuoles with LY was observed after 4 h of incubation. Scale bar: 50  $\mu$ m. **C**) A549 cells treated



with 10 mM phenformin and 0.5 mg/ml LY for 4 h. 75 nM LT was added 0.5 h prior to visualization. Cells were observed under a confocal microscopy. Scale bar: 10  $\mu$ m. Images are representative of two experiments in duplicate.

## DISCUSSION

The molecular mechanism of action of molecules inducers of methuosis, as well as the signalling pathways involved, remain to be fully addressed. However, some signalling pathways have been proposed for different methuosis inducers, such as the Ras/Rac<sup>7,17,43</sup> and the Akt/mTORC<sup>9</sup> pathways. Deregulation of macropinocytosis in cancer cells seems to be correlated with oncogenic RAS, as Rac-dependent signalling pathways hyperstimulate macropinocytosis in glioblastoma<sup>4</sup> and CD99 triggering has been found to induce methuosis of Ewing sarcoma cells through IGF-1R/RAS/Rac1 signalling<sup>17</sup>. On the other hand, MOMIPP induces methuosis in glioblastoma and other cancer cell lines by modulating the JNK signalling pathway<sup>35</sup>. Interestingly, protein kinase CK2 inhibitor silmitasertib promotes methuosis-like cell death associated to massive catastrophic vacuolization<sup>9</sup>. However, J. Lertsuwan et al. found out that the same compound inhibited cell proliferation and induced methuosis by a pathway independent of CK2<sup>15</sup>. A known target of CK2 is Akt, a player in the PI3K/Akt/mTORC1 signalling pathway.

It has been described that inhibition of cellular mTORC1 activity stimulates autophagy<sup>44</sup>. Thus, JB could induce autophagy through the inhibition of mTORC1 pathway. The mTORC1 signalling pathway is well characterised and regulates cell growth<sup>41</sup>. In response to growth factors, cellular Akt is activated and releases mTORC1 inhibition, allowing activation of mTORC1 and transcription of genes promoters of cell growth, among others<sup>41</sup>. Our results show that JB might play an antagonist role compared to growth factors. JB inhibits Akt and activates AMPK, and both actions ending up in activation of mTORC1. Inhibition of mTOR blocks transcription and inhibits S6, thereby resulting in JB impairing cell growth. JB-induced AMPK activation would be important for the macropinocytic activity, as incubation of cells with the AMPK activator phenformin induced cell vacuolization.

M. Kim et al published that CerS6 overexpression reduced phosphorylation of Akt, S6 kinase (S6K), and ERK1/2 and that this effect could be partially reversible by inhibiting mTOR<sup>45</sup>. They demonstrated that mTOR activity can be regulated by the balance between different sphingolipid species, and JB could be an addition to the list of SLs that modulate that pathway.

Intriguingly, a marked decrease in toxicity of jaspine B in the presence of 3MA was found in a previous work carried out with the same cell line by Canals *et al.*<sup>43</sup>. The reason for this discrepancy likely lies in the different experimental conditions followed in both studies. In the work published by Canals *et al.* the effect of 3MA on JB cytotoxicity was assessed by cell viability in cells that had previously been

incubated for two weeks with 3MA 10 mM. In the present study, cells were preincubated for just 30 min with 3MA 5 mM, which proved to be efficient in inhibiting autophagy, as the expression levels of LC3II were shown to decrease by WB.

In conclusion, JB induces cell vacuolation and cell death, through a mechanism that cannot be prevented by inhibiting apoptosis, autophagy or necrosis and we strongly suggest methuosis. Although more research is needed, we propose that activation of AMPK would play a critical role in the cell vacuolization induced by JB, independently of the PI3K/Akt/mTORC1 axis.

## MATERIALS AND METHODS

### Reagents and antibodies

MEM, DMEM, FBS, nonessential amino acids, trypsin-EDTA, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT), BSA, 5-(N-ethyl- N-isopropyl)amiloride (EIPA), ECL™ Prime Western Blotting Detection Reagent and 3-methyladenine (3MA) were from Sigma-Aldrich/Merck. DMEM FluoroBrite, lysotracker red (LT) and Lucifer Yellow (LY) were from Thermo Fisher Scientific. z-VAD and fumonisin B1 (FB1) were from Enzo Life Sciences. Annexin V-FITC early apoptosis detection kit was from Cell Signaling. Laemmli buffer 4x and 30% acrylamide/Bis 37.5:1 were from Bio-Rad. Lysotracker Red PDVF membrane was from Roche. Antibodies:  $\beta$ -actin (mouse) was from Sigma; LC3II (rabbit) was from MBL; Caspase 3 (rabbit), Akt (rabbit), pAkt (rabbit), AMPK (rabbit), pAMPK (rabbit), S6 (rabbit) and pS6 (rabbit) were from Cell Signaling. HRP-secondary antibody goat anti-Mouse IgG was from Thermo Fisher Scientific. HRP-secondary antibody goat anti-Rabbit was from Sigma.

### Jaspine B and Jaspine B-Bodipy synthesis

Synthetic pachastrissamine (Jaspine B) was obtained from phytosphingosine using the protocol described by Overkleef *et al.*<sup>46</sup>. Jaspine B-Bodipy was synthesized by a sequence of reactions starting by a cross metathesis of two advanced synthones, prepared by procedures previously described. Jaspine B alkene functional moiety was carried out following the methodology described by Jana and Panda<sup>47</sup>, and the C10-Bodipy alkene moiety was prepared as described by Saba *et al.*<sup>48</sup>. The unsaturated isopropylideneBoc protected Jaspine B-Bodipy obtained was reduced to the saturated intermediate and finally, deprotected using acidic conditions to afford the wanted fluorophore (**Supplementary Figure 4**).

**Cell lines**

HGC27 cells (human gastric cancer cells, provided by Prof. Riccardo Ghidoni, University of Milan, Italy) were maintained in MEM supplemented with 10% FBS and 1% nonessential amino acids. Cells were grown without reaching confluence. A549 cells (human lung carcinoma, ATCC). Atg5<sup>-/-</sup> and Atg5<sup>+/+</sup> T-large antigen-transformed MEF cells (provided by Dr. Mizushima, Tokyo Medical University, Tokyo, Japan) and Bax<sup>-/-</sup>/Bak<sup>-/-</sup> and Bax<sup>+/+</sup>/Bak<sup>+/+</sup> T-large antigen-transformed MEF cells<sup>22</sup> (provided by Stanley J. Korsmeyer, Dana-Farber Cancer Institute, USA) were cultured in DMEM supplemented with 10% FBS. All cells were maintained at 37 °C in 5% CO<sub>2</sub>.

**Cell viability**

1 × 10<sup>5</sup> cells were seeded in 96-well plates and grown for 24 h. Cell viability was examined in triplicates by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, after treatment with the indicated compounds or vehicle for the indicated times. Then, 10 µL of MTT reactive (5 mg/mL) were added and cells were incubated for 1-3 h. Finally, the medium was removed, and the formazan precipitate was solubilized in 100 µL of DMSO. Absorbance was measured at 570 nm using the multi-detection microplate reader BioTek Synergy 2.

**Annexin V-FITC staining**

1 × 10<sup>5</sup> cells were plated in 6-well plates and allowed to grow overnight. After treatment, cells and medium were collected, centrifuged and cellular pellets washed with 50 mM PBS-EDTA 1% BSA. For cell staining, an Annexin V-FITC kit (Cell Signaling) was used according to the manufacturer's instructions. Stained cells were analyzed in a Guava EasyCyte™ flow cytometer (Merck Millipore, Billerica, MA). Data analysis was performed using the Multicycle AV program (Phoenix Flow Systems, San Diego, CA).

**Uptake of fluid-phase tracer LY**

1 × 10<sup>5</sup> cell s/mL were seeded in 6-well plates or 35 mm glass-bottom dishes and grown overnight. Medium was replaced with 1 ml of fresh medium containing LY (0.5 mg/ml) and cells were incubated with 5 µM JB or 0.05% ethanol (vehicle) for 4 h at 37 °C. Then, LysoTracker (75 nM) was added to each well, and left 30 min prior to observation. Medium was removed, cells were washed three times with PBS, and fresh DMEM FluoroBrite was added. Fluorescent images of live cells were taken using a Digital Sight DS-2Mv camera, acquired with Nis Element F 3.0 software or a Zeiss 880 laser scanning confocal microscope and analyzed using Fiji-ImageJ software.

### Western Blotting

Cells were plated in 6-well plates and grown for 24 h. After treatment, medium and cells were collected, washed with PBS, and cellular pellets were obtained by centrifugation. Cells were lysed with Laemmli sample buffer 1x. Equal amounts of protein (15-30 µg) were loaded and separated on a polyacrylamide/SDS gels and transferred onto a PVDF membrane. Membranes were blocked in 5% milk or 5% BSA in 0.1% TBS-T and incubated with the corresponding primary antibody. After washing with 0.1% TBS-T, membranes were probed with the correspondent horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody. Finally, protein detection was carried out using ECL reactive and visualized in a LI-COR C-DiGit® blot scanner. Alternatively, AMPK and pAMPK proteins were detected using photographic films (Fuji Medical X-ray film, Fijifilm) in a FUJI PHOTO FPM-100A. Band intensity was quantified by LI-COR Image Studio Lite software.

### Phase contrast microscopy

Cells ( $0.3 \times 10^6$  /mL) were seeded in 6-well plates. Phase contrast pictures were taken using a Nikon Eclipse TS100 inverted microscope, connected to a Digital Sight DS-2Mv camera, and acquired with Nis Element F 3.0 software.

### Confocal microscopy

Confocal microscopy images were obtained in a Zeiss 880 confocal microscope, and analyzed by Fiji-Image J program.

## REFERENCES

1. Pistritto, G., Trisciuoglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi & D'Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* vol. 8 603–619 (2016).
2. Maltese, W. A. & Overmeyer, J. H. Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *American Journal of Pathology* vol. 184 1630–1642 (2014).
3. Kornienko, A., Mathieu, V., Rastogi, S. K., Lefranc, F. & Kiss, R. Therapeutic agents triggering nonapoptotic cancer cell death. *J. Med. Chem.* **56**, 4823–4839 (2013).
4. Overmeyer, J. H., Kaul, A., Johnson, E. E. & Maltese, W. A. Active Ras triggers death in

- glioblastoma cells through hyperstimulation of macropinocytosis. *Mol. Cancer Res.* **6**, 965–977 (2008).
5. Lim, J. P. & Gleeson, P. A. Macropinocytosis: An endocytic pathway for internalising large gulps. *Immunol. Cell Biol.* **89**, 836–843 (2011).
  6. Overmeyer, J. H., Young, A. M., Bhanot, H. & Maltese, W. A. A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells. *Mol. Cancer* **10**, 69–86 (2011).
  7. Cho, H. *et al.* Indolyl-Pyridinyl-Propenone-Induced Methuosis through the Inhibition of PIKFYVE. *ACS Omega* **3**, 6097–6103 (2018).
  8. Trabbic, C. J. *et al.* Differential induction of cytoplasmic vacuolization and methuosis by novel 2-indolyl-substituted pyridinylpropenones. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 73–77 (2014).
  9. Silva-Pavez, E. *et al.* CK2 inhibition with silmitasertib promotes methuosis-like cell death associated to catastrophic massive vacuolization of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* **10**, 73–85 (2019).
  10. Cingolani, F. *et al.* Jaspine B induces nonapoptotic cell death in gastric cancer cells independently of its inhibition of ceramide synthase. *J. Lipid Res.* **58**, 1500–1513 (2017).
  11. Salma, Y. *et al.* The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 477–485 (2009).
  12. Zhang, E. *et al.* Discovery of novel jaspine B analogues as autophagy inducer. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **28**, 497–502 (2018).
  13. Robinson, M. W., Overmeyer, J. H., Young, A. M., Erhardt, P. W. & Maltese, W. A. Synthesis and evaluation of indole-based chalcones as inducers of methuosis, a novel type of nonapoptotic cell death. *J. Med. Chem.* **55**, 1940–1956 (2012).
  14. Mbah, N. E., Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. Disruption of endolysosomal trafficking pathways in glioma cells by methuosis-inducing indole-based chalcones. *Cell Biol. Toxicol.* **33**, 263–282 (2017).
  15. Lertsuwan, J. *et al.* CX-4945 induces methuosis in cholangiocarcinoma cell lines by a CK2-independent mechanism. *Cancers (Basel)*. **10**, 283–305 (2018).

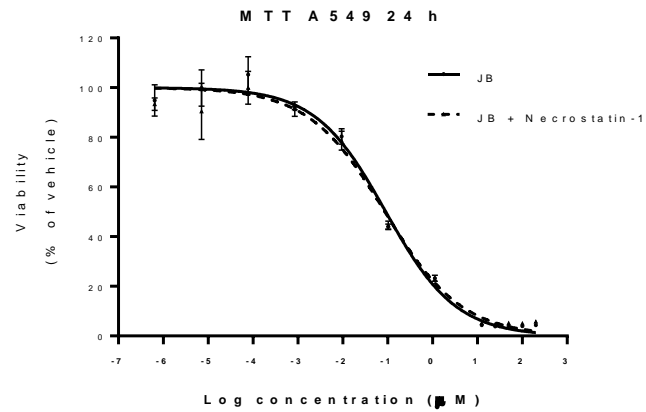
16. Pasello, M., Manara, M. C. & Scotlandi, K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology. *J. Cell Commun. Signal.* **12**, 55–68 (2018).
17. Manara, M. C. *et al.* CD99 triggering induces methuosis of Ewing sarcoma cells through IGF-1R/RAS/Rac1 signaling. *Oncotarget* **7**, 79925–79942 (2016).
18. Amyere, M. *et al.* *Constitutive Macropinocytosis in Oncogene-transformed Fibroblasts Depends on Sequential Permanent Activation of Phosphoinositide 3-Kinase and Phospholipase C.* *Molecular Biology of the Cell* vol. 11 (2000).
19. Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M. & Kostrov, S. V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* **7**, 55863–55889 (2016).
20. Guo, L. H., Li, H., Wang, F., Yu, J. & He, J. S. The tumor suppressor roles of miR-433 and miR-127 in gastric cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 14171–14184 (2013).
21. van der Hoeven, D. *et al.* *Sphingomyelin Metabolism Is a Regulator of K-Ras Function* *Molecular and Cellular Biology*. vol. 38 (2018).
22. Marasas, W. F. Discovery and occurrence of the fumonisins: a historical perspective. *Environ. Health Perspect.* **109**, 239–243 (2001).
23. Yang, Z., Vadlamudi, R. K. & Kumar, R. Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 660 (2005).
24. Sperandio, S., De Belle, I. & Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14376–14381 (2000).
25. Broker, L. E., Kruyt, F. A. E. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research* vol. 11 3155–3162 (2005).
26. Weerasinghe, P. & Buja, L. M. Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp. Mol. Pathol.* **93**, 302–308 (2012).
27. Commisso, C. *et al.* Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* **497**, 633–637 (2013).
28. Koivusalo, M. *et al.* Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **188**, 547–563 (2010).
29. Donaldson, J. G., Porat-Shliom, N. & Cohen, L. A. Clathrin-independent endocytosis: A unique platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell. Signal.* **21**, 1–6 (2009).

30. Racoosin, E. L. & Swanson, J. A. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.* **121**, 1011–1020 (1993).
31. Rozié, A. *et al.* Alkyne-Tagged Analogue of Jaspine B: New Tool for Identifying Jaspine B Mode of Action. *ChemBioChem* **19**, 2438–2442 (2018).
32. Kuroda, I. *et al.* Pachastrissamine, a cytotoxic anhydrophytosphingosine from a marine sponge, Pachastrissa sp. *J. Nat. Prod.* **65**, 1505–1506 (2002).
33. Xu, J. M. *et al.* Synthesis and preliminary biological evaluation of 1,2,3-triazole-Jaspine B hybrids as potential cytotoxic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **80**, 593–604 (2014).
34. Huang, W. *et al.* Discovery and Identification of Small Molecules as Methuosis Inducers with in Vivo Antitumor Activities. *J. Med. Chem.* **61**, 5424–5434 (2018).
35. Li, Z. *et al.* The JNK signaling pathway plays a key role in methuosis (non-apoptotic cell death) induced by MOMIPP in glioblastoma. *BMC Cancer* **19**, 77–97 (2019).
36. Wei, M. C. *et al.* Proapoptotic BAX and BAK: A requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science (80-. )*. **292**, 727–730 (2001).
37. Yang, L. *et al.* Isobavachalcone reveals novel characteristics of methuosis-like cell death in leukemia cells. *Chem. Biol. Interact.* **304**, 131–138 (2019).
38. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **17**, 1–382 (2021).
39. Gewirtz, D. A. The four faces of autophagy: Implications for cancer therapy. *Cancer Res.* **74**, 647–651 (2014).
40. du Toit, A., Hofmeyr, J. H. S., Gniadek, T. J. & Loos, B. Measuring autophagosome flux. *Autophagy* **14**, 1060–1071 (2018).
41. Yoshida, S., Pacitto, R., Inoki, K. & Swanson, J. Macropinocytosis, mTORC1 and cellular growth control. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1227–1239 (2018).
42. Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. & Guan, K.-L. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**, 132–141 (2011).
43. Canals, D. *et al.* Synthesis and biological properties of Pachastrissamine (jaspine B) and diastereoisomeric jaspines. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 235–241 (2009).

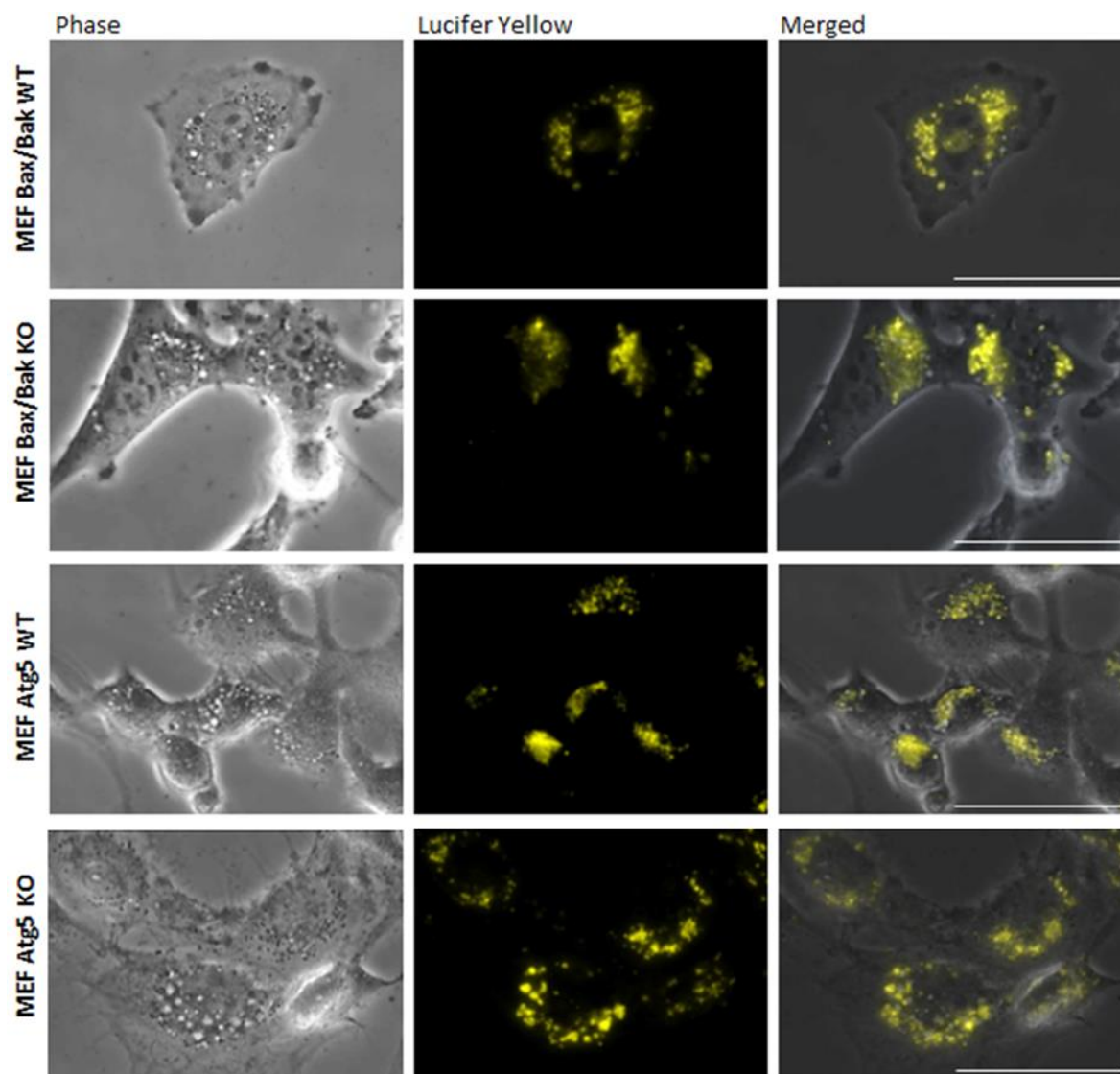
- 
44. Jewell, J. L. & Guan, K. L. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends Biochem. Sci.* **38**, 233–242 (2013).
  45. Kim, M. H. *et al.* C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate/S1PR2 have opposite effects on cell growth through mTOR signaling pathway regulation. *Oncol. Rep.* **40**, 2977–2987 (2018).
  46. Van Tien Berg, R. J. B. H. N. *et al.* An efficient synthesis of the natural tetrahydrofuran pachastrissamine starting from D-ribo-phytosphingosine. *J. Org. Chem.* **71**, 836–839 (2006).
  47. Jana, A. K. & Panda, G. Stereoselective synthesis of Jaspine B and its C2 epimer from Garner aldehyde. *RSC Adv.* **3**, 16795–16801 (2013).
  48. Bandhuvula, P., Li, Z., Bittman, R. & Saba, J. D. Sphingosine 1-phosphate lyase enzyme assay using a BODIPY-labeled substrate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380**, 366–370 (2009).



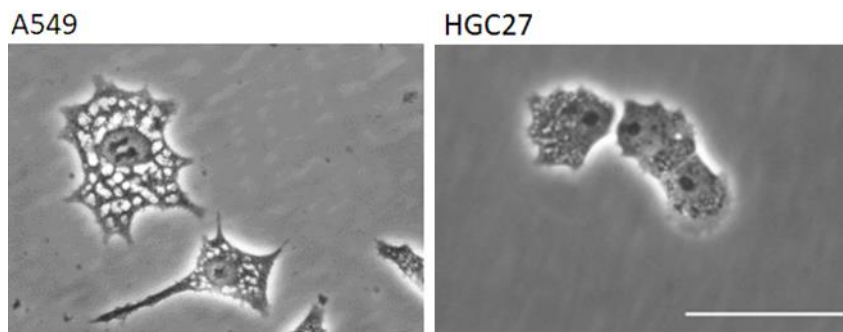
## SUPPLEMENTARY FIGURES



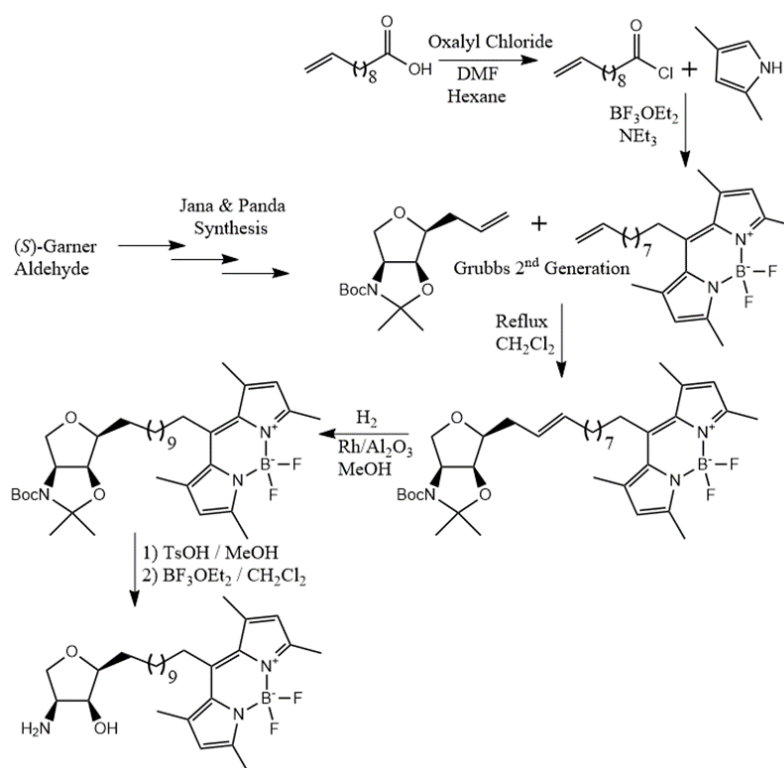
**Supplementary Figure 1.** JB does not cause cell death by necrosis in A549 cells. A549 cells were treated with different concentrations of JB for 24 h after a 1-hour pre-incubation of 50 µM Necrostatin-1. Results are the mean  $\pm$  SD of two experiments in triplicate ( $P > 0.05$ ).



**Supplementary Figure 2.** Vacuoles induced by JB in different cell lines are originated by macropinocytosis. MEF Bax/Bak WT, MEF Bax/Bak KO, MEF Atg5 WT and MEF Atg5 KO cells were treated with 5  $\mu$ M JB and 0.5 mg/ml LY and incorporation of LY in the vacuoles induced by JB was evaluated 4 h later by phase microscopy. Images are representative of two experiments. Scale bar: 50  $\mu$ m.



**Supplementary Figure 3.** Phenformin induces vacuolization in different cell lines. A549 and HGC27 cells were treated with 10 mM phenformin and vacuoles were analysed by phase microscopy after 4 h of incubation. Images are representative of three experiments. Scale bar: 50  $\mu\text{m}$ .



**Supplementary Figure 4.** Chemical synthesis of Jaspine B

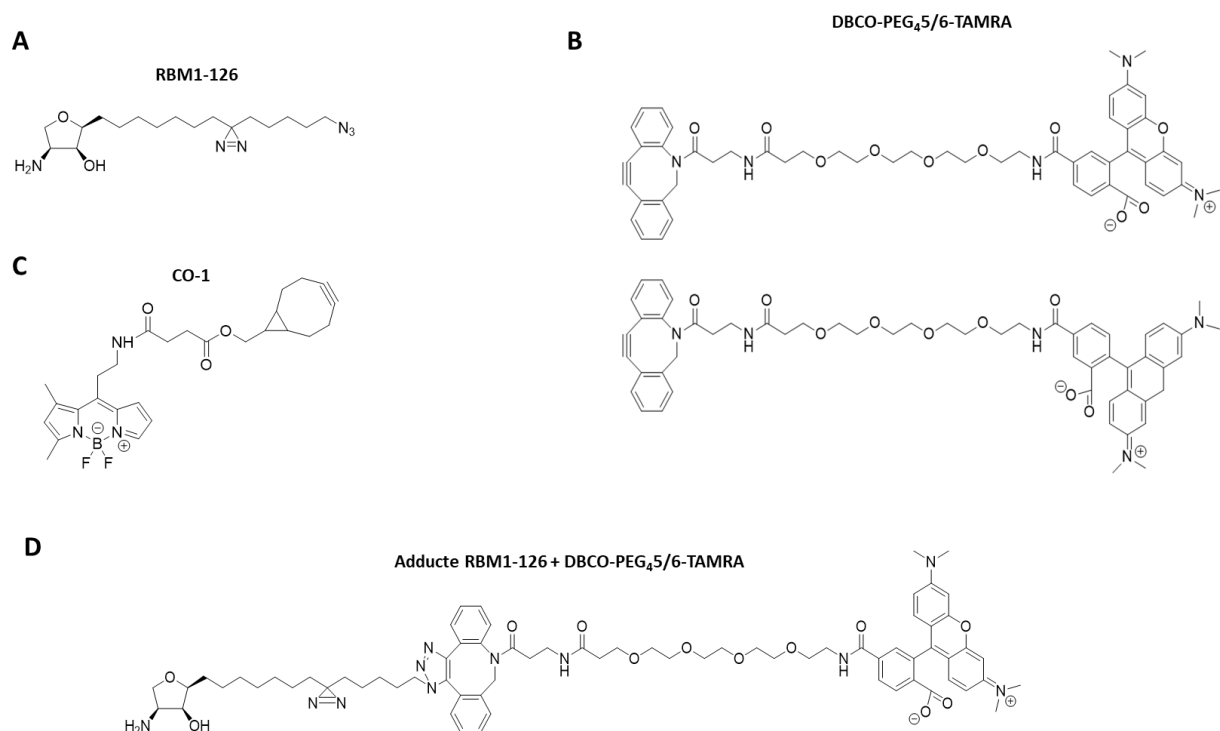
## RESULTATS ADDICIONALS CAPÍTOL 2

### Identificació de proteïnes diana de la Jaspina B

#### Introducció

A l'article presentat al capítol 2 s'identifica una via de senyalització cel·lular en la que està implicada la Jaspina B. Addicionalment, es va voler determinar quines eren les seves proteïnes diana cel·lulars. Per assolir aquest objectiu, es va seguir l'estratègia del marcatge per fotoafinitat, en que s'utilitza un anàleg del lligand amb una funció fotosensible, que reacciona amb les proteïnes mitjançant irradiació, i una unitat de detecció, que en general es un fluoròfor. Per tal de modificar mínimament la molècula de JB, el fluoròfor no es va incorporar directament a la molècula, sinó després de la reacció amb les proteïnes cel·lulars mitjançant una reacció *click*. Amb aquest objectiu es va sintetitzar anàleg de la Jaspina B RBM1-126, que presenta una diazirina com a unitat fotoreactiva i una azida terminal pel marcatge a través de reacció *click* (**Figura 24, A**).

La reacció *click* emprada en aquest estudi es la de cicloaddició azida-alquí. La reacció clàssica entre azides i un alquí terminal està catalitzada per coure (I) i se n'han descrit diverses aplicacions<sup>308,430,431</sup>, com l'etiquetatge amb fluorescència o la purificació per afinitat, i és ràpida, selectiva, compatible amb tampons aquosos i sovint mostra un elevat rendiment. No obstant, no és aplicable a estudis en cèl·lules vives degut a la baixa permeabilitat de les sals de coure a través de la membrana cel·lular. Per això es va decidir optar per la variant basada en la utilització d'un ciclooctí ("strain-promoted azide-alkyne cycloaddition, SPAAC), on la reactivitat està facilitada per la tensió estèrica de l'anell de 8 baules. En el nostre cas es va utilitzar el DBCO-PEG<sub>4</sub>5/6-TAMRA (dibenzilciclooctí-PEG4-5/6-Tetrametilrhodamina) (**Figura 24, B**) i, en els assajos preliminars, el CO-1 (**Figura 24, C**). A la **Figura 24, D** es mostra el producte de la reacció *click* entre l'RBM1-126 i el DBCO-PEG<sub>4</sub>5/6-TAMRA.



**Figura 24.** Estructures químiques de l'anàleg de Jaspina B RBM1-126 (A), DBCO-PEG<sub>4</sub>/5/6-TAMRA (B), CO-1 (C) i el producte de la reacció *click* entre RBM1-126 i DBCO-PEG<sub>4</sub>/5/6-TAMRA (D).

L'RBM1-126 conté un grup diazirina com a unitat fotoreactiva. Quan les diazirines són exposades a llum UV (360 nm), generen un carbè, altament reactiu, que reacciona de forma covalent amb les unitats reactives pròximes de les macromolècules interactores en l'anomenat fotoentrecuament<sup>432,433</sup>.

A part de la diazirina s'han estudiat altres grups funcionals amb propietats fotoreactives, com l'azida o la benzofenona, però la diazirina és més eficient perquè no requereix temps d'irradiació elevats (com és el cas de la benzofenona) i s'activa a una longitud d'ona relativament elevada, que és més segura a nivell cel·lular (a diferència de l'azida, que necessita una longitud d'ona inferior a 300 nm)<sup>432,434</sup>.

## **Materials i Mètodes**

### **Materials:**

Juntament amb els materials descrits a l'article presentat al capítol 2, es van utilitzar els fluoròfors DBCO-PEG<sub>4</sub>5/6-TAMRA, de Jena Bioscience, i CO-1 (Young-tae Chang, Pohang University of Science and Technology, Korea). El compost RBM1-126 va ser sintetitzat al nostre laboratori pel Dr. JL Abad. El plasmidi de CerS5<sup>435</sup> (Vector pCMV-Tag2B) va ser donat pel Prof. AH Futerman (Weizmann Institute of Science, Israel). També es van utilitzar els anticossos per CerS5 (ThermoFisher, PA5-20647) i actina (Sigma-Aldrich, A2228).

### **Mètodes:**

#### **Transfecció de cèl·lules A549 amb CerS5**

Es van sembrar cèl·lules A549 en plaques de 6 pous a una concentració de  $0,3 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL i es van deixar adherir a la placa durant 16-24 h. Per cada pou, es va preparar la barreja de transfecció afegint 2,5 µg de plasmidi portador de la CerS5 i 3 µL de PEI en un volum final de 270 µL d'Opti-MEM. La barreja de transfecció es va incubar durant 20 min a temperatura ambient. Es van rentar les cèl·lules dos cops amb PBS, es van afegir 1 mL d'Opti-MEM a cada pou i, a continuació, els 270 µL de la barreja de transfecció. Després d'incubar les cèl·lules durant 5-6 h, es van afegir a cada pou 2 mL de DMEM. Les cèl·lules es van recollir per incubació amb tripsina-EDTA al cap de 48 h d'incubació. L'expressió de la proteïna va ser avaluada per Western Blot.

#### **Incubació amb RBM1-126 i marcatge de proteïnes per reacció *click***

Es van sembrar 6 mL d'una suspensió cel·lular d'A549 a una concentració de  $0,3 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL a cada placa de petri de plàstic de 10 cm i els cultius es van deixar créixer 16-24 h. Es va reemplaçar el medi per medi fresc amb RBM1-126 20 µM o etanol 0,2% i es va incubar durant 4 h a 37 °C. Es va descartar el medi d'incubació i es van fer dos rentats amb 6 mL de PBS. Les cèl·lules, cobertes amb 6 mL de PBS/placa, es van refredar amb un bany de gel i es van exposar a llum UV (360 nm) durant 20 min. Seguidament les cèl·lules es van desenganxar de la placa amb un rascador en una solució de sacarosa 0,25 M amb inhibidors de proteases (5 µL de leupeptina 1 mg/mL, 2 µL d'aprotinina 1 mg/mL, i 10 µL de PMSF 100mM, per cada mL de solució sacarosa 0,25 M). Es van lisar les cèl·lules per sonicació amb la sonda d'ultrasons Branson Ultrasonics Sonifier™ SFX150 Cell Disruptor, al 50% d'amplitud, amb micropunta de 2,4 mm, amb 3 cicles de 5 s d'ultrasons seguits de 5 s en gel. Es van centrifugar els lisats cel·lulars durant

3 min a 2300 g i es van recollir els sobrenedants. Es va quantificar la concentració de proteïna de cada lisat cel·lular mitjançant el kit Micro BCA Protein Kit, segons les instruccions del fabricant, i es van normalitzar les mostres per tal de tenir la mateixa quantitat de proteïna en totes elles. Es va incubar amb iodoacetamida (IAA) 15 mM durant 5 min a 37 °C, amb protecció de la llum. Es va afegir DBCO-PEG<sub>4</sub>5/6-TAMRA a una concentració final de 16 µM i es va incubar durant 30 min a temperatura ambient o bé es va addicionar CO-1 a una concentració final d'1 µM i es va incubar durant 10 min a temperatura ambient. Les mostres es van guardar a -20 °C fins la seva utilització.

### **Electroforesi en dues dimensions**

#### Primera dimensió: Enfoc isoelèctric

Trenta µg de la mostra obtinguda segons es descriu a l'apartat "Incubació amb RBM1-126 i marcatge de proteïnes per reacció *click*" es van dissoldre en tampó DeStreak™ Rehydration Solution (Sigma-Aldrich) amb DTT 5 mM i 1% de tampó IPG (Sigma-Aldrich), en un volum final de 125 µL. Es van carregar els 125 µL de mostra a un sarcòfag de 7 cm i es va posar la tira IPG amb gradient de pH 3-10 al sarcòfag, a sobre la mostra, amb l'acrilamida de la tira tocant la mostra. Es va cobrir la tira amb 1 mL d'oli mineral i es va tapar el sarcòfag. Un cop tots els sarcòfags van estar preparats, es van col·locar a la font d'alimentació (Ettan IPGphor III, de GE Healthcare) per procedir a la rehidratació de les tires durant 6 h a 20 °C abans d'iniciar l'enfocament de les proteïnes per punt isoelèctric (pI). A continuació, el voltatge es va pujar a 30 V durant 6 h (mode *step-n-hold*), 500 V durant 1 h, 100 V durant 1 h i, posteriorment, es van assolir 5000 V durant 1 h, tots aquests passos en mode gradient; i per acabar un altre cop en mode *step-n-hold* a 5000 V fins que les tires van assolir un voltatge total de 20000 V. Es va retirar excés d'oli de les tires i es van congelar a -20 °C fins a la seva utilització i durant un mínim de 30 min.

#### Segona dimensió: SDS-PAGE

Es va preparar la fase de separació dels gels d'acrilamida en vidres d'1 mm. Es van descongelar les tires i cada una es va incubar amb 2,5 mL de DTT 65 mM en tampó equilibrador (Urea 6 M, glicerol 30% (p/v), SDS 2% (p/v) en tampó Tris-HCl 0,05 M, pH 8,8) en un tub Falcon®, en agitació suau, durant 15 min. El tampó equilibrador facilita la transferència de les proteïnes al gel durant la segona dimensió i el DTT impedeix interaccions entre les proteïnes i així les manté reduïdes, impeding interaccions entre elles. A continuació es va repetir el procediment, però en aquest cas el tampó equilibrador contenia 2,5 mL de IAA 135 mM, que compensa l'excés de DTT i alquila els grups tiol de les proteïnes, evitant així la seva oxidació durant l'electroforesi. Es van netejar les tires en tampó de separació 1x (Tris Base 25 µM, glicina

0,2 M i SDS 3,5  $\mu$ M en H<sub>2</sub>O Milli-Q) per treure l'excés de tampó equilibrador i es van posar sobre el gel separador, entre els dos vidres. Es van posar 5  $\mu$ L de marcador de pes molecular en un paper Wattman (5 x 3 mm) i es va deixar assecat 2 min abans de posar-lo al costat del pol negatiu de la tira, sobre el gel separador. Per tal d'afavorir el contacte de la tira amb el gel es va segellar la tira sobre el gel separador amb 1 mL d'agarosa 5 g/l en tampó de separació 1x i 0,025% de blau de bromofenol. Les proteïnes es van separar per electroforesi a 100V durant 15 min seguits de 120 V durant 60 min.

### Visualització de proteïnes

Per a la visualització de les proteïnes separades es van utilitzar dos mètodes diferents.

#### Fluorescència:

Els gels que contenien proteïnes marcades amb fluorescència es van visualitzar en un instrument Typhoon 8600 de Molecular Dynamics (Instal·lació Radioactiva, Parc Científic de Barcelona). Les lectures de fluorescència corresponents a la rodamina es van obtenir amb el làser d'excitació de 532 nm i el filtre d'emissió de 580 nm BP 30, amb sensibilitat normal, a 550 PMT (tub fotomultiplicador) i una mida de píxel de 50  $\mu$ m .

#### Tinció de gels amb plata:

Un altre mètode per a la visualització és el desenvolupat per Shevchenko i col.<sup>436</sup> lleugerament modificat per a ser compatible amb els anàlisis per espectrometria de masses. Aquest mètode consta bàsicament de quatre etapes. Primer es van fixar les proteïnes al gel d'acrilamida amb una solució de fixació (etanol 40% + àcid acètic 10%) durant 30 min en agitació orbital. En la segona etapa, es va descartar la solució de fixació i el gel es va tractar amb la solució de sensibilització (etanol 30%, tiosulfat de sodi 0,2% (p/v), acetat sòdic 6,8% (p/v)) durant 30 min en agitació. Es va rentar el gel 3 cops amb aigua Milli-Q, en agitació suau, durant 5 min. El gel es va tenyir amb nitrat de plata 2,5 g/l durant 20 min en agitació suau, es va rentar 2 cops amb aigua Milli-Q durant 1 min i les proteïnes es van revelar amb la solució reveladora (carbonat sòdic 2,5% (p/v) i formaldehid en solució 37% (p/v)) entre 2 i 5 min, evitant la sobreexposició. A la darrera etapa, es va aturar el revelat per tractament amb la solució de parada (EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1,46% (p/v)) durant 10 min en agitació. Finalment, el gel es va rentar 3 cops amb aigua Milli-Q durant 5 min.

### Digestió de proteïnes amb tripsina

Per a la identificació de les proteïnes d'interès presents al gel, es va procedir a la digestió amb tripsina donant lloc als pèptids tríptics que serien analitzats per espectrometria de masses. El pas previ a la



digestió en gel de les proteïnes separades en gels 2D va ser la visualització amb algun dels mètodes mencionats anteriorment i posterior elecció de les proteïnes per comparació entre els diferents tractaments. A continuació i abans de retallar les proteïnes d'interès del gel, es van fer 3 rentats successius d'1 h amb aigua Milli-Q. Després es va dipositar el gel sencer a sobre d'un vidre net i es van retallar els fragments de gel contenint les proteïnes d'interès amb una punta de pipeta prèviament netejada amb ACN. Cada fragment de gel es va col·locar en un tub Eppendorf. Abans de procedir a la digestió, es van eliminar els reactius de tinció afegint a cada Eppendorf 500 µL d'ACN i mantenint-los a temperatura ambient durant 10 min.

### ❖ Reducció i alquilació de les proteïnes

Seguidament es va retirar l'ACN, es van afegir 30 µL de DTT 10 mM en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM recent preparat i es va incubar durant 30 min a 56 °C. Després de deixar refredar les mostres a temperatura ambient, es van afegir 500 µL d'ACN i es van mantenir a temperatura ambient durant 10 min.

Es va descartar el sobrenedant i el precipitat es va incubar amb 30 µL de IAA 55 mM en bicarbonat d'amoni 100 mM durant 20 min a temperatura ambient en fosc. Seguidament es van afegir 500 µL d'ACN i es va deixar a temperatura ambient durant 10 min. Es va descartar el sobrenedant i el precipitat es va digerir amb tripsina o es va guardar a -20 °C fins el moment de la digestió.

### ❖ Digestió de proteïnes amb tripsina

El precipitat procedent del tractament descrit a l'apartat anterior es va incubar amb 50 µL de tripsina (Sigma-Aldrich) a una concentració de 13 ng/µL en  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  10 mM + ACN 10% (v/v) durant 120 min a 4 °C. Després es van afegir 10 µL de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  100 mM per acabar de cobrir els fragments de gel i mantenir-los humits durant la hidròlisi enzimàtica. La barreja de reacció es va incubar durant 16-24 h a 37 °C.

### ❖ Extracció de pèptids

La barreja de reacció anterior es va deixar refredar a temperatura ambient, es van afegir, a cada tub, 50 µL d'ACN 50% + TFA 0,25% en aigua Milli-Q i es va mantenir a temperatura ambient durant 10 min. A continuació es va traspasar tota la solució a un tub Eppendorf de 0,5 mL, que es va refredar amb gel, i es va repetir l'extracció. La dissolució de pèptids procedent de la segona extracció es va traspasar a un altre tub Eppendorf de 0,5 mL que també es va refredar amb gel. Les dues solucions de pèptids es van guardar a -80 °C fins al moment de l'anàlisi per espectrometria de masses.

## Anàlisi de pèptids tríptics per espectrometria de masses

Els pèptids es van separar en un equip de cromatografia líquida equipat amb una bomba capil·lar nano Agilent 1200 (Thermo Fischer Scientific), una bomba binària, un microinjector amb termòstat i una vàlvula electromecànica de dos ports. Per a la separació es va utilitzar un cartutx preconcentrador C18 (Agilent Technologies) connectat a una altra columna C18 de 15 cm de llarg i 100 µm de diàmetre (Nikkyo Technos Co.). La separació es va fer a 0,4 µL/min amb un gradient d'acetonitril de 30 min, del 3 al 35% (dissolvent A: àcid fòrmic 0,1%; dissolvent B: acetonitril amb àcid fòrmic 0,1%). Un cop separats, els pèptids es van analitzar mitjançant un equip d'espectrometria de masses LTQ XL Orbitrap (ThermoFisher) equipat amb una font de ionització nanoelectrospray (nESI) (Proxeon, Dinamarca, ara Thermo Scientific). L'Orbitrap LTQ XL es va operar en mode positiu amb un voltatge d'esprai d'1,8 kV. L'anàlisi d'espectrometria de masses es va fer en un mode depenent de dades, obtenint un escaneig complet seguit de 10 escanejos MS/MS dels 10 senyals més intensos detectats en l'escaneig MS. Els espectres de masses d'escaneig complet (rang 400-1650) es van adquirir amb una resolució de 60000. Els espectres de MS/MS es van realitzar amb la trampa iònica lineal (LTQ-XL).

La identificació dels espectres LC-MS/MS es va fer utilitzant SEQUEST (Proteome Discoverer v1.4, ThermoFisher) amb els següents paràmetres: tolerància de massa del pèptid 20 ppm, tolerància de fragment 0,6 Da, enzim de digestió tripsina amb tolerància d'error de fins a 2 punts de tall perduts, modificació dinàmica de l'oxidació de metionina (+16 Da), modificació fixa de carbamidometilació de cisteïna (+57 Da). La base de dades utilitzada va ser *Homo sapiens* (Uniprot revisada 02/20). Els resultats finals es van filtrar amb una taxa màxima d'error del 0,1% (FDR<0.1%) d'espectre i utilitzant Percolator<sup>437,438</sup>.

## Anàlisi dels nivells d'esfingolípid

### Obtenció de mostres:

En plaques de 6 pous, es va sembrar 1 mL/pou d'una suspensió cel·lular a una concentració de  $0,3 \cdot 10^6$  cèl·lules/mL, i el cultiu es va deixar créixer 16-24 h. Es va aspirar el medi, es va afegir 1 mL/pou de medi amb els productes indicats en cada cas i el cultiu es va incubar a 37 °C i 5% CO<sub>2</sub> durant el temps especificat en cada experiment. Es va aspirar el medi, les cèl·lules es van rentar amb 400 µL/pou de PBS i es van desenganxar de la placa amb 400 µL/pou de tripsina-EDTA a 37 °C durant 3 min. Es van afegir 600 µL/pou de medi suplementat amb 10% d'FBS per a neutralitzar l'acció de la tripsina i la suspensió cel·lular es va transferir a un tub Eppendorf. El nombre de cèl·lules es va determinar amb una alíquota de 20 µL en

un comptador automàtic Countess™ Automated Cell Counter (Invitrogen). La resta de suspensió cel·lular es va centrifugar a 9300 g durant 3 min i es va retirar el sobrenedant. Al precipitat es van afegir 400 µL de PBS i es va tornar a centrifugar a 9300 g durant 3 min. Es va descartar el sobrenedant i es van guardar els pellets cel·lulars a -20 °C fins al moment de l'extracció d'esfingolípid.

### Extracció d'esfingolípid:

A cada vial de vidre de 5 mL es van dispensar 10 µL d'una solució 20 µM d'estàndard intern d'esfingolípid (200 pmol/mostra). L'estàndard intern d'esfingolípid es va preparar amb 960 µL d'etanol, 10 µL de CerC12 2 mM, 10 µL de dhSoC17 2 mM, 10 µL de GlcCerC12 2 mM i 10 µL de SMC12 2 mM. A continuació es van afegir a cada vial 750 µL d'una solució de metanol:CH<sub>3</sub>Cl (2:1) amb BHT 0,01% (v/v). Els pellets cel·lulars resultants del tractament descrit a l'apartat "Obtenció de mostres" es van resuspendre bé amb 100 µL d'H<sub>2</sub>O Milli-Q i la suspensió es va transferir al vial de vidre que contenia la dissolució d'extracció. Es van tancar els vials i es van sonicar en un bany durant 10 seg. Les mostres es van incubar a 48 °C durant 16-24 h, en un bany amb agitació. Després les mostres es van tractar amb 75 µL/vial de KOH 1 M en metanol (estufa, 37 °C durant 2 h). Es van afegir 75 µL d'àcid acètic 1 M i les mostres es van evaporar per centrifugació al buit (*speedvac*) durant 1,5 h. Es van afegir 500 µL de metanol/vial i les mostres es van sonicar en un bany durant 10 seg. Amb l'ajuda de pipetes Pasteur el volum de cada vial es va transferir a tubs Eppendorf, i el dissolvent es va evaporar per centrifugació al buit durant 30 min. Es van addicionar 150 µL de metanol a cada tub Eppendorf, les mostres es van centrifugar durant 3 min a 9300 g i els sobrenedants es van traspasar a vials d'UPLC i es van injectar a l'equip d'UPLC-TOF (cromatografia líquida d'ultra alta resolució acoblada a un espectròmetre de masses tipus temps de vol).

### Condicions Instrumentals:

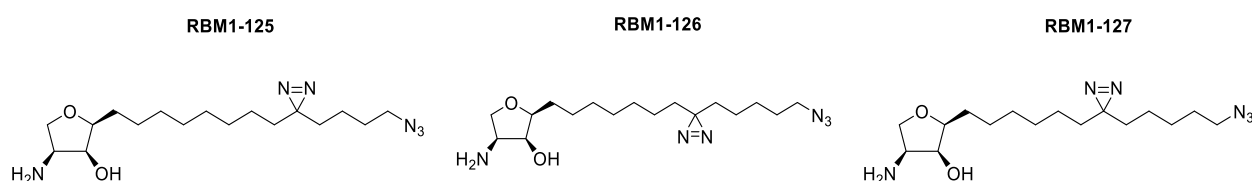
L'espectrofotometria de masses acoblada a cromatografia líquida es van dur a terme en un sistema Waters Aquity UPLC connectat a un espectròmetre de masses Waters LCT Premier orthogonal accelerated time of Flight (Waters), operant en electrospai amb mode de ionització positiva o negativa controlat amb el programa Micromass MassLynx v.4.1 (Waters). Es va utilitzar una columna Acquity UPLC BEH C8 d'1,7 µm (2,1 mm x 100 mm).

Es van injectar 8 µL a 30 °C i es van eluir a un flux de 0,3 mL/min. Les dues fases mòbils van ser formiat amònic 1 mM en metanol (fase A) i formiat amònic 2 mM en aigua Milli-Q (fase B), totes dues amb 0,05 mM d'àcid fòrmic. Es va programar un gradient lineal de 0 min: 80% A; 3 min: 90% A; 6 min: 90% A; 15 min: 99% A; 18 min: 99% A; 20 min: 80% A. Rang d'adquisició del detector TOF, de m/z de 50 a 1500;

volatge del capil·lar, 3,0 kV; temperatura de dessolvatació, 350 °C; flux del gas de dessolvatació 600 L/h. El rang dinàmic lineal es va determinar injectant solucions d'estàndards. La identificació dels compostos es va basar en la mesura de les masses exactes amb un error < 5 ppm i el seu temps de retenció, comparat amb els dels compostos de referència ( $\pm 2\%$ ).

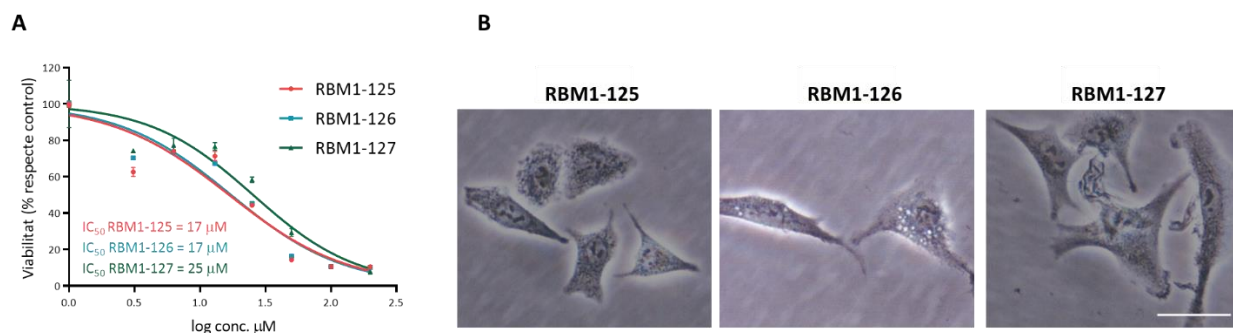
## Resultats

Prèviament a l'estudi d'identificació de proteïnes diana de la JB, es va determinar la citotoxicitat i la capacitat d'inducció de vacúols en cèl·lules A549 de tres azido anàlegs fotoactivables de la Jaspina B (**Figura 25**) per tal d'escollir el més adequat.



**Figura 25.** Estructures químiques de tres anàlegs de Jaspina B (RBM1-125, RBM1-126 i RBM1-127) amb un grup azida i un grup diazirina en diferents posicions.

Dels tres anàlegs, l'RBM1-126 va resultar ser el més proper a la JB pel que fa a citotoxicitat i capacitat d'inducció de vacuolització en cèl·lules de la línia A549, amb una  $IC_{50}$  de 17  $\mu$ M (amb un interval de confiança del 95% de 14,11  $\mu$ M – 21,07  $\mu$ M) (Error! No s'ha trobat l'origen de la referència., **A**) i inducció de vacúols a una concentració de 20  $\mu$ M durant 4 h (**Figura 26, B**). Conseqüentment, es va escollir l'anàleg RBM1-126 a una concentració de 20  $\mu$ M durant 4 h pels experiments d'etiquetatge de proteïnes per fotoafinitat.

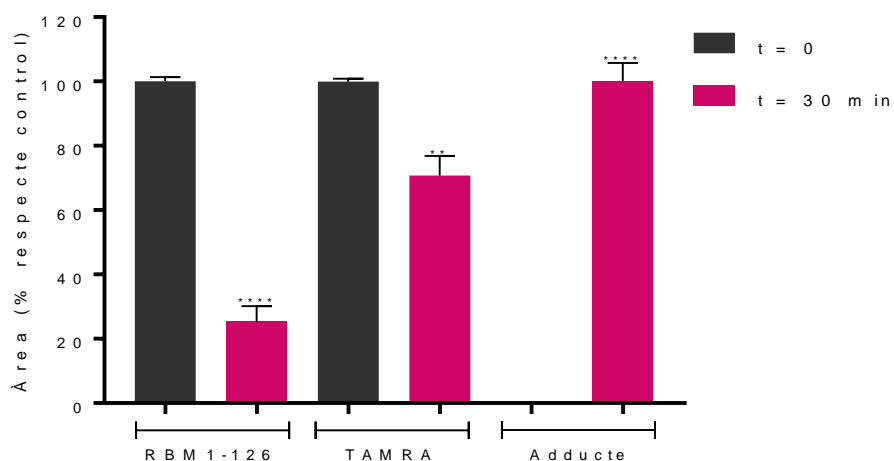


**Figura 26.** Efecte cel·lular dels compostos RBM1-125, RBM1-126 i RBM1-127. **A)** Efecte dels compostos RBM1-125, RBM1-126 i RBM1-127 en la viabilitat cel·lular. Cèl·lules de la línia A549 es van incubar amb els tres compostos durant 24 h i la viabilitat

## RESULTATS

cel·lular es va determinar per assaig d'MTT. L'ajustament de les corbes dosi-resposta amb una equació sigmoïdal de pendent variable va permetre calcular els valors  $IC_{50}$ . Resultats obtinguts de dos experiments amb triplicats. **B)** Imatges de cèl·lules A549 tractades durant 4 h amb cada compost a una concentració de 20  $\mu$ M. Barra d'escala: 50  $\mu$ m.

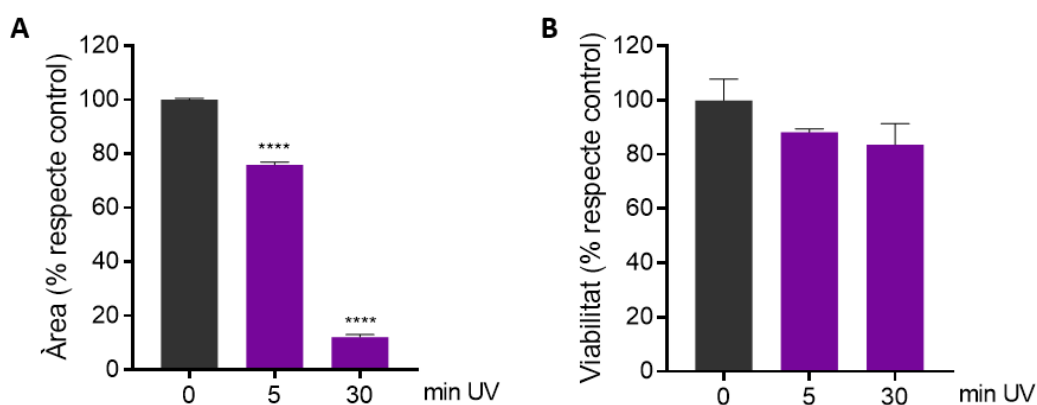
A continuació es va determinar (espectrometria de masses d'alta resolució) l'eficiència de la reacció *click* entre l'RBM1-126 i un excés de DBCO-PEG<sub>4</sub>/5/6-TAMRA en incubacions a 37 °C durant 30 min (temps 0 com a control negatiu), mesurant la quantitat d'adducte format respecte l'RBM1-126, que era el reactiu limitant. Les anàlisis van permetre estimar un rendiment de la reacció d'un 70% (**Figura 27**).



**Figura 27.** Eficiència de la reacció *click* entre l'anàleg de Jaspina B RBM1-126 i el fluoròfor TAMRA. Es van analitzar per espectrometria de masses d'alta resolució mostres de barreges de reacció de RBM1-126 (5  $\mu$ M) amb TAMRA (20  $\mu$ M) a 0 i a 30 min d'incubació a 37 °C. Els resultats (mitjana +/- SD) corresponen a dos experiments en duplicat i s'expressen en percentatge de les àrees del pic de cada massa normalitzades pel seu control (\*\*  $P < 0,01$ , \*\*\*\*  $P < 0,0001$ ; prova t de Student de dues cues per a dades independents).

Un cop demostrat que la reacció *click* es produïa de forma satisfactòria amb 30 minuts d'incubació, es va determinar l'efecte de la irradiació amb llum UV (360 nm) sobre l'estabilitat de l'RBM1-126. Per això, les cèl·lules A549 tractades amb RBM1-126 es van irradiar amb llum UV durant 0, 5 o 30 minuts i en els extractes es va analitzar per espectrometria de masses d'alta resolució la presència de l'RBM1-126 als diferents temps (**Figura 28, A**). Es va observar una disminució de la quantitat d'RBM1-126 al llarg del temps d'irradiació UV, sobretot a 30 minuts, així com una disminució de les seves espècies acilades amb diferents àcids grassos (resultats no mostrats). Aquests resultats s'expliquen considerant que s'ha produït el fotoencreuament d'RBM1-126 i les proteïnes diana a través de la generació del carbè. També es va avaluar la viabilitat de la línia cel·lular A549 exposada als mateixos temps d'irradiació en presència de l'RBM1-126 (**Figura 28, B**), sense observar-se citotoxicitat significativa. Així doncs, es va escollir un temps òptim de 30 minuts d'irradiació amb llum UV pels següents experiments, ja que la viabilitat cel·lular no es

va veure afectada i només quedava al voltant d'un 10% d'RBM1-126 lliure, assumint-se que el 90% s'havia unit a proteïnes diana.

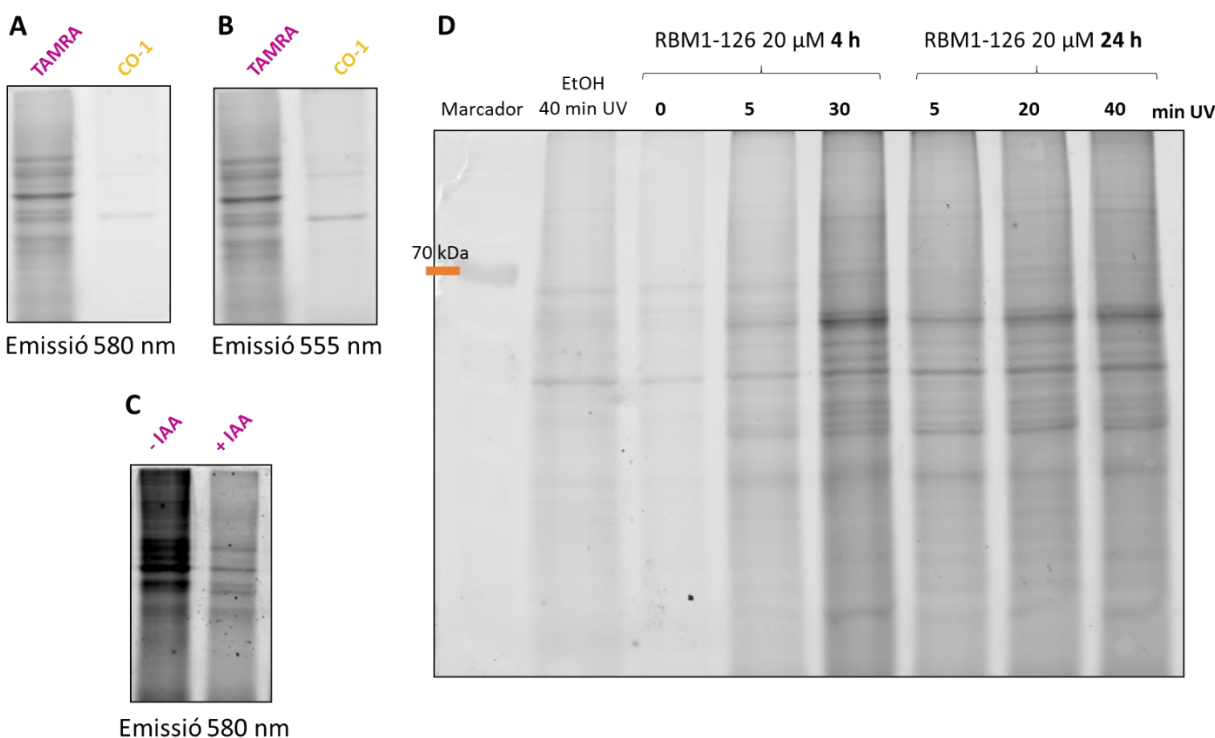


**Figura 28. Avaluació de l'efecte de la irradiació amb llum UV en cèl·lules A59 al llarg del temps.** **A)** Quantificació relativa de la massa de l'anàleg RBM1-126 en funció del temps d'irradiació amb llum UV respecte al temps 0 en A549. Les mostres es van analitzar per espectrometria de masses. Els experiments es van dur a terme amb RBM1-126 (5  $\mu$ M) a 0, 5 i 30 min d'irradiació amb llum UV (360 nm). Les dades corresponen a dos experiments en duplicat i s'expressen en percentatge de les àrees corresponents als pics de la massa de l'RBM1-126 normalitzades pel control (temps 0). **B)** Avaluació de la viabilitat de la línia A549 exposada a diferents temps d'irradiació amb llum UV. Es va quantificar el nombre de cèl·lules de les mostres exposades durant 0, 5 o 30 min a irradiació UV en presència de l'RBM1-126. Les dades corresponen a dos experiments en duplicat expressades en percentatge del nombre de cèl·lules vives en cada temps, normalitzats pel control (temps 0). (\*\*\*\* $P < 0,0001$ ; prova t de Student de dues cues per a dades independents).

A continuació, es va procedir a optimitzar les condicions de detecció de les proteïnes marcades per fluorescència en gel. Per la visualització dels adductes proteïna-RBM1-126, es van comparar dos ciclooctins (unitat reactiva amb l'azida de l'RBM1-126) amb dos fluoròfors diferents, el DBCO-PEG45/6-TAMRA (532/580 nm, excitació/emissió) i el CO-1<sup>439</sup>, que presenta una unitat de Bodipy (488/510 nm, excitació/emissió). A part, també es va avaluar l'efecte sobre el soroll de fons de la preincubació de les mostres amb iodoacetamida abans d'incubar-les amb els reactius fluorescents.

Com es pot veure a la **Figura 29**, el marcatge amb el CO-1 va donar lloc a bandes molt menys intenses que les observades amb el DBCO-PEG45/6-TAMRA. Aquesta diferència fou deguda a limitacions de l'equip utilitzat en la detecció de fluorescència en gel (Typhoon 8600, de Molecular Dynamics). En funcionar amb filtres d'excitació/emissió determinats, l'equip no permetia utilitzar les longitud d'ona òptimes pel fluoròfor del CO-1, però sí pel TAMRA. La imatge de fluorescència del gel de la **Figura 29, A** es va obtenir amb el filtre adequat per a la visualització del TAMRA, observant-se força més bandes de proteïna que en el cas del marcatge amb el Bodipy del CO-1. La imatge de fluorescència del gel de la **Figura 29, B** es va adquirir amb el filtre d'emissió que s'aproxima més a l'emissió del fluoròfor del CO-1 (555 nm), però el marcatge no va millorar respecte a l'emissió a 580 nm. Per aquesta raó es va continuar treballant amb el DBCO-PEG45/6-TAMRA.

S'ha descrit que el DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA s'uneix als grups tiol de les proteïnes<sup>170</sup>, i l'alquilació dels tiols peptidilcisteïna amb IAA prevén les reaccions dels grups tiol no desitjades<sup>440</sup>. Com es veu a la **Figura 29, C**, la preincubació de les mostres amb IAA va reduir molt el senyal inespecífic del fluoròfor a la imatge de fluorescència. Per tant, totes les mostres següents es van tractar amb IAA prèviament a la incubació amb el fluoròfor. Pel que fa al temps d'incubació amb l'RBM1-126 sobre el perfil de proteïnes marcades, no s'observà diferència entre 4 h i 24 h (**Figura 29, D**).

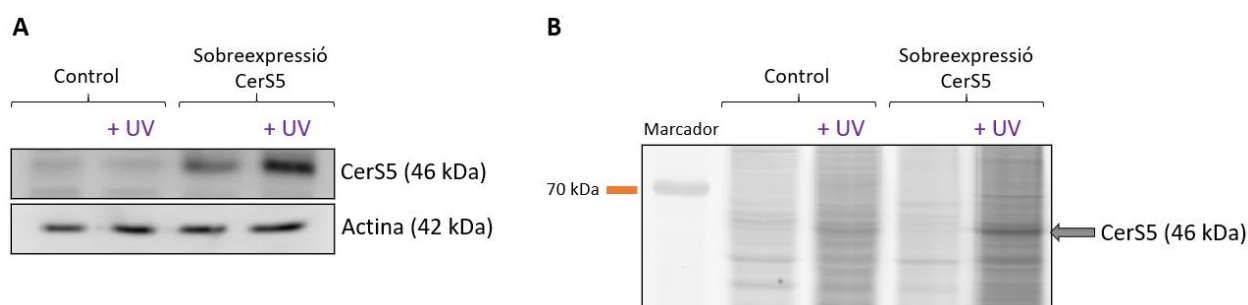


**Figura 29.** Optimització de la visualització de proteïnes fluorescents al gel d'acrilamida. Imatge de fluorescència d'un gel d'acrilamida en una dimensió amb 20 μg de proteïna/carril provinent de mostres de cèl·lules A549 tractades amb RBM1-126 20 μM durant 4 h i exposades durant 5 min a llum UV, abans de ser lisades. **A i B)** Comparació del marcatge de proteïnes amb els fluoròfors TAMRA i Bodipy del CO-1. Les mostres van ser incubades amb DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA 16 μM durant 30 min o amb CO-1 1 μM durant 10 min amb incubació prèvia amb IAA 15 mM durant 5 min a 37 °C. Les dues lectures es van fer amb una excitació de 532 nm, i l'emissió va ser de 580 nm (**A**) o 555 nm (**B**). **C)** Avaluació de la preincubació de les mostres amb IAA prèviament a la incubació amb el ciclooctí. Les mostres van ser incubades amb DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA 16 μM durant 30 min amb una incubació prèvia (carril dret) o no (carril esquerre) amb IAA 15 mM durant 5 min a 37 °C. **D)** Efecte del temps d'incubació de l'RBM1-126 i el d'irradiació amb llum UV en el marcatge dels gels. Imatge de fluorescència d'un gel d'acrilamida en una dimensió amb 20 μg de proteïna/carril provinent de mostres de cèl·lules A549 tractades amb EtOH o RBM1-126 20 μM durant 4/24 h, exposades durant 0/5/20/30/40 min a llum UV, lisades, tractades amb IAA 15 mM durant 5 min a 37 °C i incubades amb DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA 16 μM durant 30 min. Excitació de 532 nm i emissió de 580 nm. PMT 500, resolució 200 (**A i B**) o 100 (**C i D**), sensibilitat de filtre normal.

A la vista del conjunt de resultats anteriors, els següents experiments es van dur a terme incubant cèl·lules A549 amb EtOH o RBM1-126 20 μM durant 4 h, exposant-les a llum UV (360 nm) durant 30 min,

tractant les mostres amb IAA 15 mM durant 5 min a 37 °C i incubant amb DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA 16 µM durant 30 min.

Un cop optimitzades les condicions de treball, es va procedir a la identificació de proteïnes diana de la JB. Com que, de la mateixa forma que la JB<sup>304</sup>, l'RBM1-126 és substrat de les CerS, com a estudi preliminar es va determinar si la CerS5 es marcava amb RBM1-126/DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA. Per això, la CerS5 es va sobreexpressar en cèl·lules A549, que es van incubar amb la sonda seguit d'irradiació i reacció *click*. L'èxit de la transfecció es va comprovar per Western Blot (**Figura 30, A**), on es va observar un increment en la banda corresponent a la CerS5 en lisats de cèl·lules transfectades respecte a les cèl·lules sense transfectar. En les anàlisis de fluorescència en gel, s'observà que la banda temptativament corresponent a la CerS5 era més intensa a les mostres d'A549 que sobreexpressaven la CerS5 i havien estat irradiades amb llum UV després de tractament amb RBM1-126 (**Figura 30, B**), en comparació amb les mostres que no havien estat irradiades o que no presentaven l'enzim sobreexpressat. Aquests resultats suggerien que la CerS5 era una diana de la JB, d'acord amb la capacitat d'aquest enzim d'acilar la sonda. No obstant, per confirmar aquesta hipòtesi, caldria aïllar la banda corresponent a la proteïna marcada (idealment en un gel 2D) i analitzar-la per espectrometria de masses.



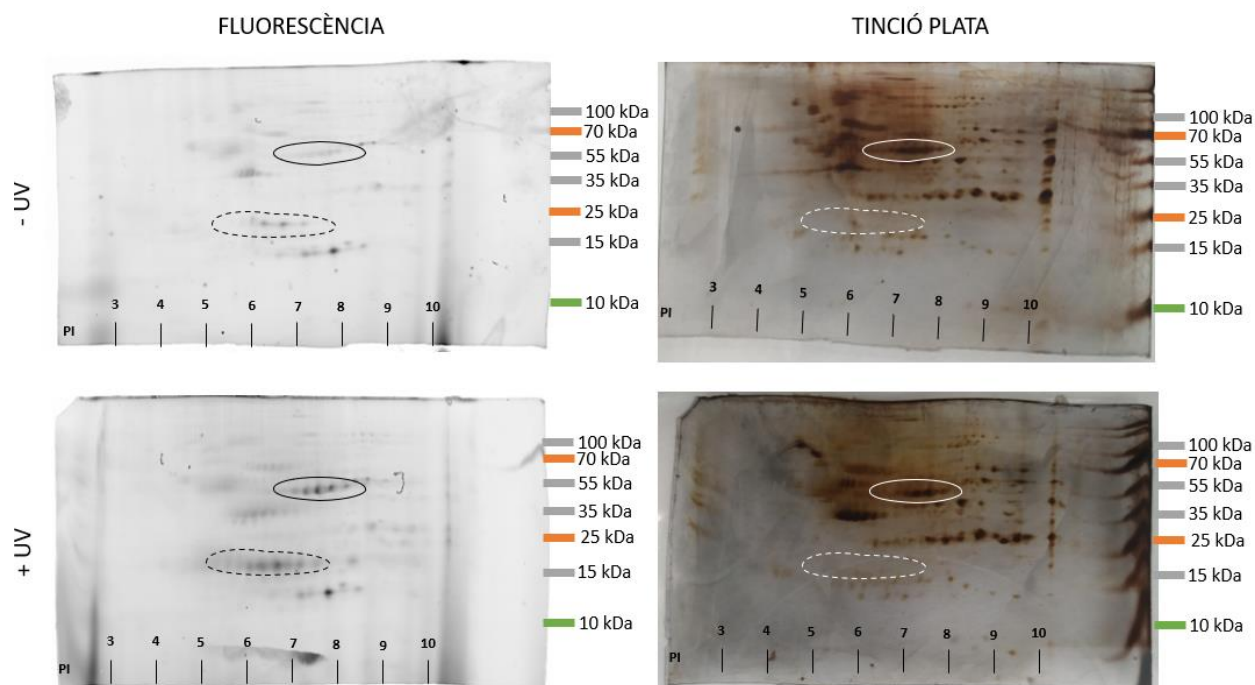
**Figura 30. Marcatge de la CerS5 amb l'RBM1-126.** Les cèl·lules A549 es van transfectar transitòriament per a sobreexpressar l'enzim CerS5 o es van tractar només amb l'agent de transfecció (control). Després, es van tractar amb RBM1-126 20 µM durant 4 h, seguidament es van exposar (o no) a llum UV (360 nm) durant 30 min, es van lisar, i les mostres es van incubar amb DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA 16 µM durant 30 min amb incubació prèvia amb IAA 15 mM durant 5 min a 37 °C. Posteriorment, les proteïnes es van separar per SDS-PAGE carregant 20 µg de proteïna/carril. **A)** Anàlisi dels nivells de la proteïna CerS5 de les quatre mostres per immunoblot. Els nivells de l'actina es van utilitzar com a control de càrrega. **B)** Imatge de fluorescència en gel. Excitació a 532 nm i emissió a 580 nm. PMT 500, resolució 100, sensibilitat de filtre normal. Resultats representatius de dos experiments independents.

Després de l'experiment preliminar de detecció de proteïnes marcades en gel d' SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*, electroforesi en gel de poliacrilamida amb dodecilsulfat sòdic) monodimensional, es va procedir a la identificació del conjunt de proteïnes marcades amb RBM1-126/DBCO-PEG<sub>4</sub>/6-TAMRA separades per electroforesi bidimensional, on la primera



dimensió correspon a la separació de proteïnes segons el punt isoelèctric i, la segona, a la separació en funció del pes molecular.

Per a identificar les proteïnes diana, es va comparar el perfil de proteïnes fluorescents en gels 2D procedents de mostres de cèl·lules exposades o no a llum UV (**Figura 31**). Es van identificar dues zones que presentaven proteïnes marcades amb més intensitat en les mostres exposades a llum UV (encerclades a les imatges de la **Figura 31**): una zona amb proteïnes d'un pes molecular d'entre 45 i 70 kDa i un pI al voltant de 6,4-8 (encerclada en línia contínua), i una altra amb proteïnes d'un pes molecular d'entre 15 i 25 kDa i un pI al voltant de 5-7 (encerclada en línia discontinua). El primer conjunt (45-70 kDa i pI 6,4-8) es detectava clarament per tinció del gel amb plata, mentre que el segon (15-25 kDa i pI 5-7), en canvi, no es va detectar per tinció amb plata, indicant concentracions molt baixes de proteïnes. És per aquest motiu que es va decidir fer l'extracció del gel i la digestió trípica de les proteïnes del primer conjunt (45-70 kDa i pI 6,4-8). L'anàlisi dels pèptids trípics segons es descriu a l'apartat de metodologia va permetre obtenir un llistat de diverses possibles proteïnes. Un cop descartades les proteïnes contaminants (queratines) i aquelles que no es detectessin en les dues mostres, es va obtenir la llista de proteïnes que es mostra a la **Taula 3**. **Error! No s'ha trobat l'origen de la referència.** La CerS5, que semblava que s'havia marcat en el gel monodimensional, no es va observar al gel 2D a la zona de pes molecular (45.750 D) i pI calculat (7,15). Això pot ser degut a la baixa expressió d'aquesta proteïna en les condicions de l'experiment, atès que en el cas del gel monodimensional es van analitzar proteïnes procedents de cèl·lules transfectades per a la sobreexpressió de la CerS5 (**Figura 31**).



**Figura 31.** Detecció de proteïnes marcades als gels. Les cèl·lules A549 es van tractar amb RBM1-126 20  $\mu$ M durant 4 h seguit d'exposició (o no) a llum UV (360 nm) durant 30 min, es van lisar, es va quantificar la proteïna de les mostres, es van tractar amb IAA 15 mM durant 5 min a 37  $^{\circ}$ C i incubar amb DBCO-PEG<sub>4</sub>5/6-TAMRA 16  $\mu$ M durant 30 min. Les electroforesis en dues dimensions es van dur a terme en un rang de pH de 3 a 10, carregant 30  $\mu$ g de proteïna/gel. Es va obtenir una imatge de fluorescència de cada gel, a excitació de 532 nm i emissió de 580 nm (PMT 500, resolució 100, sensibilitat de filtre normal), i les proteïnes es van tenyir amb plata. Els resultats són representatius de tres experiments independents.

**Taula 3.** Potencials dianes proteïques marcades per l'RBM1-126 en cèl·lules intactes.<sup>a</sup>

Accés UniProt	Descripció	Cobertura <sup>b</sup>	# Pèptids únics <sup>c</sup>	# PSMs <sup>d</sup>	Pes molecular teòric (kDa)	pl calculat
P00352	<b>Deshidrogenasa retinal 1</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH1A1 PE=1 SV=2 - [AL1A1_HUMAN]	68 67	31 30	205 223	54,8	6,73
P11413	<b>Glucosa-6-fosfat 1-deshidrogenasa</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=G6PD PE=1 SV=4 - [G6PD_HUMAN]	61 72	22 26	79 114	59,2	6,84
P78371	<b>Complex-T proteïna 1 subunitat beta</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=CCT2 PE=1 SV=4 - [TCPB_HUMAN]	54 46	23 16	58 32	57,5	6,46
P30838	<b>Aldehid deshidrogenasa, dimèrica preferent per NADP</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH3A1 PE=1 SV=3 - [AL3A1_HUMAN]	41 50	17 18	55 54	50,4	6,54
P43490	<b>Nicotinamida fosforibosiltransferasa</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=NAMPT PE=1 SV=1 - [NAMPT_HUMAN]	22 26	7 9	15 19	55,5	7,15
P49419	<b>Alfa-aminoadípnic semialdehid deshidrogenasa</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=ALDH7A1 PE=1 SV=5 - [AL7A1_HUMAN]	29 12	9 4	14 6	58,5	7,99
P12268	<b>Inosina-5'-monofosfat deshidrogenasa 2</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=IMPDH2 PE=1 SV=2 - [IMDH2_HUMAN]	14 33	5 12	7 21	55,8	6,90
P14868	<b>Aspartat-tRNA lligasa citoplasmàtica</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=DARS PE=1 SV=2 - [SYDC_HUMAN]	13 6	4 2	6 2	57,1	6,55
P28838	<b>Aminopeptidasa citosòlica</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=LAP3 PE=1 SV=3 - [AMPL_HUMAN]	7 8	3 3	4 5	56,1	7,93
POCG48	<b>Poliubiquitina-C</b> OS=Homo sapiens OX=9606 GN=UBC PE=1 SV=3 - [UBC_HUMAN]	38 38	2 2	2 2	77	7,66

<sup>a</sup>La llista correspon a les proteïnes identificades per HR-LC-MS/MS a la zona del gel encerclada en línia contínua a la Figura 31.

<sup>b</sup>Cobertura: percentatge de la seqüència de la proteïna coberta pels pèptids identificats. <sup>c</sup>Pèptids únics: nombre de seqüències peptídiques que són úniques per un grup proteic. Pèptids que són comuns en un grup proteic i que no són presents a proteïnes de cap altre grup; <sup>d</sup>PSMs (coincidències d'espectre peptídic, *Peptide Spectrum Matches*): el nombre de PSMs és el nombre total d'espectres peptídics identificats que corresponen a la proteïna. El valor de PSM pot ser major que el nombre de pèptids identificats perquè alguns pèptids poden ser identificats repetidament. Negre: valors amb mostra no irradiada amb llum UV. Gris: valors amb mostra irradiada amb llum UV.

En aquests moments, cal reproduir aquests resultats i validar aquestes proteïnes com a dianes de la JB, per després investigar quin paper juguen en la mort cel·lular per metuosi induïda per aquest lípid (vegeu discussió).

# RESUM DELS RESULTATS



Tot i que el paper que juguen les ceramidases en diferents malalties humanes ha anat guanyant interès, la recerca en aquest camp ha estat obstaculitzada per la manca de substrats i inhibidors específics per aquests enzims. S'han descrit diferents inhibidors de ceramidases<sup>148</sup>, però quasi tots van dirigits a la AC i, alguns, a la NC, però de baixa potència i sense caracteritzar-ne prou bé l'especificitat, sense arribar a tenir efectes clínics<sup>148</sup>. Per altra banda, només s'ha reportat un inhibidor per les ACER<sup>151</sup> però no s'ha identificat sobre quina ACER actua ni la seva selectivitat. Pel que fa als substrats, el nostre grup ha desenvolupat diferents substrats fluorogènics (compostos RBM14<sup>161,197</sup>) que permeten el cribratge de compostos en formats d'alt rendiment, facilitant la identificació i caracterització d'inhibidors enzimàtics. Per avaluar l'activitat AC, el substrat RBM14 més eficient és el C12<sup>161,197</sup> mentre que per avaluar les activitats NC i ACER3 és el C16<sup>441</sup>. No obstant, en el moment d'iniciar aquesta tesi, no es disposava de substrats fluorogènics per a l'ACER1 ni l'ACER2. Per aquest motiu, el primer objectiu d'aquesta tesi va ser trobar substrats i inhibidors específics de les diferents ceramidases en cèl·lules intactes.

Amb aquesta finalitat es van sintetitzar altres compostos RBM14 mitjançant l'*N*-acilació de la base lliure amb diferents àcids carboxílics seguint protocols descrits anteriorment<sup>161,441</sup>. També es van sintetitzar els compostos RBM15, amb un grup vinil entre l'aminodiol i la umbel·liferona **Error! No s'ha trobat l'origen d e la referència.**, que els feia més semblants a les Cer naturals, i se'n van optimitzar les condicions d'alliberament d'umbel·liferona.

Cap dels nous compostos RBM14 o RBM15 va resultar ser superior a l'RBM14C12 com a substrat de la AC. Per l'activitat NC, els substrats de la família RBM15 van mostrar una afinitat lleugerament inferior respecte als seus substrats corresponents de la família RBM14. En canvi, es va descobrir que l'RBM14C24:1 era lleugerament superior a la resta de substrats pel que fa a afinitat ( $K_M$ ) i eficiència ( $K_{cat}$ ) i, a més, era selectiu per l'activitat NC en lisats cel·lulars. Aquests resultats prometedors van portar a testar el substrat RBM14C24:1 en cèl·lules intactes. Es va escollir la línia cel·lular HT29 (adenocarcinoma colorectal humà), que té uns nivells basals de NC superiors als d'altres línies<sup>442</sup>. En cèl·lules intactes, però, no es va observar activitat NC en els assajos inicials, degut a la incapacitat del substrat per creuar la membrana plasmàtica. La MBCD és un sistema utilitzat per a incrementar la solubilitat de substàncies no polars com àcids grassos, lípids, vitamines i colesterol en diverses aplicacions en cultiu cel·lular<sup>443</sup> i va permetre l'ús de l'RBM14C24:1 com a substrat de la NC en cèl·lules intactes.

En un treball anterior s'havia reportat que els compostos RBM14 amb cadenes *N*-acil de llargades de C8 a C16 no eren substrats d'ACER1 i ACER2, amb una activitat moderada com a substrats d'ACER3<sup>441</sup>. Els substrats RBM14 presentats en aquest treball, amb cadenes *N*-acil més llargues, tant saturades com

insaturades, no van ser substrats de cap de les tres ACERs. Tot i així, els compostos RBM15 van resultar ser substrats d'ACER1 i ACER2, sent pràcticament inactius per ACER3, enzim pel que només l'RBM15C16 es va comportar com a substrat, tot i que en menor mesura que el seu homòleg RBM14. Així doncs, es va determinar que els compostos RBM15 amb cadenes *N*-acil llargues i insaturades (18:1 i 22:1) poden ser utilitzats com a substrat per a mesurar activitats ACER1 i ACER2.

Pel que fa a la recerca d'inhibidors, el cribratge de la primera quimioteca d'anàlegs d'1-desoxiCer (sèrie 1) no va mostrar cap compost actiu sobre la AC, determinat en lisats de cèl·lules A375 amb l'activitat AC sobreexpressada. En canvi, els compostos **8** i **20** van inhibir l'activitat NC un 50% i 70%, respectivament (substrat/inhibidor (20:1)), mesurada utilitzant l'enzim recombinant humà de la NC (rhNC). Els compostos **8** i **20** són 1-desoxiCer, i els seus anàlegs corresponents saturats no van mostrar activitat inhibidora envers la NC. Per tant, el doble enllaç a la posició C4 és necessari per la inhibició. A més, es va observar que aquests dos compostos provocaven una inhibició no competitiva, que concorda amb la configuració (2*R*, 3*R*) que presenten, diferent de la dels substrats naturals (2*S*, 3*R*). Finalment, cap dels compostos de la sèrie 1 (substrat/inhibidor (1:1)) no va inhibir l'ACER3 (activitat mesurada en lisats cel·lulars de MEF nuls per ASAH2, on l'ACER3 és l'única ACER que es detecta).

En base a l'estructura del compost **20**, un dels compostos més potents identificats com a inhibidor de la NC, es va sintetitzar una segona col·lecció d'anàlegs (sèrie 2) incloent alguns derivats més hidrofílics, per poder ser utilitzats en cèl·lules intactes. Es van testar els compostos d'aquesta sèrie 2 en les tres CDases, tal com s'havia fet per la sèrie 1. Cap dels compostos no va inhibir l'activitat AC de manera remarcable. En canvi, tots els compostos de la sèrie 2 van inhibir l'activitat NC (rhNC), tot i que cap d'ells va resultar ser més actiu que el **20**. D'altra banda, la sèrie 2 va produir compostos inhibidors de l'ACER3. Amb dos d'ells escollits com a models (**20l** i **20m**) es va demostrar que la inhibició era no competitiva.

Per a poder comparar els resultats d'inhibició de la NC, que s'havien determinat en rhNC, amb els d'inhibició de l'ACER3, que s'havien mesurat en lisats cel·lulars, es va determinar l'activitat inhibidora dels quatre compostos en lisats de cèl·lules transfectades de manera transitòria per a sobreexpressar la NC i utilitzant el substrat específic de la NC (RBM14C24:1). Sorprenentment, només els compostos **20l** i **20m** van inhibir l'activitat NC de manera dependent de concentració en lisats cel·lulars, si bé es va observar una reducció remarcable en la potència inhibidora dels compostos respecte la observada en rhNC. Aquesta diferència també es va donar amb la Ceramida-C6-Urea (D-eritro-N-(hexilcarbamoil)esfingosina), un inhibidor de la NC ja conegut<sup>444</sup>.

Seguidament, els quatre compostos es van provar en cèl·lules intactes, a fi de tenir en compte factors com la internalització i concentració en compartiments intracel·lulars, que podrien tenir un impacte en la potència inhibidora i la selectivitat. Els compostos **8** i **20** no van inhibir l'activitat AC en cèl·lules intactes (cèl·lules A375 amb activitat AC sobreexpressada), mentre que **20l** i **20m** la van inhibir molt poc ( $IC_{50} > 200 \mu M$ ). L'activitat NC, anteriorment determinada en lisats cel·lulars de la línia HT29, no es va poder mesurar en aquesta línia ja que els quatre compostos van resultar ser molt citotòxics en presència de MBCD, necessària per l'administració del substrat específic per a mesurar l'activitat NC (RBM14C24:1). Es va utilitzar, doncs, el substrat RBM14C16 i, per diferenciar les activitats NC i ACER3, es van emprar MEF nuls per ASAH2 (amb activitat ACER3) i la seva corresponent línia salvatge (amb activitats NC i ACER3). Els compostos **8** i **20** no van inhibir ni la NC ni l'ACER3, mentre que **20l** i **20m**, en canvi, van inhibir la hidròlisi del substrat RBM14C16 en les dues línies cel·lulars per igual, indicant que l'activitat dels compostos **20l** i **20m** sobre la NC és negligible i que l'activitat inhibidora observada en cèl·lules intactes es deu únicament a l'efecte inhibidor sobre l'ACER3.

Finalment, per a confirmar els efectes dels dos compostos en els nivells de ceramida intracel·lulars, es va realitzar un anàlisi dels lípids de les cèl·lules MEF nul·les per ASAH2 i A375 amb sobreexpressió de la AC tractades amb **20m** o **20l**. Després d'incubar amb els compostos (3 h d'incubació, com en els assajos d'activitat), es van extreure i analitzar els lípids de les mostres (LC/MS). En concordança amb els resultats obtinguts en els assajos fluorogènics d'activitat, en MEF nuls per ASAH2 dels dos compostos, **20m** i **20l** van provocar un increment en els nivells totals de ceramides cel·lulars. En canvi, només **20l** va conduir a un petit increment de ceramides a la línia A375.

La vacuolització citoplasmàtica és un fenomen morfològic que té lloc a cèl·lules de mamífer després de l'exposició a diferents inputs, incloent alguns compostos de baix pes molecular. La vacuolització pot ser transient o irreversible i, en aquest últim cas, produeix tipus coneguts de mort cel·lular independent de caspases com metuosi, paraptosi, oncosi o necroptosi<sup>445</sup>.

En un article previ<sup>304</sup> vam reportar que la JB induïa citotoxicitat, vacuolització citoplasmàtica i metuosi a la línia cel·lular HGC27. S'ha descrit que, en algun cas, la via de senyalització de la metuosi és a través de Ras<sup>405,428</sup>. En aquest treball es va voler determinar si la via de senyalització de la metuosi induïda per la JB era dependent de Ras, i per això es va utilitzar la línia cel·lular A549, d'adenocarcinoma pulmonar, que és mutant per K-RAS. Primerament es va comprovar que la JB provocava mort cel·lular en aquesta línia, amb una  $IC_{50}$  a 24 h de  $0,33 \mu M$ . A més, la JB induïa vacuolització, en concordança amb el que ja s'havia observat per la línia HGC27. Seguidament es va avaluar si la vacuolització era conseqüència de la inhibició



de l'enzim CerS per part de la JB. El fet que la FB1, un altre inhibidor de la CerS, no induís vacuolització, suggeria que l'efecte sobre la CerS no contribuïa a la vacuolització. Després, per a demostrar que els vacúols formats per efecte de la JB eren originats per l'augment d'activitat macropinocítica, es va determinar si es tenien amb LY<sup>405,446</sup>, obtenint-se indicis de que els vacúols tenien característiques de macropinosomes. Que la vacuolització induïda per la JB era causada per macropinocitosis es va confirmar amb l'ús d'EIPA, un inhibidor d'aquest procés<sup>19,20</sup>. La incubació de cèl·lules amb EIPA va inhibir la vacuolització induïda per JB en A549 i, a més, el tractament amb EIPA va augmentar la viabilitat en cèl·lules tractades amb JB. Aquests resultats van descartar que la JB causés mort per paraptosis<sup>368,412</sup> o oncosi<sup>376</sup>, on també es formen vacúols, però derivats de membranes del RE i mitocondri, i no incorporen LY.

Seguidament, per a investigar si la vacuolització citoplasmàtica induïda per la JB estava relacionada amb la metuosi, es van tractar cèl·lules amb JB i es va estudiar la fusió dels vacúols (tenyits amb LY) amb els lisosomes (marcats amb LT), per microscòpia confocal, i no van colocalitzar. Després, per a saber la distribució subcel·lular de la JB, es va sintetitzar i testar un anàleg fluorescent de la JB, la JB-Bodipy, que també va provocar vacuolització cel·lular, tot i ser menys tòxic que la JB natural. Es va veure, per això, que els vacúols no contenien JB-Bodipy, que localitzava en altres estructures vesiculars.

Després es va determinar si la JB causava mort cel·lular per vies diferents de la metuosi. Primer es va comprovar que el tractament de les cèl·lules amb JB no causava mort per necrosi. En segon lloc, es van obtenir indicis d'apoptosi tardana per citometria de flux en cèl·lules tractades amb JB durant 24 h, tot i que i el z-VAD no va recuperar la viabilitat cel·lular. Per tant, l'apoptosi no semblava ser la principal causa de mort cel·lular induïda per la JB en la línia A549. A part d'aquesta evidència farmacològica també es va obtenir una evidència genètica en observar-se que la resposta a la citotoxicitat de la JB era similar en el cas de MEF nuls per Bax i Bak (dues proteïnes necessàries per a l'apoptosi) i MEF de fenotip salvatge (amb capacitat d'apoptosi).

L'autofàgia és un altre tipus de mort cel·lular regulada genèticament que també s'ha descrit que té lloc en el procés de metuosi<sup>304</sup>. En el nostre model experimental, es va comprovar que la JB induïa autofàgia en cèl·lules A549, i que aquesta autofàgia ara dinàmica. Ara bé, la 3MA, que bloqueja l'autofàgia, no va recuperar la viabilitat cel·lular reduïda per tractament amb la JB, indicant que l'autofàgia tampoc no era la principal causa de mort cel·lular induïda per JB. Per a confirmar aquesta conclusió, es va determinar l'efecte de la JB sobre la viabilitat de MEF nuls per Atg5 (proteïna necessària per a la maduració dels autofagosomes) i la seva corresponent línia salvatge. Ambdues línies cel·lulars van respondre de forma

similar a la JB en termes de viabilitat. Per tant, les evidències farmacològiques i genètiques obtingudes indicaven que l'autofàgia tampoc no era la causa principal de mort cel·lular induïda per JB. Tot seguit es va comprovar, per microscòpia confocal, que els vacúols induïts per la JB no van colocalitzar amb els autofagosomes, indicant que eren estructures subcel·lulars diferents.

Finalment, es van voler esbrinar les vies de senyalització mediadores dels efectes de la JB, analitzant per Western Blot els nivells d'expressió de diferents proteïnes en cèl·lules A549 tractades a diferents temps amb JB en comparació amb el control.

Silva-Pavez i col. van descriure que el silmitasertib, que inhibeix CK2 i promou mort cel·lular per metuosi, inhibeix la via PI3K/Akt/mTOR<sup>423</sup>. Per a determinar si l'eix PI3K/Akt/mTORC1 estava implicat en la mort cel·lular induïda per la JB, es van analitzar els nivells d'expressió de les proteïnes totals i fosforilades d'Akt i S6 per Western Blot en cèl·lules A549 tractades amb JB a diferents temps i es van comparar amb els nivells en cèl·lules tractades amb el vehicle. La JB va provocar una disminució en els nivells d'expressió de pAkt i pS6 a 0,5 i 8 h de tractament, respectivament, en cèl·lules A549. Es van confirmar els resultats a la línia cel·lular HGC27, en la que també es van observar nivells disminuïts de pAkt i pS6 a 1 h de tractament amb JB. Per tant, la JB inhibia l'eix PI3K/Akt/mTORC1. Per a saber si la inhibició d'aquesta via era clau per la vacuolització cel·lular en cèl·lules A549, es van determinar els efectes de l'everolimus (inhibidor d'mTORC1), el MK-2206 (inhibidor d'Akt) i l'AZD-2014 (inhibidor d'mTORC1/2). Cap d'ells no va provocar vacuolització, tot i que els tres van inhibir mTORC. Aquests resultats indicaven que la via de senyalització PI3K/Akt/mTORC1 no estava involucrada en la inducció de vacuolització en el nostre model, tot i ser inhibida per la JB.

Per a saber si la via AMPK/mTOR estava implicada en la mort cel·lular induïda per JB, es van analitzar els nivells totals i fosforilats de la proteïna AMPK per Western Blot a la línia cel·lular A549 tractades amb JB a diferents temps. Els nivells de pAMPK van augmentar amb 1 h de tractament amb JB a les dues línies cel·lulars.

Seguint amb la línia A549, ja s'ha comentat que els nivells de pAMPK van augmentar a 1 h d'incubació amb JB mentre que mTORC1 es va inactivar a unes 8 h d'incubació (una mica abans que la inhibició de pS6). La formació de vacúols ja es va observar a 1-2 h de tractament amb JB, en les mateixes condicions. Per tant, es va investigar si l'augment d'expressió de pAMPK era clau per la vacuolització de les cèl·lules, de manera independent de l'eix PI3K/Akt/mTORC1, utilitzant la fenformina, un activador d'AMPK. Aquest compost va induir la formació de vacúols provinents de macropinocitosi de manera semblant a la JB. El

mateix resultat es va obtenir en una altra línia cel·lular (HGC27), on la fenformina va induir la formació de vacúols provinents de macropinositosis de manera semblant a la JB. Aquest resultat recolza que l'augment d'expressió de pAMPK és crucial pel procés de vacuolització induït per la JB.

# DISCUSSIÓ



Els esfingolípidis regulen diverses vies de senyalització implicades en múltiples processos fisiològics i fisiopatològics, a més de servir com a base estructural de les membranes cel·lulars, i és per això que els enzims del metabolisme dels esfingolípidis s'han convertit en dianes terapèutiques prometedores. D'entre aquests enzims destaca la CDasa, que té un paper clau en la regulació de l'homeòstasi cel·lular participant en l'equilibri entre l'espècie citotòxica Cer<sup>45</sup> i la citoprotectora i proliferativa S1P<sup>108</sup> i, per tant, contribueix substancialment a decidir el destí cel·lular.

Tot i que s'han descrit diferents mètodes per determinar l'activitat CDasa, el descobriment de nous moduladors enzimàtics a gran escala requereix l'ús de tècniques HTS. Actualment, aquestes metodologies són escasses. El nostre grup ha desenvolupat mètodes HTS per al cribratge de quimioteques que utilitzen substrats fluorogènics per a mesurar activitat CDasa<sup>161,197,441</sup>. En aquest context, en el primer capítol d'aquesta tesi es presenten nous substrats fluorogènics per a mesurar activitat CDasa<sup>447</sup>, així com inhibidors d'aquests enzims en cèl·lules intactes.

La mort cel·lular per metuosi es va descriure no fa gaire<sup>405</sup> i la informació que se'n té és relativament escassa. El nostre grup va descriure que la Jaspina B, un anàleg cíclic d'esfingosina, provocava mort cel·lular per metuosi<sup>304</sup>. Així doncs, al segon capítol d'aquesta tesi es caracteritza una mica més el tipus de mort induït per la Jaspina B i s'analitza la via de senyalització que hi està implicada.

### **Capítol 1: Nous substrats fluorogènics per les ceramidases neutra i alcalines i descobriment d'anàlegs de desoxiceramides com a inhibidors altament selectius per ACER3 en cèl·lules intactes**

Les CDases són amidohidrolases que catalitzen la hidròlisi de les Cer i les dhCer per generar So i Sa, respectivament, i un àcid gras<sup>124</sup>. L'única via per generar S1P és la fosforilació de l'So i, per tant, els seus nivells depenen de l'activitat de les CDases. Com s'ha dit més amunt, les CDases tenen un paper clau en la generació d'S1P<sup>125</sup> (citoprotectora) a partir de la Cer (citotòxica) i, per tant, són crucials en la regulació del destí cel·lular cap a supervivència o mort<sup>3,126</sup>.

Hi ha cinc CDases humanes, codificades per cinc gens diferents, que es classifiquen segons el seu pH òptim d'activitat en àcida (AC), neutra (NC) i tres alcalines (ACER1, ACER2 i ACER3). Cada una de les CDases té una especificitat de substrat, localització subcel·lular i distribució en teixits diferent a les altres.

Degut a la validació de les CDases com a dianes terapèutiques en diverses malalties, s'ha impulsat el desenvolupament de noves metodologies per mesurar la seva activitat enzimàtica. Inicialment, per a

determinar l'activitat CDasa, es van utilitzar Cer marcades radioactivament<sup>192</sup> o unides a fluoròfors<sup>191,193</sup> que, tot i tenir avantatges respecte el marcatge radioactiu, no són metodologies aplicables a aproximacions HTS, ja que requereixen separació cromatogràfica. En canvi, els substrats fluorogènics poden emprar-se per al cribratge massiu. El nostre grup va descriure una metodologia per a poder mesurar activitat CDasa que emprava els substrats fluorogènics RBM14, anàlegs cumarínics de la Cer amb diferents longituds de cadena d'*N*-acil alifàtica<sup>197</sup>. Quan aquests substrats són hidrolitzats per les diferents CDases, el grup aminodiol resultant s'oxida químicament a un aldehyd, que experimenta una  $\beta$ -eliminació espontània que condueix a l'alliberació d'umbel·liferona, una espècie fluorescent. Així, amb la mesura de la fluorescència, es pot quantificar de manera indirecta l'activitat CDasa. Inicialment, els compostos RBM14 van ser descrits com a substrats de la AC<sup>161</sup>, però es van validar més tard també per la NC i l'ACER3, tot i que no van ser substrats adequats per l'ACER1 ni l'ACER2<sup>441</sup>. Actualment, el millor substrat RBM14 descrit per la AC és l'RBM14C12<sup>161,197</sup>, i per la NC i l'ACER3 és l'RBM14C16<sup>441</sup>, tot i que no és tan eficient com ho és l'RBM14C12 per la AC.

Considerant aquests precedents i donat el continuat interès del nostre grup en el desenvolupament de substrats selectius per les diferents CDases, es va sintetitzar una nova sèrie de substrats fluorogènics derivats dels RBM14<sup>161,197,441</sup>, així com una nova família de substrats RBM15, anàloga a l'RBM14, que incorpora un grup vinil en la posició C4 de la cadena de la base esfingòide, que fa que l'estructura sigui més semblant a les Cer naturals que la família RBM14.

Tot i que la NC és selectiva per ceramides naturals de C16 i C18<sup>145</sup>, els estudis efectuats van revelar que el substrat fluorogènic RBM14C24:1 era selectiu per la NC en enzim recombinant rhNC així com en lisats cel·lulars. Com era d'esperar degut a la seva elevada hidrofobicitat, el compost RBM14C24:1 no es va poder emprar en cèl·lules intactes per manca de permeabilitat a la membrana plasmàtica. Aquest inconvenient es va solucionar utilitzant MBCD com a adjuvant. En segrestar el colesterol de les membranes, la MBCD les desestabilitza i les fa més permeables<sup>443,448</sup>, permetent l'entrada de l'RBM14C24:1. El fet que la cadena d'*N*-acil de C24:1 incrementi la selectivitat dels compostos RBM14 per la NC concorda amb les dades estructurals reportades per aquest enzim, en les que un centre actiu hidrofòbic de 20 Å de profunditat determina una major afinitat de la NC per Cer de cadenes acilades llargues<sup>176</sup>. En canvi, la cadena acilada de C24:1 és massa llarga per a incorporar-se a la cavitat de 13 Å que es troba al centre actiu de la AC<sup>449</sup>. Les ACERs no estan tan ben caracteritzades estructuralment, en part per la seva naturalesa hidrofòbica. Estudis recents, però, han descrit que l'ACER3 presenta una regió hidrofílica cap al centre del domini transmembrana 7 que podria tenir un paper en la selectivitat d'unió

de les Cer, prevenint la unió de Cer amb cadenes acil de 24 carbonis de llargària<sup>450</sup>. Això explicaria la manca d'activitat d'ACER3 sobre l'RBM14C24:1.

En la línia de trobar substrats selectius per les CDases, els compostos RBM15 es van assajar sobre les cinc CDases i es van comparar amb els seus homòlegs RBM14. Els resultats més interessants es van obtenir amb els compostos RBM15 de cadenes d'*N*-acil llargues insaturades (18:1 i 22:1), que es van comportar com a substrats d'ACER1 i ACER2, però no de la AC ni l'ACER3. Com que l'RBM15C18:1 va ser menys hidrolitzat per la NC que el derivat de C22:1, aquest compost és actualment el millor substrat fluorogènic per a mesurar les activitats ACER1 i ACER2 en formats d'alt rendiment. Aquests resultats representen una addició valuosa a la llista de substrats fluorogènics per les CDases i permeten buscar potencials inhibidors selectius per aquest grup rellevant d'amidohidrolases.

Amb l'objectiu d'identificar nous inhibidors de CDases, es van sintetitzar dues sèries d'1-desoxi(dihidro)Cer, que es van assajar sobre la AC, la NC i l'ACER3, les CDases més ubiqües i identificades com a dianes terapèutiques en càncer<sup>124</sup>. D'aquestes dues sèries, la primera inclou amides diastereomèriques d'1-desoxiSo i 1-desoxiSa amb diferents grups *N*-acil, i la segona conté anàlegs presumptament més permeables del compost més potent de la sèrie 1 (**20**). Les dues sèries, en ser 1-desoxi(dihidro)Cer, són metabòlicament estables en front d'enzims que actuen sobre el grup C1-OH per a produir SM, C1P, glicoesfingolípids o fosfats (Cer fosfat o So fosfat)<sup>451</sup>.

Algunes de les 1-desoxiceramides sintetitzades van causar inhibició no competitiva potent de la rhNC, però van perdre molta potència en lisats cel·lulars. La disminució remarcable de la potència inhibidora dels compostos sobre l'activitat NC en lisats cel·lulars en comparació amb l'enzim recombinant es va produir també amb la Ceramida-C6-Urea, un inhibidor competitiu de la NC ja descrit<sup>444</sup> i, per tant, no és un efecte exclusiu dels inhibidors no competitius que es presenten en aquest treball. La raó d'aquesta diferència de potència dels inhibidors entre l'enzim recombinant i els lisats cel·lulars podria raure en les diferències estructurals entre la rhNC comercial i l'enzim natural. Mentre que la NC és una proteïna que està unida a la membrana plasmàtica amb una única hèlix transmembrana<sup>176</sup>, a la rhNC li falta part de la seqüència N-terminal, que inclou alguns aminoàcids del domini transmembrana. La proteïna truncada és soluble en tampons aquosos i és possible que la conformació del domini d'unió de la rhNC a l'inhibidor tingui una afinitat superior pels inhibidors que no l'enzim unit a la membrana. En aquest sentit, per exemple, l'eliminació del domini d'ancoratge a la membrana de la calnexina per a crear una proteïna soluble va resultar en canvis en el perfil d'unió als substrats<sup>452</sup>. Recentment, Otsuka i col. van realitzar un cribratge d'una llibreria de compostos per a trobar inhibidors de la NC<sup>149</sup> utilitzant el substrat RBM14C16 i



NC secretada purificada de cèl·lules Sf9<sup>19</sup>. Aquesta proteïna correspon a la regió extracel·lular (residus 99-780) de la NC humana, amb una etiqueta d'hexahistidina C-terminal i un senyal secretor N-terminal. Els autors no descriuen l'activitat en lisats cel·lulars o cèl·lules intactes dels inhibidors identificats sobre la proteïna natural. Seria interessant saber si es manté l'activitat inhibidora en aquests contextos biològics ja que, en cas que es perdi potència, com ocorre amb les 1-desoxiceramides, recolzaria que la utilització de la rhNC no és adequada en programes de cribratge, doncs els resultats obtinguts no es reproduïen sobre l'enzim natural.

Algunes 1-desoxiceramides de la sèrie 2, especialment les corresponents a la família  $\omega$ -metoximetoxi, van inhibir l'ACER3 en lisats cel·lulars. La majoria tenen una configuració (2*R*,3*R*), que és diferent a la del substrat natural (2*S*,3*R*), que suggereix que els inhibidors s'uneixen a l'enzim en llocs al·lostèrics, en concordança amb els resultats de la cinètica enzimàtica obtinguts amb dos compostos model, **20l** i **20m**, que mostren un tipus d'inhibició no competitiva pel substrat.

Quan es van assajar en cèl·lules intactes emprant el substrat fluorogènic, els inhibidors **20l** i **20m** només van inhibir de manera significativa l'ACER3. D'acord amb l'activitat inhibidora observada sobre aquest enzim, **20l** i **20m** van provocar un increment de Cer sense modificar els nivells d'So. No obstant, no es va observar una acumulació selectiva de Cer de cadenes llargues i insaturades, tot i que l'ACER3 té preferència per aquest tipus de Cer<sup>145</sup>. En aquest sentit, Wang i col. van observar que la sobreexpressió d'ACER3 prevenia la síntesi de la Cer-C18:1 en hepatòcits de ratolí, mentre que la pèrdua d'ACER3 augmentava específicament les Cer de 18:1 i 20:1 sense afectar altres espècies<sup>453</sup>. En canvi, en un altre estudi que mostrava que l'ACER3 està involucrada en desordres neurodegeneratius en humans<sup>454</sup>, no es va observar acumulació específica de Cer de cadena llarga insaturada en ratolins *knockout* d'ACER3 en comparació als de fenotip salvatge. Per altra banda, tot i que **20l** i **20m** van induir una acumulació general de Cer, no es va observar la reducció en els nivells d'So esperada. S'han descrit resultats similars (increments de Cer sense disminució d'So) en hepatòcits de ratolins *knockout* per ACER3<sup>453</sup> i també en cervells de ratolins de 6 setmanes d'edat *knockout* per ACER3<sup>454</sup>. En canvi, en cervells d'animals *knockout* per ACER3 de més edat, sí que s'observà una acumulació de Cer amb reducció dels nivells d'So, indicant que l'efecte de la deleció del gen ACER3 sobre la producció d'So era dependent de l'edat. Contràriament als resultats obtinguts en aquests estudis, sí que es va veure reducció en els nivells d'So<sup>145</sup> o d'S1P<sup>455</sup> en altres models *knockout* per ACER3. Tenint tots aquests resultats en consideració, tot i que la Cer-C18:1 està clarament involucrada en algunes accions biològiques d'ACER3, els efectes de la sobreexpressió o

inhibició d'aquest enzim en les espècies de Cer i els seus productes catabòlics sembla dependre del tipus cel·lular, del tipus d'estímul i del context biològic.

Un altre resultat interessant d'aquest estudi és l'elevada citotoxicitat exhibida pels compostos **8**, **20I** i **20m** administrats en MBCD. Romiti i col. van presentar un estudi en que mostraven que el tractament de cèl·lules endotelials amb ciclodextrina millorava l'activitat NC en membranes enriquides en caveolines, indicant un paper negatiu del colesterol en la regulació de la NC<sup>456</sup>. En el nostre cas, és possible que la MBCD segregi colesterol de la membrana plasmàtica i això porti a l'activació de la NC, que en resultar inhibida pels compostos, resulti en un increment dels nivells de Cer i, en conseqüència, en la inducció de mort cel·lular. Tot i així, les anàlisis per LC/MS no van mostrar aquest increment de Cer en cèl·lules tractades amb els compostos en presència de MBCD (dades no mostrades), i això suggereix que la mort cel·lular és provocada pels compostos de manera independent al seu efecte en el metabolisme de les Cer.

La manca d'activitat inhibidora de la NC per part del compost **20** en els MEF de fenotip salvatge (WT-MEF) concorda amb la seva poca activitat en lisats cel·lulars i l'esperada baixa captació per part de la cèl·lula intacta degut a la seva elevada hidrofobicitat, que li impedeix el pas a través de la membrana plasmàtica. Tot i així, la manca d'activitat inhibidora dels compostos **8**, **20I** i **20m** no es pot explicar per una permeabilitat cel·lular pobre, ja que tots ells presenten valors de ClogP similars al de l'*N*-octanoïlesfingosina, que és permeable a la membrana cel·lular, calculats amb el mateix mètode. A més, el fet que **20I** i **20m** tinguin activitat inhibidora d'ACER3 en MEF nuls per ASAH2 (ASAH2-null MEF) confirma que tots dos compostos són permeables a la membrana plasmàtica. Així doncs, la manca d'activitat inhibidora de la NC dels compostos **8**, **20I** i **20m** en cèl·lules MEF-WT es podria explicar pel model topològic proposat per Airola i col.<sup>176</sup> per la NC de la membrana plasmàtica. Considerant aquest model, **8**, **20I** i **20m** no inhibirien l'activitat NC en cèl·lules intactes perquè el domini al·lostèric d'unió a l'inhibidor estaria incrustat a la cara externa de la membrana plasmàtica i, per tant, no seria accessible per la unió de l'inhibidor. El lloc al·lostèric d'unió esdevindria disponible amb la disrupció de la membrana plasmàtica durant la lisi cel·lular.

En les dues últimes dècades s'han identificat diversos inhibidors de CDases gràcies als esforços de nombrosos grups de recerca. Tot i així, en contrast amb els inhibidors selectius ben caracteritzats per la AC (sobretot) i la NC (en menor mesura), falten inhibidors selectius de l'ACER3. En aquest treball hem presentat el cribratge de dues sèries de desoxi(dihidro)Cer per les CDases AC, NC i ACER3, que ha resultat en el descobriment d'inhibidors altament selectius per ACER3 en cèl·lules intactes, i això obre les portes a fer futurs esforços de química mèdica amb l'objectiu de millorar-ne la potència i minimitzar-ne els efectes

sobre dianes inespecífiques. Els estudis de *docking* sobre l'estructura cristal·lina d'ACER3<sup>450</sup> haurien d'ajudar al disseny dels millors lligands pel seu futur ús en el tractament de malalties relacionades amb alteracions d'ACER3, com bloquejadors de l'enzim en cas de sobreexpressió i xaperones químiques en cas de deficiències genètiques. Els nostres resultats també constaten la importància d'abordar els programes de cribratge massiu d'inhibidors de la NC emprant lisats cel·lulars o, preferiblement, cèl·lules intactes, ja que l'ús de l'enzim recombinant proporciona resultats que no es reproduïen amb l'enzim endogen.

## Capítol 2: Vies de senyalització i proteïnes diana de la JB

Des que es va descriure la metuosi per primer cop en cèl·lules de glioblastoma després de l'expressió ectòpica de Ras activat<sup>405</sup>, s'han identificat molècules de petit pes molecular que poden induir metuosi en diverses línies cel·lulars tumorals, fins i tot en aquelles resistents a l'apoptosi. D'entre aquestes molècules, s'han explorat les indolil-piridinil-propenones en cèl·lules de glioblastoma humà<sup>421,457</sup> o el Silmitasertib en cèl·lules de càncer colorectal<sup>423</sup>, entre d'altres. Al nostre grup, els estudis s'han centrat en la JB, un esfingolípide amb capacitat d'induir vacuolització citoplasmàtica. La JB té activitat citotòxica en diverses línies cel·lulars<sup>296,304,458</sup>; intervé en el metabolisme dels SLs com a inhibidor competitiu de la CerS, comportant-se com un anàleg de l'So que és.

Tot i que s'han descrit algunes molècules de petit pes molecular capaces d'induir metuosi<sup>416,417,422,423,428,459</sup>, s'han identificat molt poques proteïnes diana dels compostos que indueixen el fenotip de metuosi. La PIKFYVE és una quinasa inhibida per indolil-piridinil-propenones<sup>421</sup> i és una de les proteïnes que, quan s'inhibeix, activa la vacuolització. Un altre cas és la inhibició de la proteïna CK2 pel silmitasertib, que també indueix metuosi<sup>423</sup>. Pel que fa a les vies de senyalització a través de les quals algunes molècules indueixen metuosi, aquestes vies no estan ben descrites, tot i que s'ha suggerit la implicació de Ras i Rac<sup>405,429</sup> i Akt i mTORC<sup>423</sup>, entre d'altres.

És important investigar mètodes per a induir mort cel·lular no apoptòtica en tumors que han desenvolupat resistència a l'apoptosi. La metuosi és un tipus emergent de mort cel·lular que mereix atenció pel disseny de teràpies antitumorals i, per tant, hi ha un elevat interès en conèixer els mecanismes moleculars involucrats, així com les dianes dels compostos que la indueixen. Per aquesta raó, un dels objectius d'aquesta tesi ha estat la caracterització del procés de mort cel·lular induït per la JB i la identificació de les vies de senyalització implicades.

La JB es un anàleg cíclic de l'So amb activitat citotòxica descrita en diferents línies cel·lulars, com ara HT29<sup>293</sup>, MCF7<sup>307</sup>, U-87<sup>304</sup>, T-98<sup>304</sup>, HEK293T<sup>304</sup>, P-388<sup>293</sup>, A-375<sup>305</sup>, KB<sup>460</sup>, Mel-28<sup>293,296</sup>, Caco-2<sup>461</sup>, Jurkat<sup>461</sup>, HCT116<sup>299,301,461,462</sup>, MDA-231<sup>295,299,304,461</sup>, MDA-468<sup>304</sup>, HeLa<sup>295,461</sup>, MGC-803<sup>307</sup>, EC-9706<sup>307</sup>, U2O2<sup>462</sup>, CNE<sup>295</sup>, WM-115<sup>305</sup>, SNU-638<sup>299</sup>, Caki-1<sup>299</sup>, PC-3<sup>299</sup> i HGC-27<sup>304</sup>. Els valors d'IC<sub>50</sub> en tots els casos es troben en rangs micromolar o inferiors. En aquest treball, la IC<sub>50</sub> de la JB en cèl·lules A549 va ésser del mateix ordre, en concordança amb altres estudis prèviament publicats<sup>297,463</sup>.

En concordança amb resultats previs<sup>464</sup>, en aquest treball es va confirmar que els vacúols induïts per la JB en cèl·lules A549 tenien característiques de macropinosomes, ja que incorporaven LY. Aquests resultats van descartar que la JB causés mort per paraptosi<sup>325,368</sup> o oncosi<sup>376</sup>, on també es formen vacúols, però són derivats de membranes del RE i els mitocondris, i no incorporen LY.

Quan la via endocítica és funcional, els vacúols que són internalitzats per macropinocitosi són reciclats a la membrana plasmàtica o bé maduren i esdevenen endosomes tardans, que s'acaben fusionant amb lisosomes<sup>465,466</sup>. En la metuosi, tot i l'augment d'activitat macropinocítica, està descrit que el procés macropinocític no és funcional i els macropinosomes naixents no es reciclen ni es fusionen amb els lisosomes, sinó que s'acumulen al citoplasma<sup>405</sup>. Els vacúols induïts per la JB en cèl·lules A549 no es van fusionar amb els lisosomes, confirmant-se que la via endocítica, en aquest cas, no era funcional, en concordança amb les característiques descrites per la metuosi<sup>405</sup>.

De manera complementària a la tinció de vacúols amb LY, es va confirmar que la vacuolització induïda per la JB era causada per macropinocitosi utilitzant l'EIPA, un inhibidor de la macropinocitosi<sup>467,468</sup> que va inhibir la vacuolització en cèl·lules A549 tractades amb JB. A més, l'EIPA va incrementar la resistència de les cèl·lules a la JB, indicant que la vacuolització per macropinocitosi estava implicada en la mort cel·lular provocada per la JB.

Per a descartar que la JB causés altres tipus de mort cel·lular, es va comprovar que la citotoxicitat causada per la JB no tingués característiques de necrosi, apoptosi o autofàgia. La JB no va causar mort per necrosi en A549, doncs el tractament amb necrostatina-1 no va recuperar la pèrdua de viabilitat cel·lular causada per la JB. Resultats similars s'havien obtingut en d'altres línies cel·lulars<sup>304,405,410,418,423,429,469</sup>. Per altra banda, la JB no va provocar característiques d'apoptosi en A549 a temps curts, però a temps llargs sí que va causar apoptosi dependent de caspases, com s'havia observat en altres línies cel·lulars tractades amb JB<sup>296,304,458</sup>. El tractament amb z-VAD no va millorar la viabilitat cel·lular, indicant que l'apoptosi no era la principal causa de mort cel·lular en cèl·lules tractades amb JB, com s'havia observat ja en cèl·lules HGC-

27<sup>304</sup>. Aquests resultats concorden amb d'altres ja publicats en que la inhibició de l'apoptosi no preven la mort cel·lular induïda per metuosi<sup>304,405,410,459,470</sup>. També es va comprovar (tant farmacològicament com genètica) que en cèl·lules A549 tractades amb JB hi havia un augment d'autofàgia que no era causa de mort cel·lular sinó que jugava un paper protector, en correlació amb altres estudis on s'ha observat el mateix efecte<sup>304,405,429,469</sup>. A més, els autofagosomes no van colocalitzar amb els vacúols, ambdós induïts per JB, indicant que eren estructures subcel·lulars diferenciades.

Tots aquests resultats suggereixen que l'activitat citotòxica de la JB té lloc per metuosi, afegint la JB a la llista d'agents inductors de metuosi prèviament reportats com MOMIPP<sup>417</sup>, silmitasertib (CX-4945)<sup>422</sup>, o l'activació del receptor de CD99 a través d'anticossos monoclonals<sup>428</sup>, que activa la GTPasa RAC1, dependent de Ras<sup>405</sup>.

El mecanisme d'acció molecular dels compostos inductors de metuosi i les vies de senyalització involucrades en el procés no estan ben definits. Tot i així, sí que s'han identificat algunes vies de senyalització per alguns agents inductors de metuosi, com les de Ras/Rac<sup>297,421,429</sup> i Akt/mTORC<sup>423</sup>. La desregulació de la macropinosi en cèl·lules tumorals sembla estar correlacionada amb RAS (oncogènic), ja que s'han identificat vies de senyalització dependents de Rac que hiperestimulen macropinosi en glioblastoma<sup>405</sup>. A més, l'activació de CD99 induïx metuosi en cèl·lules de sarcoma d'Ewing a través de senyalització IGF-1R/RAS/Rac1<sup>429</sup>. Per altra banda, el MOMIPP induïx metuosi en glioblastoma i altres línies cel·lulars a través de la via de senyalització de JNK<sup>418</sup>. La inhibició de la proteïna quinasa CK2 per part del silmitasertib promou mort cel·lular semblant a metuosi, associada a una vacuolització massiva catastròfica<sup>423</sup>. Tot i així, J. Lertsuwan i col. van comprovar que el mateix compost inhibia la proliferació cel·lular i induïa metuosi per una via independent de CK2<sup>422</sup>. Una diana coneguda de CK2 és Akt, un component de la via de senyalització de PI3K/Akt/mTORC1.

Pel que fa a les vies de senyalització afectades per la JB, la comparació de cèl·lules tractades amb JB a diferents temps amb cèl·lules sense tractar van mostrar un augment de l'expressió de pAMPK i una disminució de l'expressió de pS6 i pAkt. Resultats similars es van obtenir a la línia cel·lular HGC27, en la que els nivells d'AMPK van augmentar al cap de només 1 h d'incubació amb JB, de manera similar al temps observat en les A549, suggerint que pAMPK s'activa ràpidament per acció de la JB de manera general. En canvi, la disminució dels nivells d'expressió de pS6 es va observar a 2 h d'incubació amb JB en HGC27 i a les 8 h en A549, indicant un temps diferent d'activació de la via PI3K/Akt/mTORC1 en les diferents línies cel·lulars. Això indica que la via s'activa ràpidament a través de l'activació d'AMPK però les dues línies cel·lulars tenen diferent metabolisme i, per tant, diferent velocitat d'activació dels

components de la via de manera que S6, que es troba per sota d'AMPK, s'inhibeix a temps diferents en diferents línies cel·lulars.

Com s'acaba de comentar, els nivells de pAMPK van augmentar al cap d'1 h d'incubació amb JB, mentre que la formació de vacúols induïda per JB es va observar a 1-2 h de tractament en les mateixes condicions. En canvi, mTORC1 es va inactivar a unes 8 h d'incubació amb JB, una mica abans que la inhibició de pS6, ja que l'expressió de S6 depèn de l'expressió d'mTORC. Per tant, es va investigar si l'augment d'expressió de pAMPK era clau per la vacuolització de les cèl·lules de manera independent de l'eix PI3K/Akt/mTORC1 emprant la fenformina, un activador d'AMPK. Les tres línies cel·lulars van experimentar vacuolització provinent de macropinositosis en ser tractades amb la fenformina de manera semblant a quan eren tractades amb JB. Per tant, l'augment d'expressió de pAMPK és crucial pel procés de vacuolització induït per la JB, que té lloc de manera independent de l'eix PI3K/Akt/mTORC1. En autofàgia, la via d'mTOR s'inhibeix per a incrementar la viabilitat cel·lular<sup>471</sup>. En aquest treball s'ha demostrat que la JB activa autofàgia (augmenta els nivells d'LC3-II) en cèl·lules A549. L'activació d'aquest procés podria ser el responsable de la inhibició de la via de senyalització d'mTOR observada.

La via de senyalització d'mTOR està ben caracteritzada<sup>472</sup> i està implicada en la regulació del creixement cel·lular. Quan les cèl·lules reben factors de creixement, Akt s'activa i inhibeix l'inhibidor d'mTOR, per tant mTOR s'activa (i, en conseqüència, també s'activa S6) i activa la transcripció de gens pel creixement cel·lular. La JB jugaria un paper contrari al dels factors de creixement, implicant el creixement cel·lular per inhibició d'Akt i activació d'AMPK, dues accions que activen el repressor d'mTOR, resultant en la inhibició d'mTOR, la inhibició d'S6 i el bloqueig de la transcripció.

La JB no és el primer esfingolípide descrit com a modulador de l'eix PI3K/Akt/mTORC1. M. Kim i col van mostrar que la sobreexpressió de la CerS6 reduïa la fosforilació d'Akt, la quinasa d'S6 (S6K) i ERK, i que aquest efecte podia ser parcialment reversible mitjançant la inhibició d'mTOR<sup>473</sup>. Per tant, van demostrar que l'activitat d'mTOR pot ser regulada pel balanç de diferents espècies d'esfingolípids. La JB podria ser un altre exemple d'esfingolípide que modula aquesta via.

Com a possibles proteïnes diana de la JB es van identificar temptativament les proteïnes llistades a la **Taula 3** (pàgina 138)

La deshidrogenasa de retinal 1 és una oxidoreductasa que catalitza l'oxidació del retinaldehid a àcid retinoic i, per tant, està implicada en el metabolisme del retinol (vitamina A). L'àcid retinoic intervé en les funcions de la vitamina A, requerida pel creixement i desenvolupament dels animals cordats. Durant el

desenvolupament embrionari inicial, l'àcid retinoic és generat en una regió específica de l'embrió i actua com a molècula senyalitzadora intracel·lular que guia el desenvolupament de la part posterior de l'embrió<sup>474</sup>. Aquest paper fonamental de l'àcid retinoic en el desenvolupament embrionari és la raó del possible efecte teratogènic (malformació del fetus) dels fàrmacs retinoides, com la isotretinoïna, utilitzada pel tractament del càncer i l'acne, ja que l'activació de l'ALDH1A1 catalitza la destoxicació d'aldehids tòxics derivats de lípids i la prevenció de les seves modificacions oxidatives<sup>475</sup>.

La glucosa-6-fosfat 1-deshidrogenasa és un enzim citosòlic que catalitza el primer pas (limitant de la velocitat) de la branca oxidativa de la via de la pentosa fosfat, una alternativa a la ruta de glicòlisi. La deficiència d'aquest enzim està associada a hemòlisi, i juga un paper important en el metabolisme dels lípids. La glucosa-6-fosfat 1-deshidrogenasa és una font important de NADPH i, de fet, és essencial per la supervivència cel·lular. Està regulada per diferents senyals que afecten la transcripció, post-traduïció, localització intracel·lular i interaccions amb altres proteïnes. També s'han identificat papers patofisiològics d'aquest enzim en malalties com la diabetis, la disfunció endotelial induïda per aldosterona i càncer, entre d'altres<sup>476</sup>. En una línia cel·lular de càncer colorectal es va veure que p53 s'unia directament a la glucosa-6-fosfat 1-deshidrogenasa i en disminuïa l'activitat, possiblement a través de la disrupció de la formació del dímer/tetràmer<sup>477</sup>. Se sap, des de fa anys, que els nivells elevats de glucosa-6-fosfat 1-deshidrogenasa constitueixen un dels senyals distintius del càncer<sup>478,479</sup>. De fet, la sobreexpressió d'aquest enzim pot iniciar la transformació neoplàstica<sup>480</sup>. Tindria sentit que la JB s'unís a la glucosa-6-fosfat 1-deshidrogenasa i la inhibís. Això estaria en concordança amb els resultats observats per diversos grups, que han vist que la metuosi causa més mort cel·lular a línies cel·lulars tumorals (que generalment tenen la glucosa-6-fosfat 1-deshidrogenasa sobreexpressada<sup>478,479</sup>) que a línies cel·lulars no tumorals, en les que l'efecte de la metuosi no és tan notable<sup>304,469</sup>.

La subunitat beta de la proteïna 1 del complex-T és un component del complex-T que conté xaperones (Component of the chaperonin-containing T-complex, TRiC). El complex TRiC està format per dos anells idèntics apilats, i cada un conté vuit proteïnes diferents. Després de ser biosintetitzats, els polipèptids penetren a la cavitat central d'aquest complex i són plegats de manera dependent d'ATP. Aquest complex plega diverses proteïnes, incloent l'actina i la tubulina<sup>481</sup>, o la proteïna WRAP53/TCAB1 (regulant així el manteniment dels telòmers<sup>482</sup>). És una molècula clau durant la mitosi pel seu paper essencial en el plegament de moltes proteïnes importants per la divisió cel·lular i, per tant, està involucrada en la proliferació descontrolada de les cèl·lules<sup>483</sup>. En aquest sentit, la interacció de la JB amb la subunitat beta

de la proteïna 1 del complex-T podria impedir el correcte funcionament del complex, provocant l'aturada del cicle cel·lular i inhibint la proliferació, en concordança amb els efectes observats en la metuosi<sup>423</sup>.

L'aldehid deshidrogenasa dimèrica preferent per NADP és una aldehid deshidrogenasa de la família 3, membre A1, que oxida diversos aldehids als seus àcids corresponents. Les aldehid deshidrogenases estan involucrades en la destoxicació d'acetaldehids derivats d'alcohols i en el metabolisme dels corticoesteroides, amines, neurotransmissors, i peroxidació lipídica. L'Aldehid deshidrogenasa dimèrica preferent per NADP forma un homodímer citoplasmàtic que com a substrats oxida preferentment aldehids aromàtics de cadena mitjana o llarga a àcids grassos no tòxics<sup>484</sup>. S'expressa sobretot a la còrnia de mamífers, on és al voltant del 50% del contingut de proteïnes solubles epitelials<sup>485</sup>. Excitacions electròniques d'alquens i grups aromàtics funcionals permet a certs àcids nucleics, proteïnes, àcids grassos i molècules orgàniques absorbir radiació ultravioleta. Una exposició a radiació ultravioleta moderada oxida proteïnes específiques que actuen com a agents senyalitzadors per vies metabòliques i inflamatòries<sup>486</sup>, mentre que una exposició excessiva pot ser perjudicial pel teixit. La radiació ultravioleta pot portar a la formació d'espècies reactives d'oxigen, que estan implicades en diverses vies de degradació<sup>487</sup>. En el cas de la peroxidació lipídica, les espècies reactives d'oxigen reaccionen amb àcids grassos poliinsaturats situats a la bicapa lipídica de la membrana cel·lular per a produir radicals lipídics, que es propaguen i danyen la bicapa lipídica produint hidroperòxids lipídics. L'eventual degradació dels hidroperòxids lipídics allibera una àmplia diversitat d'aldehids que són citotòxics i genotòxics<sup>487</sup>. L'Aldehid deshidrogenasa dimèrica preferent per NADP juga un paper crític en el metabolisme d'aquests aldehids als seus corresponents àcids carboxílics a la còrnia i saliva de mamífers.

L'alfa-aminoadípic semialdehid deshidrogenasa és un enzim multifuncional involucrat en efectes protectors importants que protegeix les cèl·lules de l'estrès oxidatiu metabolitzant aldehids derivats de la peroxidació lipídica<sup>488</sup>, de manera semblant a l'aldehid deshidrogenasa dimèrica preferent per NADP. En el cas que es validin ambdues proteïnes com a dianes de la JB, s'investigarà la possibilitat de que la JB provoqui estrès oxidatiu, que resultaria en l'activació de l'aldehid deshidrogenasa dimèrica preferent per NADP i de l'alfa-aminoadípic semialdehid deshidrogenasa.

La nicotinamida fosforibosiltransferasa (NAMPT) catalitza la condensació de nicotinamida amb 5-fosforribosil-1-pirofosfat per generar el mononucleòtid de nicotinamida, un intermediari de la biosíntesi de NAD. És el component que limita la velocitat de la via de biosíntesi de NAD en mamífers<sup>489</sup>. La presència de l'anell de tetrahidrofurà a la JB li aporta una certa similitud estructural amb el 5-



fosforribosil-1-pirofosfat, per la qual cosa és possible que la JB interaccioni amb la NAMPT i altres enzims del metabolisme d'espècies de (desoxi)ribosa.

La inosina-5'-monofosfat deshidrogenasa 2 (IMPDH)<sup>491</sup> és un enzim que catalitza l'oxidació dependent de NAD d'inosina monofosfat a xantosina 5'-monofosfat, el primer pas, i limitant, de la biosíntesi *de novo* de nucleòtids de guanina a partir d'inosina monofosfat. És un regulador de la reserva de nucleòtids de guanina intracel·lulars i, per tant, és important per la síntesi d'ADN i ARN, la transducció de senyals, la transferència d'energia, la síntesi de glicoproteïnes, així com altres processos implicats en proliferació cel·lular, i per aquest motiu és una diana per alguns tractaments quimioterapèutics. També podria tenir un paper en el desenvolupament de malignitat i la progressió i creixement d'alguns tumors. En alguns casos de metuosi s'ha descrit parada de cicle cel·lular<sup>423</sup>, i la inhibició de la CerS, tant a través de FB1<sup>272</sup> com a través d'un anàleg de JB<sup>307</sup>, també s'ha correlacionat amb aturada de cicle cel·lular. Per tant, podria ser que la JB aturés el cicle cel·lular a través de la inhibició d'aquest enzim. Tal com s'ha indicat al paràgraf anterior, també en aquest cas la presència de l'anell de tetrahidrofurà a la JB li aporta una certa similitud estructural amb la inosina, essent possible, des del punt de vista estructural, que la JB interaccioni amb la IMPDH.

L'aspartat-tRNA lligasa citoplasmàtica catalitza la unió específica d'un aminoàcid al seu corresponent tRNA en una reacció amb dos passos: primer l'aminoàcid és activat per ATP per a formar AMP unit a l'aminoàcid i, després, és transferit a l'extrem acceptor del tRNA. En aquest sentit podria ser que la JB s'unís a aquesta proteïna i inhibís la síntesi proteica, reduint així la proliferació cel·lular.

L'aminopeptidasa citosòlica catalitza l'eliminació d'aminoàcids hidrofòbics N-terminals no substituïts de diversos pèptids<sup>492-494</sup>. La presència de ions  $Zn^{2+}$  és essencial per l'activitat peptidasa<sup>493</sup>, i l'associació amb altres cofactors pot modular l'especificitat pel substrat de l'enzim. Està involucrada en el metabolisme del glutatió i la degradació d'àcids mercapturs, que tenen un paper en el control de l'estat d'oxidació-reducció de la cèl·lula<sup>494</sup>.

La poliubiquitina C pot estar unida covalentment a una altra proteïna o lliure (no unida). Quan està unida de manera covalent, està conjugada per a unir-se a proteïnes a través d'un enllaç isopeptídic ja sigui com a monòmer (monoubiquitina), com a polímer unit a través de diferents residus lisina de la ubiquitina (cadena de poliubiquitina), o un polímer lineal unit a través de l'iniciador Met de la ubiquitina (cadena lineal de poliubiquitina). Les cadenes de poliubiquitina, quan s'uneixen a la proteïna diana, tenen diferents funcions depenent del residu de lisina al qual estan unides les molècules d'ubiquitina, com

poden ser reparació del DNA, degradació lisosomal, degradació proteica via proteosoma, endocitosi o respostes a dany al DNA, entre d'altres. Les cadenes lineals de poliubiquitina comporten senyalització cel·lular. Quan la poliubiquitina està en forma lliure també té diferents papers, com per exemple activador de proteïnes quinases i de diverses vies de senyalització<sup>495,496</sup>.

En aquests moments, tot i que s'han identificat de manera temptativa aquestes proteïnes com a possibles dianes de la JB i s'han esmentat algunes possibles relacions d'aquestes proteïnes amb els efectes de la JB a nivell cel·lular, l'estudi és encara molt preliminar. Abans d'iniciar estudis més profunds en aquest sentit, cal reproduir aquests resultats i validar aquestes proteïnes com a dianes de la JB, per després investigar quin paper juguen en la mort cel·lular per metuosi induïda per aquest lípid. Per això està previst, a més de repetir la mateixa estratègia de marcatge anterior, marcar els adductes d'RBM1-126-proteïna amb biotina (mitjançant reacció *click* amb DBCO-PEG<sub>12</sub>-Biotina), aïllar-los per afinitat amb estreptavidina (per exemple amb perles magnètiques recobertes amb estreptavidina) i procedir a l'anàlisi dels pèptids tríptics per espectrometria de masses.



# CONCLUSIONS



A continuació s'exposen les conclusions extretes dels estudis que s'han presentat en els dos capítols d'aquesta tesi:

## Capítol 1

### Nous substrats fluorogènics per les ceramidases neutra i alcalines

1. El compost RBM14C24:1 és un substrat específic de la NC que presenta uns valors de  $V_{\max}$  i  $K_M$  millors que els corresponents a l'RBM14C16, fins ara el substrat de referència (RBM14C24:1,  $V_{\max} = 4500 \pm 144$  nmol/(min·mg) i  $K_M = 8$   $\mu$ M; RBM14C16,  $V_{\max} = 2372 \pm 298$  nmol/(min·mg) i  $K_M = 16$   $\mu$ M).
2. Malgrat l'elevada lipofília de l'RBM14C24:1, l'ús de MBCD en permet la permeabilització a través de la membrana plasmàtica, essent possible mesurar l'activitat NC de forma específica en cèl·lules intactes.
3. Els compostos RBM15C18:1 i RBM15C22:1 són els primers substrats fluorogènics descrits de l'ACER1 i l'ACER2. Dels dos compostos, l'RBM15C18:1 és més selectiu, ja que no és substrat de la AC ni l'ACER3 i és molt poc hidrolitzat per la NC.

### Descobriments d'anàlegs de desoxiceramides com a inhibidors altament selectius de l'ACER3 en cèl·lules intactes

1. Els compostos **20l** i **20m** són inhibidors de l'ACER3 altament selectius en cèl·lules intactes. Com a tals, provoquen un increment de ceramides cel·lulars.
2. En presència de MBCD, els compostos **20l** i **20m** són molt citotòxics en cèl·lules de càncer de còlon HT29. El motiu d'aquesta citotoxicitat es desconeix i seria interessant estudiar-ne l'abast i, els mecanismes i explorar el seu interès translacional.
3. Els anàlegs de desoxiceramida **8**, **20**, **20l** i **20m** inhibeixen l'activitat de la NC recombinant humana, però perden potència en lisats cel·lulars i no són actius en cèl·lules intactes. Per tant, és aconsellable realitzar els cribratges de compostos dirigits a identificar molècules actives sobre la NC emprant lisats cel·lulars o, preferiblement, cèl·lules intactes, doncs els resultats obtinguts amb l'enzim recombinant no es reproduïen amb l'enzim endogen.

### Capítol 2

#### La JB indueix metuosi a través de l'activació d'AMPK

1. La inducció de metuosi per la JB a la línia tumoral A549, que és mutant per K-RAS, recolza que l'activació de la metuosi per la JB té lloc de manera independent de K-RAS.
2. La JB indueix necrosi, apoptosi i autofàgia a la línia cel·lular A549, però la inhibició d'aquests processos no recupera la pèrdua de viabilitat en cèl·lules A549 tractades amb JB.
3. La JB inhibeix l'eix PI3K/Akt/mTORC1 a les dues línies cel·lulars estudiades (A549 i HGC27), però la inducció de metuosi és independent de l'efecte inhibitor sobre aquesta via.
4. L'activació d'AMPK és crucial per la vacuolització per part de la JB, ja que la seva activació amb fenformina també produeix vacuolització.

# BIBLIOGRAFIA





1. Thudichum, J. L. W. A Treatise on the Chemical Constitution of Brain. *Bailliere, Tindall Cox London* (1884).
2. Futerman, A. H. & Hannun, Y. A. The complex life of simple sphingolipids. *EMBO Rep.* **5**, 777–82 (2004).
3. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Principles of bioactive lipid signalling: Lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139–150 (2008).
4. Merrill, A. H. Sphingolipid and glycosphingolipid metabolic pathways in the era of sphingolipidomics. *Chem. Rev.* **111**, 6387–6422 (2011).
5. Vesper, H. *et al.* Sphingolipids in Food and the Emerging Importance of Sphingolipids to Nutrition. *J. Nutr.* **129**, 1239–1250 (1999).
6. Merrill, A. H. De novo sphingolipid biosynthesis: A necessary, but dangerous, pathway. *J. Biol. Chem.* **277**, 25843–25846 (2002).
7. Hanada, K. Serine palmitoyltransferase, a key enzyme of sphingolipid metabolism. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1632**, 16–30 (2003).
8. Hornemann, T. *et al.* The SPTLC3 subunit of serine palmitoyltransferase generates short chain sphingoid bases. *J. Biol. Chem.* **284**, 26322–26330 (2009).
9. Zhao, L. *et al.* Elevation of 20-carbon long chain bases due to a mutation in serine palmitoyltransferase small subunit b results in neurodegeneration. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 12962–12967 (2015).
10. Muthusamy, T. *et al.* Serine restriction alters sphingolipid diversity to constrain tumour growth. *Nature* **586**, 790–795 (2020).
11. Penno, A. *et al.* Hereditary sensory neuropathy type 1 is caused by the accumulation of two neurotoxic sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **285**, 11178–11187 (2010).
12. Lone, M. A., Santos, T., Alecu, I., Silva, L. C. & Hornemann, T. 1-Deoxysphingolipids. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1864**, 512–521 (2019).
13. Zitomer, N. C. *et al.* Ceramide synthase inhibition by fumonisin B1 causes accumulation of 1-deoxysphinganine. A novel category of bioactive 1-deoxysphingoid bases and 1-

- deoxydihydroceramides biosynthesized by mammalian cell lines and animals. *J. Biol. Chem.* **284**, 4786–4795 (2009).
14. Falcone, M. & Maddocks, O. D. K. SERIneALanine Killer: SPT promiscuity inhibits tumour growth via intra-tumoral deoxysphingolipid production. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 5 1–2 (2020).
  15. Carreira, A. C. *et al.* Mammalian sphingoid bases: Biophysical, physiological and pathological properties. *Progress in Lipid Research* vol. 75 100988 (2019).
  16. Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S. & Futerman, A. H. When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *J. Biol. Chem.* **281**, 25001–25005 (2006).
  17. Rother, J., Echten, G. van, Schwarzmann, G. & Sandhoff, K. Biosynthesis of sphingolipids: Dihydroceramide and not sphinganine is desaturated by cultured cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189**, 14–20 (1992).
  18. Yamaji, T., Kumagai, K., Tomishige, N. & Hanada, K. Two sphingolipid transfer proteins, CERT and FAPP2: Their roles in sphingolipid metabolism. *IUBMB Life* **60**, 511–518 (2008).
  19. Tafesse, F. G., Ternes, P. & Holthuis, J. C. M. The multigenic sphingomyelin synthase family. *J. Biol. Chem.* **281**, 29421–29425 (2006).
  20. Pettus, B. J., Chalfant, C. E. & Hannun, Y. A. Ceramide in apoptosis: An overview and current perspectives. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1585**, 114–125 (2002).
  21. Bornancin, F. Ceramide kinase: The first decade. *Cell. Signal.* **23**, 999–1008 (2011).
  22. Samaha, D., Hamdo, H. H., Wilde, M., Prause, K. & Arenz, C. Sphingolipid-Transporting proteins as cancer therapeutic targets. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 20 1–15 (2019).
  23. Jeckel, D., Karrenbauer, A., Burger, K. N. J., Van Meer, G. & Wieland, F. Glucosylceramide is synthesized at the cytosolic surface of various Golgi subfractions. *J. Cell Biol.* **117**, 259–267 (1992).
  24. Hait, N. C., Oskeritzian, C. A., Paugh, S. W., Milstien, S. & Spiegel, S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 2016–2026 (2006).

25. Bandhuvula, P. & Saba, J. D. Sphingosine-1-phosphate lyase in immunity and cancer: silencing the siren. *Trends Mol. Med.* **13**, 210–217 (2007).
26. Marchesini, N. & Hannun, Y. A. Acid and neutral sphingomyelinases: Roles and mechanisms of regulation. *Biochem. Cell Biol.* **82**, 27–44 (2004).
27. Fabbro, D. & Grabowski, G. A. Human acid  $\beta$ -glucosidase. Use of inhibitory and activating monoclonal antibodies to investigate the enzyme's catalytic mechanism and saposin A and C binding sites. *J. Biol. Chem.* **266**, 15021–15027 (1991).
28. Sun, Y. *et al.* Systemic enzyme delivery by blood-brain barrier-penetrating SapC-DOPS nanovesicles for treatment of neuronopathic Gaucher disease. *EBioMedicine* **000**, 102735 (2020).
29. Gillard, B. K., Clement, R. G. & Marcus, D. M. Variations among cell lines in the synthesis of sphingolipids in de novo and recycling pathways. *Glycobiology* **8**, 885–890 (1998).
30. Michel, C. & Van Echten-Deckert, G. Conversion of dihydroceramide to ceramide occurs at the cytosolic face of the endoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **416**, 153–155 (1997).
31. 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.* **144**, 673–685 (1999).
32. Hanada, K. *et al.* Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**, 803–809 (2003).
33. D'Angelo, G. *et al.* Glycosphingolipid synthesis requires FAPP2 transfer of glucosylceramide. *Nature* **449**, 62–67 (2007).
34. Eckford, P. D. W. & Sharom, F. J. The reconstituted P-glycoprotein multidrug transporter is a flippase for glucosylceramide and other simple glycosphingolipids. *Biochem. J.* **389**, 517–526 (2005).
35. Lannert, H., Gorgas, K., Meißner, I., Wieland, F. T. & Jeckel, D. Functional organization of the Golgi apparatus in glycosphingolipid biosynthesis. Lactosylceramide and subsequent glycosphingolipids are formed in the lumen of the late Golgi. *J. Biol. Chem.* **273**, 2939–2946 (1998).
36. Sugiura, M. *et al.* Ceramide kinase, a novel lipid kinase: Molecular cloning and functional characterization. *J. Biol. Chem.* **277**, 23294–23300 (2002).

37. Riboni, L. *et al.* Metabolic fate of exogenous sphingosine in neuroblastoma neuro2A cells. Dose-dependence and biological effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **845**, 46–56 (1998).
38. L, C., NM, M., FA, M., RS, G. & Lang Andrew. Phospholipid interactions in rat liver nuclear matrix. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **96**, 890–898 (1980).
39. Hait, N. C. *et al.* Regulation of Histone Acetylation in the Nucleus by Sphingosine-1-Phosphate. *Science (80-. ).* **325**, 1254–1257 (2009).
40. Shimeno, H. *et al.* Fatty Acyl-CoA: Sphingosine Acyltransferase in Bovine Brain Mitochondria: Its Solubilization and Reconstitution onto the Membrane Lipid Liposomes. *Biol. Pharm. Bull.* **18**, 1335–1339 (1995).
41. Novgorodov, S. A. *et al.* Novel pathway of ceramide production in mitochondria: Thioesterase and neutral ceramidase produce ceramide from sphingosine and acyl-CoA. *J. Biol. Chem.* **286**, 25352–25362 (2011).
42. 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.* **382**, 527–533 (2004).
43. Rodriguez-Cuenca, S., Barbarroja, N. & Vidal-Puig, A. Dihydroceramide desaturase 1, the gatekeeper of ceramide induced lipotoxicity. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1851**, 40–50 (2015).
44. Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **19**, 175–191 (2018).
45. Sahar A. Saddoughi, Song, P. & Ogretmen, B. Roles of Bioactive Sphingolipids in Cancer Biology and Therapeutics. *Subcell. Biochem.* **49**, 413–440 (2008).
46. Nganga, R., Oleinik, N. & Ogretmen, B. *Mechanisms of Ceramide-Dependent Cancer Cell Death. Advances in Cancer Research* vol. 140 (Elsevier Ltd, 2018).
47. Flores-Romero, H., Ros, U. & García-Sáez, A. J. *A lipid perspective on regulated cell death. International Review of Cell and Molecular Biology* vol. 351 (Elsevier Inc., 2020).
48. Merrill, A. H., Sullards, M. C., Allegood, J. C., Kelly, S. & Wang, E. Sphingolipidomics: High-throughput, structure-specific, and quantitative analysis of sphingolipids by liquid chromatography

- tandem mass spectrometry. *Methods* **36**, 207–224 (2005).
49. Cingolani, F., Futerman, A. H. & Casas, J. Ceramide synthases in biomedical research. *Chem. Phys. Lipids* **197**, 25–32 (2016).
  50. Tidhar, R. *et al.* Eleven residues determine the acyl chain specificity of ceramide synthases. *J. Biol. Chem.* **293**, 9912–9921 (2018).
  51. Grösch, S., Schiffmann, S. & Geisslinger, G. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog. Lipid Res.* **51**, 50–62 (2012).
  52. Park, W. J. & Park, J. W. The effect of altered sphingolipid acyl chain length on various disease models. *Biol. Chem.* **396**, 693–705 (2015).
  53. Turpin-Nolan, S. M. & Brüning, J. C. The role of ceramides in metabolic disorders: when size and localization matters. *Nat. Rev. Endocrinol.* **16**, 224–233 (2020).
  54. Canals, D., Salamone, S. & Hannun, Y. A. Visualizing Bioactive Ceramides. *Chem. Phys. Lipids* **216**, 142–151 (2018).
  55. Thevissen, K., Francois, I., Winderickx, J., Pannecouque, C. & Cammue, B. Ceramide Involvement in Apoptosis and Apoptotic Diseases. *Mini-Reviews Med. Chem.* **6**, 699–709 (2006).
  56. Ogretmen, B. & Hannun, Y. A. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 604–616 (2004).
  57. Ogretmen, B. *et al.* Molecular Mechanisms of Ceramide-mediated Telomerase Inhibition in the A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line. *J. Biol. Chem.* **276**, 32506–32514 (2001).
  58. Chalfant, C. E. *et al.* 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.* **277**, 12587–12595 (2002).
  59. Dbaibo, G. S. *et al.* Retinoblastoma gene product as a downstream target for a ceramide-dependent pathway of growth arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**, 1347–1351 (1995).
  60. Lee, J. Y., Bielawska, A. E. & Obeid, L. M. Regulation of cyclin-dependent kinase 2 activity by ceramide. *Exp. Cell Res.* **261**, 303–311 (2000).
  61. Morad, S. A. F. & Cabot, M. C. Ceramide-orchestrated signalling in cancer cells. *Nat. Rev. Cancer*

- 13**, 51–65 (2012).
62. Ordoñez, R. *et al.* Ceramide metabolism regulates autophagy and apoptotic-cell death induced by melatonin in liver cancer cells. *Physiol. Behav.* **59**, 178–189 (2015).
63. Siddique, M. M., Li, Y., Chaurasia, B., Kaddai, V. A. & Summers, S. A. Dihydroceramides: From bit players to lead actors. *J. Biol. Chem.* **290**, 15371–15379 (2015).
64. Stiban, J., Fistere, D. & Colombini, M. Dihydroceramide hinders ceramide channel formation: Implications on apoptosis. *Apoptosis* **11**, 773–780 (2006).
65. Zheng, W. *et al.* 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 - Biomembr.* **1758**, 1864–1884 (2006).
66. Wigger, D., Gulbins, E., Kleuser, B. & Schumacher, F. Monitoring the Sphingolipid de novo Synthesis by Stable-Isotope Labeling and Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Front. Cell Dev. Biol.* **7**, 1–16 (2019).
67. Gagliostro, V. *et al.* Dihydroceramide delays cell cycle G1/S transition via activation of ER stress and induction of autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **44**, 2135–2143 (2012).
68. Signorelli, P. *et al.* Dihydroceramide intracellular increase in response to resveratrol treatment mediates autophagy in gastric cancer cells. *Cancer Lett.* **282**, 238–243 (2009).
69. 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.* **5**, 1–12 (2014).
70. Hernández-Tiedra, S. *et al.* Dihydroceramide accumulation mediates cytotoxic autophagy of cancer cells via autolysosome destabilization. *Autophagy* **12**, 2213–2229 (2016).
71. Casasampere, M., Ordóñez, Y. F., Casas, J. & Fabrias, G. Dihydroceramide desaturase inhibitors induce autophagy via dihydroceramide-dependent and independent mechanisms. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 264–275 (2017).
72. Kravcka, J. M. *et al.* Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *J. Biol. Chem.* **282**, 16718–16728 (2007).

73. Hail, N., Kim, H. J. & Lotan, R. Mechanisms of fenretinide-induced apoptosis. *Apoptosis* **11**, 1677–1694 (2006).
74. Uyama, R. *et al.* Establishment and characterization of eight feline mammary adenocarcinoma cell lines. *J. Vet. Med. Sci.* **67**, 1273–1276 (2005).
75. Holliday, M. W., Cox, S. B., Kang, M. H. & Maurer, B. J. C22:0- and C24:0-dihydroceramides Confer Mixed Cytotoxicity in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Lines. *PLoS One* **8**, 1–14 (2013).
76. Schiffmann, S. *et al.* The selective COX-2 inhibitor celecoxib modulates sphingolipid synthesis. *J. Lipid Res.* **50**, 32–40 (2009).
77. Andreyev, A. Y. *et al.* Subcellular organelle lipidomics in TLR-4-activated macrophages. *J. Lipid Res.* **51**, 2785–2797 (2010).
78. Cuvillier, O. & Levade, T. Enzymes of sphingosine metabolism as potential pharmacological targets for therapeutic intervention in cancer. *Pharmacol. Res.* **47**, 439–445 (2003).
79. Lépine, S. *et al.* Involvement of Sphingosine in Dexamethasone-Induced Thymocyte Apoptosis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **973**, 190–193 (2002).
80. Cuvillier, O. *et al.* Sphingosine generation, cytochrome c release, and activation of caspase-7 in doxorubicin-induced apoptosis of MCF7 breast adenocarcinoma cells. *Cell Death Differ.* **8**, 162–171 (2001).
81. Suzuki, E., Handa, K., Toledo, M. S. & Hakomori, S. Sphingosine-dependent apoptosis: A unified concept based on multiple mechanisms operating in concert. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 14788–14793 (2004).
82. Verhaegh, R., Becker, K. A., Edwards, M. J. & Gulbins, E. Sphingosine kills bacteria by binding to cardiolipin. *J. Biol. Chem.* (2020) doi:10.1074/jbc.RA119.012325.
83. Hannun, Y. A. & Bell, R. M. Regulation of protein kinase C by sphingosine and lysosphingolipids. *Clin. Chim. Acta* **185**, 333–345 (1989).
84. Smith, E. R., Jones, P. L., Boss, J. M. & Merrill, A. H. Changing J774A.1 cells to new medium perturbs multiple signaling pathways, including the modulation of protein kinase C by endogenous sphingoid bases. *J. Biol. Chem.* **272**, 5640–5646 (1997).



85. Jarvisi, W. D. *et al.* Coordinate regulation of stress-activated protein kinase and mitogen-activated protein kinase cascades in the apoptotic actions of ceramide and sphingosine. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **845**, 413 (1998).
86. Chang, H. C., Tsai, L. H., Chuang, L. Y. & Hung, W. C. Role of AKT kinase in sphingosine-induced apoptosis in human hepatoma cells. *J. Cell. Physiol.* **188**, 188–193 (2001).
87. Kågedal, K., Zhao, M., Svensson, I. & Brunk, U. T. Sphingosine-induced apoptosis is dependent on lysosomal proteases. *Biochem. J.* **359**, 335–343 (2001).
88. Ullio, C. *et al.* Sphingosine mediates TNF $\alpha$ -induced lysosomal membrane permeabilization and ensuing programmed cell death in hepatoma cells. *J. Lipid Res.* **53**, 1134–1143 (2012).
89. Hu, W. *et al.* Golgi Fragmentation Is Associated with Ceramide-induced Cellular Effects. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1555–1567 (2005).
90. Eun, H. A. & Schroeder, J. J. Sphingoid Bases and Ceramide Induce Apoptosis in HT-29 and HCT-116 Human Colon Cancer Cells. *South. Med. J.* **227**, 345–353 (2002).
91. Eun, H. A., Chang, C. C. & Schroeder, J. J. Evaluation of sphinganine and sphingosine as human breast cancer chemotherapeutic and chemopreventive agents. *Exp. Biol. Med.* **231**, 1664–1672 (2006).
92. Hung, W. C., Chang, H. C. & Chuang, L. Y. Activation of caspase-3-like proteases in apoptosis induced by sphingosine and other long-chain bases in Hep3B hepatoma cells. *Biochem. J.* **338**, 161–166 (1999).
93. Tolleson, W. H. *et al.* Fumonisin B1 induces apoptosis in cultured human keratinocytes through sphinganine accumulation and ceramide depletion. *Int. J. Oncol.* **14**, 833–843 (1999).
94. Wang, H. *et al.* N-(4-Hydroxyphenyl)retinamide increases dihydroceramide and synergizes with dimethylsphingosine to enhance cancer cell killing. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2967–2976 (2008).
95. Mao, Z. *et al.* 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 (2010).
96. Jiang, Q. *et al.* Gamma-tocotrienol induces apoptosis and autophagy in prostate cancer cells by increasing intracellular dihydrosphingosine and dihydroceramide. *Int. J. Cancer* **130**, 685–693

- (2012).
97. Chung, N., Mao, C., Heitman, J., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Phytosphingosine as a Specific Inhibitor of Growth and Nutrient Import in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 35614–35621 (2001).
  98. Liu, K., Zhang, X., Lester, R. L. & Dickson, R. C. The sphingoid long chain base phytosphingosine activates AGC-type protein kinases in *Saccharomyces cerevisiae* including Ypk1, Ypk2, and Sch9. *J. Biol. Chem.* **280**, 22679–22687 (2005).
  99. Kim, S. *et al.* Phytosphingosine stimulates the differentiation of human keratinocytes and inhibits TPA-induced inflammatory epidermal hyperplasia in hairless mouse skin. *Mol. Med.* **12**, 17–24 (2006).
  100. Nagahara, Y. *et al.* Phytosphingosine induced mitochondria-involved apoptosis. *Cancer Sci.* **96**, 83–92 (2005).
  101. Choi, S. Y., Kim, M. J., Chung, H. Y., Lee, S. J. & Jang, Y. J. Phytosphingosine in combination with TRAIL sensitizes cancer cells to TRAIL through synergistic up-regulation of DR4 and DR5. *Oncol. Rep.* **17**, 175–184 (2007).
  102. Ikeda, H. *et al.* Biological activities of novel lipid mediator sphingosine 1-phosphate in rat hepatic stellate cells. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **279**, 304–310 (2000).
  103. Augé, N. *et al.* Role of sphingosine 1-phosphate in the mitogenesis induced by oxidized low density lipoprotein in smooth muscle cells via activation of sphingomyelinase, ceramidase, and sphingosine kinase. *J. Biol. Chem.* **274**, 21533–21538 (1999).
  104. Van Brocklyn, J. R., Letterle, C. A., Snyder, P. J. & Prior, T. W. Sphingosine-1-phosphate stimulates human glioma cell proliferation through Gi-coupled receptors: Role of ERK MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase  $\beta$ . *Cancer Lett.* **181**, 195–204 (2002).
  105. Paik, J. H., Chae, S. S., Lee, M. J., Thangada, S. & Hla, T. Sphingosine 1-Phosphate-induced Endothelial Cell Migration Requires the Expression of EDG-1 and EDG-3 Receptors and Rho-dependent Activation of  $\alpha\beta3$ - and  $\beta1$ -containing Integrins. *J. Biol. Chem.* **276**, 11830–11837 (2001).
  106. Rosenfeldt, H. M. *et al.* EDG-1 links the PDGF receptor to Src and focal adhesion kinase activation

- leading to lamellipodia formation and cell migration. *FASEB J.* **15**, 2649–2659 (2001).
107. Liu, Y. *et al.* Edg-1, the G protein-coupled receptor for sphingosine-1-phosphate, is essential for vascular maturation. *J. Clin. Invest.* **106**, 951–961 (2000).
108. Takabe, K., Paugh, S. W., Milstien, S. & Spiegel, S. Inside-out signaling of sphingosine-1-phosphate: Therapeutic targets. *Pharmacol. Rev.* **60**, 181–195 (2008).
109. Lavieu, G. *et al.* Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J. Biol. Chem.* **281**, 8518–8527 (2006).
110. Taha, T. A., Argraves, K. M. & Obeid, L. M. Sphingosine-1-phosphate receptors: Receptor specificity versus functional redundancy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1682**, 48–55 (2004).
111. Chun, J., Hla, T., Lynch, K. R., Spiegel, S. & Moolenaar, W. H. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature. *Pharmacol. Rev.* **62**, 579–587 (2010).
112. Rosen, H., Gonzalez-Cabrera, P. J., Sanna, M. G. & Brown, S. Sphingosine 1-Phosphate Receptor Signaling. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 743–768 (2009).
113. Mendelson, K., Evans, T. & Hla, T. Sphingosine 1-phosphate signalling. *Development* **141**, 5–9 (2014).
114. Alvarez, S. E., Milstien, S. & Spiegel, S. Autocrine and paracrine roles of sphingosine-1-phosphate. *Trends Endocrinol. Metab.* **18**, 300–307 (2007).
115. Van Brocklyn, J. R. *et al.* Dual actions of sphingosine-1-phosphate: Extracellular through the G(i)-coupled receptor Edg-1 and intracellular to regulate proliferation and survival. *J. Cell Biol.* **142**, 229–240 (1998).
116. Xin, C. *et al.* Sphingosine 1-phosphate cross-activates the Smad signaling cascade and mimics transforming growth factor- $\beta$ -induced cell responses. *J. Biol. Chem.* **279**, 35255–35262 (2004).
117. Bu, S., Kapanadze, B., Hsu, T. & Trojanowska, M. Opposite effects of dihydrosphingosine 1-phosphate and sphingosine 1-phosphate on transforming growth factor- $\beta$ /Smad signaling are mediated through the PTEN/PPM1A-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **283**, 19593–19602 (2008).
118. Bu, S. *et al.* Dihydrosphingosine-1 phosphate has a potent anti-fibrotic effect in Scleroderma

- fibroblasts via normalization of PTEN levels. *Arthritis Rheum* **62**, 2117–2126 (2010).
119. Sugita, M., Dulaney, J. T. & Moser, H. W. Ceramidase deficiency in Farber's disease (Lipogranulomatosis). *Science (80-. )*. **178**, 1100–1102 (1972).
120. Yu, F. P. S., Amintas, S., Levade, T. & Medin, J. A. Acid ceramidase deficiency: Farber disease and SMA-PME. *Orphanet J. Rare Dis.* **13**, 1–19 (2018).
121. McGovern, M. M., Aron, A., Brodie, S. E., Desnick, R. J. & Wasserstein, M. P. Natural history of Type A Niemann-Pick disease: Possible endpoints for therapeutic trials. *Neurology* **66**, 228–232 (2006).
122. Grabowski, G. A. Gaucher disease and other storage disorders. *Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program* **2012**, 13–18 (2012).
123. Rao, R. P. *et al.* Sphingolipid Metabolic Pathway: An Overview of Major Roles Played in Human Diseases. *J. Lipids* **2013**, 1–12 (2013).
124. Coant, N., Sakamoto, W., Mao, C. & Hannun, Y. A. Ceramidases, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Adv. Biol. Regul.* **63**, 122–131 (2017).
125. Parveen, F. *et al.* Role of Ceramidases in Sphingolipid Metabolism and Human Diseases. *Cells* **8**, 1573 (2019).
126. Van Brocklyn, J. R. & Williams, J. B. 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.* **163**, 26–36 (2012).
127. Filippov, V. *et al.* Increased Ceramide in Brains with Alzheimer's and Other Neurodegenerative Diseases. *J. Alzheimer's Dis.* **29**, 537–547 (2012).
128. Das, U. N. Is There a Role for Bioactive Lipids in the Pathobiology of Diabetes Mellitus? *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 1–42 (2017).
129. Laaksonen, R. *et al.* Plasma ceramides predict cardiovascular death in patients with stable coronary artery disease and acute coronary syndromes beyond LDL-cholesterol. *Eur. Heart J.* **37**, 1967–1976 (2016).
130. Maceyka, M. & Spiegel, S. Sphingolipid metabolites in inflammatory disease. *Nature* **510**, 58–67 (2014).

131. Spiegel, S. & Milstien, S. The outs and the ins of sphingosine-1-phosphate in immunity. *Nat Rev Immunol* **11**, 403–415 (2011).
132. Ito, M., Okino, N. & Tani, M. New insight into the structure, reaction mechanism, and biological functions of neutral ceramidase. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 682–691 (2014).
133. Li, C. M. *et al.* The human acid ceramidase gene (ASAH): Structure, chromosomal location, mutation analysis, and expression. *Genomics* **62**, 223–231 (1999).
134. Kono, M. *et al.* Neutral ceramidase encoded by the Asah2 gene is essential for the intestinal degradation of sphingolipids. *J. Biol. Chem.* **281**, 7324–7331 (2006).
135. Mao, C. & Obeid, L. M. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **23**, 1–7 (2008).
136. Ferlinz, K. *et al.* Human acid ceramidase: Processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *J. Biol. Chem.* **276**, 35352–35360 (2001).
137. 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.* **278**, 10523–10530 (2003).
138. El Bawab, S. Molecular Cloning and Characterization of a Human Mitochondrial Ceramidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 21508–21513 (2000).
139. Hwang, Y. H., Tani, M., Nakagawa, T., Okino, N. & Ito, M. Subcellular localization of human neutral ceramidase expressed in HEK293 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **331**, 37–42 (2005).
140. Sakamoto, W., Coant, N., Canals, D., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. Functions of neutral ceramidase in the Golgi apparatus. *J. Lipid Res.* **59**, 2116–2125 (2018).
141. Tani, M., Igarashi, Y. & Ito, M. Involvement of neutral ceramidase in ceramide metabolism at the plasma membrane and in extracellular milieu. *J. Biol. Chem.* **280**, 36592–36600 (2005).
142. Xu, R. *et al.* Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J.* **20**, 1813–1825 (2006).

143. Sun, W. *et al.* Substrate specificity, membrane topology, and activity regulation of human alkaline ceramidase 2 (ACER2). *J. Biol. Chem.* **285**, 8995–9007 (2010).
144. Mao, C. *et al.* Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase: A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J. Biol. Chem.* **276**, 26577–26588 (2001).
145. Hu, W. *et al.* 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 (2010).
146. Tani, M. *et al.* Purification and characterization of a neutral ceramidase from mouse liver. A single protein catalyzes the reversible reaction in which ceramide is both hydrolyzed and synthesized. *J. Biol. Chem.* **275**, 3462–3468 (2000).
147. Mao, C., Xu, R., Bielawska, A. & Obeid, L. M. Cloning of an Alkaline Ceramidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**, 6876–6884 (2000).
148. Saied, E. M. & Arenz, C. Inhibitors of Ceramidases. *Chem. Phys. Lipids* **197**, 60–68 (2016).
149. Otsuka, Y. *et al.* Identification of Small-Molecule Inhibitors of Neutral Ceramidase (nCDase) via Target-Based High-Throughput Screening. *SLAS Discov.* **26**, 113–121 (2021).
150. Zhu, H. *et al.* Asah2 Represses the p53 – Hmox1 Axis to Protect Myeloid-Derived Suppressor Cells from Ferroptosis. *J. Immunol.* **206**, (2021).
151. Bielawska, A. *et al.* (1S,2R)-D-erythro-2-(N-myristoylamino)-1-phenyl-1-propanol as an inhibitor of ceramidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 12646–12654 (1996).
152. Raisova, M. *et al.* Bcl-2 overexpression prevents apoptosis induced by ceramidase inhibitors in malignant melanoma and HaCaT keratinocytes. *FEBS Lett.* **516**, 47–52 (2002).
153. Thayyullathil, F. *et al.* Caspase-3 mediated release of SAC domain containing fragment from Par-4 is necessary for the sphingosine-induced apoptosis in Jurkat cells. *J. Mol. Signal.* **8**, 1–13 (2013).
154. Shimon Gatt. Enzymatic Hydrolysis and Synthesis of Ceramides. *J. Biol. Chem.* **238**, 3131–3133 (1963).
155. Bernardo, K. *et al.* Purification, characterization, and biosynthesis of human acid ceramidase. *J. Biol. Chem.* **270**, 11098–11102 (1995).

156. Li, C.-M. *et al.* Cloning and Characterization of the Full-Length cDNA and Genomic Sequences Encoding Murine Acid Ceramidase. *Genomics* **50**, 267–274 (1998).
157. Koch, J. *et al.* Molecular cloning and characterization of a full-length complementary DNA encoding human acid ceramidase: Identification of the first molecular lesion causing farber disease. *J. Biol. Chem.* **271**, 33110–33115 (1996).
158. Shtraizent, N. *et al.* Autoproteolytic cleavage and activation of human acid ceramidase. *J. Biol. Chem.* **283**, 11253–11259 (2008).
159. He, X. *et al.* Purification and characterization of recombinant, human acid ceramidase: Catalytic reactions and interactions with acid sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **278**, 32978–32986 (2003).
160. Okino, N. *et al.* The reverse activity of human acid ceramidase. *J. Biol. Chem.* **278**, 29948–29953 (2003).
161. Bedia, C., Camacho, L., Abad, J. L., Fabrias, G. & Levade, T. A simple fluorogenic method for determination of acid ceramidase activity and diagnosis of Farber disease. *J. Lipid Res.* **51**, 3542–3547 (2010).
162. Momol, T., Ben-Yoseph, Y. & Nadler, H. L. Substrate-specificities of acid and alkaline ceramidases in fibroblasts from patients with Farber disease and controls. *Biochem. J.* **205**, 419–425 (1982).
163. Casasampere, M. *et al.* Click and count: specific detection of acid ceramidase activity in live cells. *Chem. Sci.* **11**, 13044–13051 (2020).
164. Schuchman, E. H. Acid ceramidase and the treatment of ceramide diseases: The expanding role of enzyme replacement therapy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.* **1862**, 1459–1471 (2016).
165. Chavez, J. A., Holland, W. L., Bär, J., Sandhoff, K. & Summers, S. A. Acid ceramidase overexpression prevents the inhibitory effects of saturated fatty acids on insulin signaling. *J. Biol. Chem.* **280**, 20148–20153 (2005).
166. Huang, Y. *et al.* Elevation of the level and activity of acid ceramidase in Alzheimer's disease brain. *Eur. J. Neurosci.* **20**, 3489–3497 (2004).
167. Musumarra, G., Barresi, V., Condorelli, D. F. & Scirè, S. A bioinformatic approach to the identification of candidate genes for the development of new cancer diagnostics. *Biol. Chem.* **384**, 321–327 (2003).

168. Saad, A. F. *et al.* The functional effects of acid ceramidase overexpression in prostate cancer progression and resistance to chemotherapy. *Cancer Biol. Ther.* **6**, 1455–1460 (2007).
169. Elojeimy, S. *et al.* Role of acid ceramidase in resistance to fasL: Therapeutic approaches based on acid ceramidase inhibitors and fasL gene therapy. *Mol. Ther.* **15**, 1259–1263 (2007).
170. Ordóñez, Y. F. *et al.* Activity-Based Imaging of Acid Ceramidase in Living Cells. *J. Am. Chem. Soc.* **141**, 7736–7742 (2019).
171. Nilsson, Å. The presence of sphingomyelin -and ceramide- cleaving enzymes in the small intestinal tract. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **176**, 339–347 (1969).
172. Okino, N. *et al.* Molecular cloning, sequencing, and expression of the gene encoding alkaline ceramidase from *Pseudomonas aeruginosa*. Cloning of a ceramidase homologue from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **274**, 36616–36622 (1999).
173. Tani, M. *et al.* Molecular Cloning of the Full-length cDNA Encoding Mouse Neutral Ceramidase. *J. Biol. Chem.* **275**, 11229–11234 (2000).
174. Canals, D., Perry, D. M., Jenkins, R. W. & Hannun, Y. A. Drug targeting of sphingolipid metabolism: Sphingomyelinases and ceramidases. *Br. J. Pharmacol.* **163**, 694–712 (2011).
175. Galadari, S. *et al.* Identification of a novel amidase motif in neutral ceramidase. *Biochem. J* **393**, 687–695 (2006).
176. Airola, M. V. *et al.* Structural Basis for Ceramide Recognition and Hydrolysis by Human Neutral Ceramidase. *Structure* **23**, 1482–1491 (2015).
177. El Bawab, S., Bielawska, A. & Hannun, Y. A. Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *J. Biol. Chem.* **274**, 27948–27955 (1999).
178. Choi, M. S. *et al.* Neutral ceramidase gene: Role in regulating ceramide-induced apoptosis. *Gene* **315**, 113–122 (2003).
179. Yoshimura, Y., Tani, M., Okino, N., Iida, H. & Ito, M. Molecular Cloning and Functional Analysis of Zebrafish Neutral Ceramidase\* □ *S. J. Biol. Chem.* **279**, 44012–44022 (2004).
180. Coant, N., García-Barros, M., Zhang, Q., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. AKT as a key target for growth promoting functions of neutral ceramidase in colon cancer cells HHS Public Access.



- Oncogene* **37**, 3852–3863 (2018).
181. Avramopoulos, D., Wang, R., Valle, D., Fallin, M. D. & Bassett, S. S. A novel gene derived from a segmental duplication shows perturbed expression in Alzheimer's disease. *Neurogenetics* **8**, 111–120 (2007).
182. Zhu, Q. *et al.* Chronic activation of neutral ceramidase protects  $\beta$ -cells against cytokine-induced apoptosis. *Acta Pharmacol. Sin.* **29**, 593–599 (2008).
183. Snider, A. J. *et al.* Loss of neutral ceramidase increases inflammation in a mouse model of inflammatory bowel disease. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **99**, 124–130 (2012).
184. Kalinichenko, L. S. *et al.* Neutral ceramidase is a marker for cognitive performance in rats and monkeys. *Pharmacol. Reports* (2020) doi:10.1007/s43440-020-00159-2.
185. Sun, W. *et al.* Upregulation of the Human Alkaline Ceramidase 1 and Acid Ceramidase Mediates Calcium-Induced Differentiation of Epidermal Keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* **128**, 389–397 (2008).
186. Xu, R., Sun, W., Jin, J., Obeid, L. M. & Mao, C. Role of alkaline ceramidases in the generation of sphingosine and its phosphate in erythrocytes. *FASEB J.* **24**, 2507–2515 (2010).
187. Houben, E. *et al.* Differentiation-associated expression of ceramidase isoforms in cultured keratinocytes and epidermis. *J. Lipid Res.* **47**, 1063–1070 (2006).
188. Liakath-Ali, K. *et al.* Alkaline ceramidase 1 is essential for mammalian skin homeostasis and regulating whole-body energy expenditure. *J. Pathol.* **239**, 374–383 (2016).
189. Xu, R. *et al.* Alkaline ceramidase 2 and its bioactive product sphingosine are novel regulators of the DNA damage response. *Oncotarget* **7**, 18440–18457 (2016).
190. Wertz, P. W. & Downing, D. T. Ceramidase activity in porcine epidermis. *FEBS Lett.* **268**, 110–112 (1990).
191. He, X. *et al.* A Fluorescence-Based High-Performance Liquid Chromatographic Assay to Determine Acid Ceramidase Activity. *Anal. Biochem.* **274**, 264–269 (1999).
192. Nikolova-Karakashian, M. & Merrill, A. H. Ceramidases. *Methods Enzymol.* **311**, 194–201 (2000).
193. Tani, M., Okino, N., Mitsutake, S. & Ito, M. Specific and Sensitive Assay for Alkaline and Neutral

- Ceramidases Involving C12-NBD-Ceramide1. *J. Biochem* **125**, 746–749 (1999).
194. He, X., Dagan, A., Gatt, S. & Schuchman, E. H. Simultaneous quantitative analysis of ceramide and sphingosine in mouse blood by naphthalene-2,3-dicarboxyaldehyde derivatization after hydrolysis with ceramidase. *Anal. Biochem.* **340**, 113–122 (2005).
195. Nieuwenhuizen, W. F., Van Leeuwen, S., Götz, F. & Egmond, M. R. 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 (2002).
196. Bhabak, K. P. *et al.* Development of a novel FRET probe for the real-time determination of ceramidase activity. *ChemBioChem* **14**, 1049–1052 (2013).
197. 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* **8**, 642–648 (2007).
198. Simons, K. & Toomre, D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–41 (2000).
199. Okazaki, T., Bell, R. M. & Hannun, Y. A. Sphingomyelin turnover induced by vitamin D3 in HL-60 cells. Role in cell differentiation. *J. Biol. Chem.* **264**, 19076–19080 (1989).
200. Hannun, Y. A. The sphingomyelin cycle and the second messenger function of ceramide. *J. Biol. Chem.* **269**, 3125–3128 (1994).
201. Brady, R. O., Kanfer, J. N., Mock, M. B. & Fredrickson, D. S. The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **55**, 366–369 (1966).
202. Grassmé, H. *et al.* CD95 Signaling via Ceramide-rich Membrane Rafts. *J. Biol. Chem.* **276**, 20589–20596 (2001).
203. Grassmé, H., Schwarz, H. & Gulbins, E. Molecular mechanisms of ceramide-mediated CD95 clustering. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**, 1016–1030 (2001).
204. Holopainen, J. M., Subramanian, M. & Kinnunen, P. K. J. Sphingomyelinase induces lipid microdomain formation in a fluid phosphatidylcholine/sphingomyelin membrane. *Biochemistry* **37**, 17562–17570 (1998).

205. Gulbins, E. & Grassmé, H. Ceramide and cell death receptor clustering. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1585**, 139–145 (2002).
206. Grassmé, H., Jendrossek, V., Bock, J., Riehle, A. & Gulbins, E. Ceramide-Rich Membrane Rafts Mediate CD40 Clustering. *J. Immunol.* **168**, 298–307 (2002).
207. Gulbins, E. & Kolesnick, R. Raft ceramide in molecular medicine. *Oncogene* **22**, 7070–7077 (2003).
208. Grassmé, H. *et al.* Host defense against *Pseudomonas aeruginosa* requires ceramide-rich membrane rafts. *Nat. Med.* • Vol. **9**, 322–330 (2003).
209. Schissel, S. L. *et al.* Secretory sphingomyelinase, a product of the acid sphingomyelinase gene, can hydrolyze atherogenic lipoproteins at neutral pH. Implications for atherosclerotic lesion development. *J. Biol. Chem.* **273**, 2738–2746 (1998).
210. Gorelik, A., Liu, F., Illes, K. & Nagar, B. Crystal structure of the human alkaline sphingomyelinase provides insights into substrate recognition. *J. Biol. Chem.* **292**, 7087–7094 (2017).
211. Schuchman, E. H., Levrán, O., Pereira, L. V. & Desnick, R. J. Structural organization and complete nucleotide sequence of the gene encoding human acid sphingomyelinase (SMPD1). *Genomics* **12**, 197–205 (1992).
212. Tomiuk, S., Zumbansen, M. & Stoffel, W. Characterization and subcellular localization of murine and human magnesium-dependent neutral sphingomyelinase. *J. Biol. Chem.* **275**, 5710–5717 (2000).
213. Sawai, H., Domae, N., Nagan, N. & Hannun, Y. A. Function of the cloned putative neutral sphingomyelinase as lyso- platelet activating factor-phospholipase C. *J. Biol. Chem.* **274**, 38131–38139 (1999).
214. Yabu, T., Imamura, S., Yamashita, M. & Okazaki, T. Identification of Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase 1 as a mediator of heat stress-induced ceramide generation and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **283**, 29971–29982 (2008).
215. Clarke, C. J. & Hannun, Y. A. Neutral sphingomyelinases and nSMase2: Bridging the gaps. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* **1758**, 1893–1901 (2006).
216. Karakashian, A. A., Giltiyay, N. V, Smith, G. M., Nikolova-karakashian, M. N. & Street, R. Expression of neutral sphingomyelinase-2 (NSMase-2) in primary rat hepatocytes modulates IL-β-induced JNK

- activation. *FASEB J.* **2**, 968–970 (2004).
217. Shamseddine, A. A., Airola, M. V. & Hannun, Y. A. Roles and regulation of neutral sphingomyelinase-2 in cellular and pathological processes. *Adv. Biol. Regul.* **57**, 24–41 (2015).
218. Hofmann, K., Tomiuk, S., Wolff, G. & Stoffel, W. Cloning and characterization of the mammalian brain-specific, Mg<sup>2+</sup>-dependent neutral sphingomyelinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 5895–5900 (2000).
219. Marchesini, N., Luberto, C. & Hannun, Y. A. Biochemical properties of mammalian neutral sphingomyelinase2 and its role in sphingolipid metabolism. *J. Biol. Chem.* **278**, 13775–13783 (2003).
220. Hayashi, Y., Kiyono, T., Fujita, M. & Ishibashi, M. cca1 is required for formation of growth-arrested confluent monolayer of rat 3Y1 cells. *J. Biol. Chem.* **272**, 18082–18086 (1997).
221. Clarke, C. J., Truong, T. G. & Hannun, Y. A. Role for neutral sphingomyelinase-2 in tumor necrosis factor  $\alpha$ -stimulated expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM) in lung epithelial cells: p38 MAPK is an upstream regulator of nSMase2. *J. Biol. Chem.* **282**, 1384–1396 (2007).
222. Clarke, C. J., Guthrie, J. M. & Hannun, Y. A. Regulation of Neutral Sphingomyelinase-2 (nSMase2) by Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Involves Protein Kinase C- $\delta$  in Lung Epithelial Cells. *Mol. Pharmacol.* **74**, 1022–1032 (2008).
223. Corcoran, C. A. *et al.* Neutral Sphingomyelinase-3 Is a DNA Damage and Nongenotoxic Stress-Regulated Gene That Is Deregulated in Human Malignancies. *Mol. Cancer Res.* **6**, 795–807 (2008).
224. Krut, O., Wiegmann, K., Kashkar, H., Yazdanpanah, B. & Krönke, M. Novel tumor necrosis factor-responsive mammalian neutral sphingomyelinase-3 is a C-tail-anchored protein. *J. Biol. Chem.* **281**, 13784–13793 (2006).
225. Wu, B. X., Rajagopalan, V., Roddy, P. L., Clarke, C. J. & Hannun, Y. A. Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MA-nSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J. Biol. Chem.* **285**, 17993–18002 (2010).
226. Clarke, C. J. *Neutral Sphingomyelinases in Cancer: Friend or Foe? Advances in Cancer Research* vol. 140 (Elsevier Ltd, 2018).

227. Duan, R. D. Alkaline sphingomyelinase: An old enzyme with novel implications. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1761**, 281–291 (2006).
228. Duan, R. D. *et al.* Distribution of alkaline sphingomyelinase activity in human beings and animals: Tissue and species differences. *Dig. Dis. Sci.* **41**, 1801–1806 (1996).
229. Cheng, Y., Nilsson, Å., Tömquist, E. & Duan, R. Purification, characterization, and expression of rat intestinal alkaline sphingomyelinase. *J. Lipid Res.* **43**, 316–324 (2002).
230. Wu, J., Liu, F., Nilsson, Å. & Duan, R. D. Pancreatic trypsin cleaves intestinal alkaline sphingomyelinase from mucosa and enhances the sphingomyelinase activity. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* **287**, 967–973 (2004).
231. Hertervig, E., Nilsson, Å., Nyberg, L. & Duan, R. D. Alkaline sphingomyelinase activity is decreased in human colorectal carcinoma. *Cancer* **79**, 448–453 (1997).
232. Lin, D. A. & Boyce, J. A. IL-4 Regulates MEK Expression Required for Lysophosphatidic Acid-Mediated Chemokine Generation by Human Mast Cells. *J. Immunol.* **175**, 5430–5438 (2005).
233. Wu, J. *et al.* Intestinal alkaline sphingomyelinase hydrolyses and inactivates platelet-activating factor by a phospholipase C activity. *Biochem. J.* **394**, 299–308 (2006).
234. Mullen, T. D., Hannun, Y. A. & Obeid, L. M. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem. J.* **441**, 789–802 (2012).
235. D’Mello, N. P. *et al.* Cloning and characterization of LAG1, a longevity-assurance gene in yeast. *J. Biol. Chem.* **269**, 15451–15459 (1994).
236. Jiang, J. C., Kirchman, P. A., Zagulski, M., Hunt, J. & Michal Jazwinski, S. Homologs of the yeast longevity gene LAG1 in *Caenorhabditis elegans* and human. *Genome Res.* **8**, 1259–1272 (1998).
237. Park, J.-W. & Y, C. S. R. L. J.-W. P. and. Basic Science and Drug Development. in *Handbook of experimental pharmacology* vol. 215 89–107 (2013).
238. Hirschberg, K., Rodger, J. & Futerman, A. H. The long-chain sphingoid base of sphingolipids is acylated at the cytosolic surface of the endoplasmic reticulum in rat liver. *Biochem. J.* **290**, 751–757 (1993).
239. Wang, E., Norred, W. P., Bacon, C. W., Riley, R. T. & Merrill Jr., A. H. Inhibition of Sphingolipid

- Biosynthesis by Fumonisin. Implications for diseases associated with Fusarium Moniliforme. *J. Biol. Chem.* **266**, 14486–14490 (1991).
240. Sridevi, P. *et al.* Ceramide synthase 1 is regulated by proteasomal mediated turnover. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1793**, 1218–1227 (2009).
241. Tidhar, R. *et al.* Acyl chain specificity of ceramide synthases is determined within a region of 150 residues in the tram-lag-CLN8 (TLC) domain. *J. Biol. Chem.* **287**, 3197–3206 (2012).
242. Laviad, E. L., Kellys, S., Merrill, A. H. & Futerman, A. H. Modulation of ceramide synthase activity via dimerization. *J. Biol. Chem.* **287**, 21025–21033 (2012).
243. Winter, E. & Ponting, C. P. TRAM, LAG1 and CLN8: Members of a novel family of lipid-sensing domains? *Trends Biochem. Sci.* **27**, 381–383 (2002).
244. Venkataraman, K. & Futerman, A. H. Do longevity assurance genes containing Hox domains regulate cell development via ceramide synthesis? *FEBS Lett.* **528**, 3–4 (2002).
245. Mesika, A., Ben-Dor, S., Laviad, E. L. & Futerman, A. H. A new functional motif in hox domain-containing ceramide synthases: Identification of a novel region flanking the hox and TLC domains essential for activity. *J. Biol. Chem.* **282**, 27366–27373 (2007).
246. Wegner, M. S., Schiffmann, S., Parnham, M. J., Geisslinger, G. & Grösch, S. The enigma of ceramide synthase regulation in mammalian cells. *Prog. Lipid Res.* **63**, 93–119 (2016).
247. Gault, C. R., Obeid, L. M. & Hannun, Y. A. An overview of sphingolipid metabolism: From synthesis to breakdown. *Adv. Exp. Med. Biol.* **688**, 1–23 (2010).
248. Harrer, H., Laviad, E. L., Humpf, H. U. & Futerman, A. H. Identification of N-acyl-fumonisin B1 as new cytotoxic metabolites of fumonisin mycotoxins. *Mol. Nutr. Food Res.* **57**, 516–522 (2013).
249. Kim, H. J., Qiao, Q., Toop, H. D., Morris, J. C. & Don, A. S. A fluorescent assay for ceramide synthase activity. *J. Lipid Res.* **53**, 1701–1707 (2012).
250. Lahiri, S. *et al.* Ceramide synthesis is modulated by the sphingosine analog FTY720 via a mixture of uncompetitive and noncompetitive inhibition in an acyl-CoA chain length-dependent manner. *J. Biol. Chem.* **284**, 16090–16098 (2009).
251. Laviad, E. L. *et al.* Characterization of ceramide synthase 2: Tissue distribution, substrate

- specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J. Biol. Chem.* **283**, 5677–5684 (2008).
252. Becker, I., Wang-Eckhardt, L., Yaghootfam, A., Gieselmann, V. & Eckhardt, M. Differential expression of (dihydro)ceramide synthases in mouse brain: Oligodendrocyte-specific expression of CerS2/Lass2. *Histochem. Cell Biol.* **129**, 233–241 (2008).
253. Cai, X. F., Tao, Z., Yan, Z. Q., Yang, S. L. & Gong, Y. Molecular cloning, characterisation and tissue-specific expression of human LAG3, a member of the novel Lag1 protein family. *DNA Seq. - J. DNA Seq. Mapp.* **14**, 79–86 (2003).
254. Mizutani, Y., Kihara, A. & Igarashi, Y. LASS3 (longevity assurance homologue 3) is a mainly testis-specific (dihydro)ceramide synthase with relatively broad substrate specificity. *Biochem. J.* **398**, 531–538 (2006).
255. Mizutani, Y., Kihara, A., Chiba, H., Tojo, H. & Igarashi, Y. 2-Hydroxy-ceramide synthesis by ceramide synthase family: Enzymatic basis for the preference of FA chain length. *J. Lipid Res.* **49**, 2356–2364 (2008).
256. Xu, Z., Zhou, J., McCoy, D. M. & Mallampalli, R. K. LASS5 is the predominant ceramide synthase isoform involved in de novo sphingolipid synthesis in lung epithelia. *J. Lipid Res.* **46**, 1229–1238 (2005).
257. Kirin, M. *et al.* Genome-wide association study identifies genetic risk underlying primary rhegmatogenous retinal detachment. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 3174–3185 (2013).
258. Strettoi, E. *et al.* Inhibition of ceramide biosynthesis preserves photoreceptor structure and function in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 18706–18711 (2010).
259. Chen, H. *et al.* Inhibition of de novo ceramide biosynthesis by FTY720 protects rat retina from light-induced degeneration. *J. Lipid Res.* **54**, 1616–1629 (2013).
260. Eckl, K. M. *et al.* Impaired epidermal ceramide synthesis causes autosomal recessive congenital ichthyosis and reveals the importance of ceramide acyl chain length. *J. Invest. Dermatol.* **133**, 2202–2211 (2013).
261. Radner, F. P. W. *et al.* Mutations in CERS3 Cause Autosomal Recessive Congenital Ichthyosis in Humans. *PLoS Genet.* **9**, (2013).

262. Park, J. W., Park, W. J. & Futerman, A. H. Ceramide synthases as potential targets for therapeutic intervention in human diseases. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Biol. Lipids* **1841**, 671–681 (2014).
263. Ebel, P. *et al.* Ceramide synthase 4 deficiency in mice causes lipid alterations in sebum and results in alopecia. *Biochem. J.* **461**, 147–158 (2014).
264. Peters, F. *et al.* Ceramide synthase 4 regulates stem cell homeostasis and hair follicle cycling. *J. Invest. Dermatol.* **135**, 1501–1509 (2015).
265. Turner, N. *et al.* A selective inhibitor of ceramide synthase 1 reveals a novel role in fat metabolism. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
266. Thiel, P. G., Marasas, W. F. O., Sydenham, E. W., Shephard, G. S. & Gelderblom, W. C. A. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* **117**, 3–9 (1992).
267. Mahdjoubi, C. K., Arroyo-manzanares, N. & Hamini-kadar, N. Multi-Mycotoxin Occurrence and Exposure. 1–18 (2020).
268. Liu, X., Fan, L., Yin, S., Chen, H. & Hu, H. Molecular mechanisms of fumonisin B1-induced toxicities and its applications in the mechanism-based interventions. *Toxicon* **167**, 1–5 (2019).
269. Merrill, A. H., Sullards, M. C., Wang, E., Voss, K. A. & Riley, R. T. Sphingolipid metabolism: Roles in signal transduction and disruption by fumonisins. *Environ. Health Perspect.* **109**, 283–289 (2001).
270. Riley, R. T. *et al.* Sphingolipid perturbations as mechanisms for fumonisin carcinogenesis. *Environ. Health Perspect.* **109**, 301–308 (2001).
271. Merrill, A. H., Van Echten, G., Wang, E. & Sandhoff, K. Fumonisin B1 inhibits sphingosine (sphinganine) N-acyltransferase and de novo sphingolipid biosynthesis in cultured neurons in situ. *J. Biol. Chem.* **268**, 27299–27306 (1993).
272. Ciacci-Zanella, J. R., Merrill, A. H., Wang, E. & Jones, C. Characterization of cell-cycle arrest by fumonisin B1 in CV-1 cells. *Food Chem. Toxicol.* **36**, 791–804 (1998).
273. Ciacci-Zanella, J. R. & Jones, C. Fumonisin B1, a mycotoxin contaminant of cereal grains, and inducer of apoptosis via the tumour necrosis factor pathway and caspase activation. *Food Chem. Toxicol.* **37**, 703–712 (1999).



274. Chen, J. *et al.* Transcriptome study reveals apoptosis of porcine kidney cells induced by fumonisin B1 via TNF signalling pathway. *Food Chem. Toxicol.* **139**, 111274 (2020).
275. Smith, E. R. & Merrill, A. H. Differential roles of de Novo sphingolipid biosynthesis and turnover in the 'Burst' of free sphingosine and sphinganine, and their 1-phosphates and N-Acyl-derivatives, that occurs upon changing the medium of cells in culture. *Journal of Biological Chemistry* vol. 270 18749–18758 (1995).
276. Abbas, H. K. *et al.* Fumonisin- and AAL-toxin-induced disruption of sphingolipid metabolism with accumulation of free sphingoid bases. *Plant Physiol.* **106**, 1085–1093 (1994).
277. Martín, I. *et al.* The Discovery of Australifungin, a Novel Inhibitor of Sphinganine N-Acyltransferase from *Sporormiella australis* Producing Organism, Fermentation, Isolation, and Biological Activity. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **48**, 349–356 (1995).
278. Gräler, M. H. & Goetzl, E. J. The immunosuppressant FTY720 down-regulates sphingosine 1-phosphate G-protein-coupled receptors. *FASEB J.* **18**, 551–553 (2004).
279. Hannich, J. T., Umebayashi, K. & Riezman, H. Distribution and Functions of Sterols and Sphingolipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **3**, 4762–4777 (2011).
280. Pruetz, S. T. *et al.* Biodiversity of sphingoid bases ('sphingosines') and related amino alcohols. *J. Lipid Res.* **49**, 1621–1639 (2008).
281. Bräse, S., Encinas, A., Keck, J. & Nising, C. F. Chemistry and biology of mycotoxins and related fungal metabolites. *Chem. Rev.* **109**, 3903–3990 (2009).
282. Zweerink, M. M., Edison, A. M., Wells, G. B., Pinto, W. & Lester, R. L. Characterization of a novel, potent, and specific inhibitor of serine palmitoyltransferase. *J. Biol. Chem.* **267**, 25032–25038 (1992).
283. Mandala, S. M. *et al.* Inhibition of serine palmitoyl transferase activity by lipoxamycin. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **47**, 376–379 (1994).
284. Guo, Q. *et al.* Sphingolipids are required for exocyst polarity and exocytic secretion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Biosci.* **10**, 1–11 (2020).
285. Fujita, T. *et al.* A POTENT IMMUNOSUPPRESSIVE ACTIVITY FOUND IN *Isaria sinclairii* METABOLITE. *J. Antibiot. (Tokyo)*. **47**, 208–215 (1994).

286. Chiba, K. & Adachi, K. Discovery of fingolimod, the sphingosine 1-phosphate receptor modulator and its application for the therapy of multiple sclerosis. *Future Med. Chem.* **4**, 771–781 (2012).
287. Thomas, K., Proschmann, U. & Ziemssen, T. Fingolimod hydrochloride for the treatment of relapsing remitting multiple sclerosis. *Expert Opin. Pharmacother.* **18**, 1649–1660 (2017).
288. Huwiler, A. & Zangemeister-Wittke, U. The sphingosine 1-phosphate receptor modulator fingolimod as a therapeutic agent: Recent findings and new perspectives. *Pharmacol. Ther.* **185**, 34–49 (2018).
289. Pyne, S., Bittman, R. & Pyne, N. J. SPHINGOSINE KINASE INHIBITORS AND CANCER: SEEKING THE GOLDEN SWORD OF HERCULES The role of sphingosine kinase in cancer. *Cancer Res* **71**, 6576–6582 (2011).
290. White, C., Alshaker, H., Cooper, C., Winkler, M. & Pchejetski, D. The emerging role of FTY720 (Fingolimod) in cancer treatment. *Oncotarget* **7**, 23106–23127 (2016).
291. Bandhuvula, P., Tam, Y. Y., Oskouian, B. & Saba, J. D. The immune modulator FTY720 inhibits sphingosine-1-phosphate lyase activity. *J. Biol. Chem.* **280**, 33697–33700 (2005).
292. Marasas, W. F. O. Discovery and occurrence of the fumonisins: A historical perspective. *Environ. Health Perspect.* **109**, 239–243 (2001).
293. Kuroda, I. *et al.* Pachastrissamine, a cytotoxic anhydrophytosphingosine from a marine sponge, *Pachastrissa* sp. *J. Nat. Prod.* **65**, 1505–1506 (2002).
294. Ledroit, V., Debitus, C., Lavaud, C. & Massiot, G. Jaspines A and B: Two new cytotoxic sphingosine derivatives from the marine sponge *Jaspis* sp. *Tetrahedron Lett.* **44**, 225–228 (2003).
295. Liu, J. *et al.* Stereoselective synthesis of jaspine B from d-xylose. *Carbohydr. Res.* **341**, 2653–2657 (2006).
296. Salma, Y. *et al.* The natural marine anhydrophytosphingosine, Jaspine B, induces apoptosis in melanoma cells by interfering with ceramide metabolism. *Biochem. Pharmacol.* **78**, 477–485 (2009).
297. Canals, D. *et al.* Synthesis and biological properties of Pachastrissamine (jaspine B) and diastereoisomeric jaspines. *Bioorganic Med. Chem.* **17**, 235–241 (2009).

298. Yoshimitsu, Y., Miyagaki, J., Oishi, S., Fujii, N. & Ohno, H. Synthesis of pachastrissamine (jaspine B) and its derivatives by the late-stage introduction of the C-2 alkyl side-chains using olefin cross metathesis. *Tetrahedron* **69**, 4211–4220 (2013).
299. Kwon, Y. *et al.* Synthesis and biological evaluation of carbocyclic analogues of pachastrissamine. *Mar. Drugs* **13**, 824–837 (2015).
300. Yoshimitsu, Y. *et al.* Pachastrissamine (jaspine B) and its stereoisomers inhibit sphingosine kinases and atypical protein kinase C. *Bioorganic Med. Chem.* **19**, 5402–5408 (2011).
301. Jeon, H. *et al.* Syntheses of sulfur and selenium analogues of pachastrissamine via double displacements of cyclic sulfate. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 7237–7242 (2011).
302. Ballereau, S., Andrieu-Abadie, N., Saffon, N. & Génisson, Y. Synthesis and biological evaluation of aziridine-containing analogs of phytosphingosine. *Tetrahedron* **67**, 2570–2578 (2011).
303. Salma, Y. *et al.* Single- and double-chained truncated jaspine B analogues: Asymmetric synthesis, biological evaluation and theoretical study of an unexpected 5-endo-dig process. *Tetrahedron* **67**, 4253–4262 (2011).
304. Cingolani, F. *et al.* Jaspine B induces nonapoptotic cell death in gastric cancer cells independently of its inhibition of ceramide synthase. *J. Lipid Res.* **58**, 1500–1513 (2017).
305. Rives, A., Ladeira, S., Levade, T., Andrieu-Abadie, N. & Génisson, Y. Synthesis of cytotoxic aza analogues of jaspine B. *J. Org. Chem.* **75**, 7920–7923 (2010).
306. Yoo, H., Lee, Y. S., Lee, S., Kim, S. & Kim, T. Y. Pachastrissamine from Pachastrissa sp. inhibits melanoma cell growth by dual inhibition of Cdk2 and ERK-mediated FOXO3 downregulation. *Phyther. Res.* **26**, 1927–1933 (2012).
307. Xu, J. M. *et al.* Synthesis and preliminary biological evaluation of 1,2,3-triazole-Jaspine B hybrids as potential cytotoxic agents. *Eur. J. Med. Chem.* **80**, 593–604 (2014).
308. Rozié, A. *et al.* Alkyne-Tagged Analogue of Jaspine B: New Tool for Identifying Jaspine B Mode of Action. *ChemBioChem* **19**, 2438–2442 (2018).
309. Vogt, C. Untersuchungen über die Entwicklungsgeschichte der Geburtshelferkröte (*Alytes obstetricans*). *Solothurn Jent und Gassman* **130**, 281–284 (1842).

310. Lockshin, R. A. & Williams, C. M. Programmed cell death-II. Endocrine potentiation of the breakdown of the intersegmental muscles of silkworms. *J. Insect Physiol.* **10**, 643–649 (1964).
311. Tata, J. R. Requirement for RNA and protein synthesis for induced regression of the tadpole tail in organ culture. *Dev. Biol.* **13**, 77–94 (1966).
312. Kepp, O., Galluzzi, L., Lipinski, M., Yuan, J. & Kroemer, G. Cell death assays for drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* **10**, 221–237 (2011).
313. Nikolettou, V., Markaki, M., Palikaras, K. & Tavernarakis, N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **1833**, 3448–3459 (2013).
314. Parzych, K. R. & Klionsky, D. J. An overview of autophagy: Morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants Redox Signal.* **20**, 460–473 (2014).
315. Nirmala, J. & Lopus, M. Cell death mechanisms in eukaryotes. *Cell Mol. Toxicol.* (2019).
316. Galluzzi, L. *et al.* Molecular definitions of cell death subroutines: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2012. *Nomencl. Comm. Cell Death Cell Death Differ.* **19**, 107–120 (2012).
317. Galluzzi, L. & Vitale, I. Molecular mechanisms of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2018. *Cell Death Differ.* **25**, 486–541 (2018).
318. Elmore, S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol. Pathol.* **35**, 495–516 (2007).
319. Pistritto, G., Triscioglio, D., Ceci, C., Alessia Garufi & D’Orazi, G. Apoptosis as anticancer mechanism: Function and dysfunction of its modulators and targeted therapeutic strategies. *Aging* vol. 8 603–619 (2016).
320. Saraste, A. & Pulkki, K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc. Res.* **45**, 528–537 (2000).
321. Savill, J. & Fadok, V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. *Nature* **407**, 788 (2000).
322. Galluzzi, L., Blomgren, K. & Kroemer, G. Mitochondrial membrane. *Nat. Rev. Neurosci.* **10**, 481–494 (2009).
323. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).

324. Tait, S. W. G., Ichim, G. & Green, D. R. Die another way - non-apoptotic mechanisms of cell death. *J. Cell Sci.* **127**, 2135–2144 (2014).
325. Broker, L. E., Kruyt, F. A. E. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: A review. *Clinical Cancer Research* vol. 11 3155–3162 (2005).
326. Mariño, Tg., Niso-Santano, M., Baehrecke, E. H. & Kroemer, G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Mol. Cell Biol.* **15**, 81–94 (2014).
327. Cho, Y. S. *et al.* Phosphorylation-Driven Assembly of the RIP1-RIP3 Complex Regulates Programmed Necrosis and Virus-Induced Inflammation. *Cell* **137**, 1112–1123 (2009).
328. Holler, N. *et al.* Fas triggers an alternative, caspase-8-independent cell death pathway using the kinase RIP as effector molecule. *Nat. Immunol.* **1**, 489–495 (2000).
329. Berghe, T. Vanden, Linkermann, A., Jouan-Lanhouet, S., Walczak, H. & Vandenabeele, P. Regulated necrosis: The expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15**, 135–147 (2014).
330. Edinger, A. L. & Thompson, C. B. Death by design: Apoptosis, necrosis and autophagy. *Curr. Opin. Cell Biol.* **16**, 663–669 (2004).
331. Yang, Z. & Klionsky, D. J. Eaten alive: A history of macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **12**, 814–822 (2010).
332. Galluzzi, L. *et al.* Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *EMBO J.* **34**, 856–880 (2015).
333. Proikas-Cezanne, T., Takacs, Z., Dönnès, P. & Kohlbacher, O. WIPI proteins: Essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J. Cell Sci.* **128**, 207–217 (2015).
334. Gozuacik, D. & Kimchi, A. Autophagy as a cell death and tumor suppressor mechanism. *Oncogene* **23**, 2891–2906 (2004).
335. Schneider, J. L. & Cuervo, A. M. Liver autophagy: Much more than just taking out the trash. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **11**, 187–200 (2014).
336. Maes, H., Rubio, N., Garg, A. D. & Agostinis, P. Autophagy : shaping the tumor microenvironment and therapeutic response. *Trends Mol. Med.* **19**, 428–446 (2013).

- 
337. Lamb, C. A., Yoshimori, T. & Tooze, S. A. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**, 759–774 (2013).
338. Axe, E. L. *et al.* Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **182**, 685–701 (2008).
339. Matsunaga, K. *et al.* Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J. Cell Biol.* **190**, 511–521 (2010).
340. Rawat Slobodkin, M. & Elazar, Z. The Atg8 family: Multifunctional ubiquitin-like key regulators of autophagy. *Essays Biochem.* **55**, 51–64 (2013).
341. Schaaf, M. B. E., Keulers, T. G., Vooijs, M. A. & Rouschop, K. M. A. LC3 / GABARAP family proteins : autophagy- ( un ) related functions. *FASEB J.* **30**, 3961–3978 (2016).
342. Fujita, N. *et al.* An Atg4B Mutant Hampers the Lipidation of LC3 Paralogues and Causes Defects in Autophagosome Closure. **19**, 4651–4659 (2008).
343. Weidberg, H. *et al.* LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Dev. Cell* **20**, 444–454 (2011).
344. Reggiori, F. & Ungermann, C. Autophagosome Maturation and Fusion. *J. Mol. Biol.* **429**, 486–496 (2017).
345. Ganley, I. G. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem.* **55**, 65–78 (2013).
346. Nakamura, S. & Yoshimori, T. New insights into autophagosome – lysosome fusion. *J. Cell Sci.* **130**, 1209–1216 (2017).
347. Bedia, C., Levade, T., Codogno, P., Châtenay-malabry, U. & Paris-sud, U. Regulation of Autophagy by Sphingolipids. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **11**, 844–853 (2011).
348. González, A. & Hall, M. N. Nutrient sensing and TOR signaling in yeast and mammals. *EMBO J.* **36**, 397–408 (2017).
349. Saxton, R. A. & Sabatini, D. M. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* **168**, 960–976 (2018).
350. Alers, S. & Wesselborg, S. Role of AMPK-mTOR-Ulk1 / 2 in the Regulation of Autophagy : Cross.

- Mol. Cell. Biol.* **32**, 2–11 (2012).
351. Mihaylova, M. M. & Shaw, R. J. The AMP-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway coordinates cell growth, autophagy, & metabolism. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1016–1023 (2011).
352. Huang, T. *et al.* Autophagy and hallmarks of cancer. *Crit. Rev. Oncog.* **23**, 247–267 (2018).
353. Ma, Y., Galluzzi, L., Zitvogel, L. & Kroemer, G. Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* **39**, 211–227 (2013).
354. Muzes, G. & Sipos, F. Anti-tumor immunity, autophagy and chemotherapy. *World J. Gastroenterol.* **18**, 6537–6540 (2012).
355. Juliet Goldsmith, Levine, B. & Debnath, J. Autophagy and Cancer Metabolism. *Methods Enzymol.* **542**, 25–57 (2014).
356. Zhang, X., Chen, L. X., Ouyang, L., Cheng, Y. & Liu, B. Plant natural compounds: Targeting pathways of autophagy as anti-cancer therapeutic agents. *Cell Prolif.* **45**, 466–476 (2012).
357. Brech, A., Ahlquist, T., Lothe, R. A. & Stenmark, H. Autophagy in tumour suppression and promotion. *Mol. Oncol.* **3**, 366–375 (2009).
358. Yang, Z. J., Chee, C. E., Huang, S. & Sinicrope, F. A. The role of autophagy in cancer: Therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* **10**, 1533–1541 (2011).
359. Zhang, J. *et al.* Mechanisms of autophagy and relevant small-molecule compounds for targeted cancer therapy. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1803–1826 (2018).
360. Simpson, C. D., Anyiwe, K. & Schimmer, A. D. Anoikis resistance and tumor metastasis. *Cancer Lett.* **272**, 177–185 (2008).
361. Chiarugi, P. & Giannoni, E. Anoikis: A necessary death program for anchorage-dependent cells. *Biochem. Pharmacol.* **76**, 1352–1364 (2008).
362. Tajbakhsh, A., Rivandi, M., Abedini, S., Pasdar, A. & Sahebkar, A. Regulators and mechanisms of anoikis in triple-negative breast cancer (TNBC): A review. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **140**, 17–27 (2019).
363. Ashrafizadeh, M. *et al.* Autophagy, anoikis, ferroptosis, necroptosis, and endoplasmic reticulum stress: Potential applications in melanoma therapy. *J. Cell. Physiol.* **234**, 19471–19479 (2019).

- 
364. Reginato, M. J. *et al.* Integrins and EGFR coordinately regulate the pro-apoptotic protein Bim to prevent anoikis. *Nat. Cell Biol.* **5**, 733–740 (2003).
365. Vakifahmetoglu, H. *et al.* DNA damage induces two distinct modes of cell death in ovarian carcinomas. *Cell Death Differ.* **15**, 555–566 (2008).
366. Sedic, M. *et al.* Differential antiproliferative mechanisms of novel derivative of benzimidazo[1,2- $\alpha$ ]quinoline in colon cancer cells depending on their p53 status. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 2121–2132 (2008).
367. Kessel, D. Apoptosis, Paraptosis and Autophagy: Death and Survival Pathways Associated with Photodynamic Therapy. *Photochem. Photobiol.* **95**, 119–125 (2019).
368. Sperandio, S., De Belle, I. & Bredesen, D. E. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 14376–14381 (2000).
369. David, K. K., Andrabi, S. A., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Parthanatos, A messenger of death. *Front. Biosci.* **14**, 1116–1128 (2009).
370. Tang, D., Kang, R., Berghe, T. Vanden, Vandenabeele, P. & Kroemer, G. The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Res.* **29**, 347–364 (2019).
371. Virág, L., Salzman, A. L. & Szabó, C. Poly(ADP-ribose) synthetase activation mediates mitochondrial injury during oxidant-induced cell death. *J. Immunol.* **161**, 3753–9 (1998).
372. Andrabi, S. A., Dawson, T. M. & Dawson, V. L. Mitochondrial and nuclear cross talk in cell death: Parthanatos. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1147**, 233–241 (2008).
373. Gao, J. & Hamann, M. T. Chemistry and Biology of Kahalalides. *Chem. Rev.* **111**, 3208–3235 (2011).
374. Suárez, Y. *et al.* Kahalalide F, a new marine-derived compound, induces oncosis in human prostate and breast cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **2**, 863–872 (2003).
375. Shilabin, A. G., Kasanah, N., Wedge, D. E. & Hamann, M. T. Lysosome and HER3 (ErbB3) Selective Anticancer Agent Kahalalide F: Semisynthetic Modifications and Antifungal Lead- Exploration Studies. *J. Med. Chem.* **50**, 4340–4350 (2007).
376. Weerasinghe, P. & Buja, L. M. Oncosis: An important non-apoptotic mode of cell death. *Exp. Mol. Pathol.* **93**, 302–308 (2012).



377. Trump, B. E., Berezsky, I. K., Seung, H. & Phelps, P. C. The Pathways of Cell Death: Oncosis, Apoptosis, and Necrosis. *Toxicol. Pathol.* **25**, 82–88 (1997).
378. Kreuzaler, P. & Watson, C. J. Killing a cancer: What are the alternatives? *Nat. Rev. Cancer* **12**, 411–424 (2012).
379. Salazar, R. *et al.* Phase I study of weekly kahalalide F as prolonged infusion in patients with advanced solid tumors. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72**, 75–83 (2013).
380. Krishna, S. & Overholtzer, M. Mechanisms and consequences of entosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2379–2386 (2016).
381. Florey, O., Kim, S. E. & Overholtzer, M. Entosis: Cell-in-Cell Formation that Kills Through Entotic Cell Death. *Curr. Mol. Med.* **15**, 861–866 (2015).
382. Pérez, E. & Bergmann, A. Intercellular cannibalism fuels tumor growth. *Cell Death Differ.* **24**, 759–760 (2017).
383. Overholtzer, M. *et al.* A Nonapoptotic Cell Death Process, Entosis, that Occurs by Cell-in-Cell Invasion. *Cell* **131**, 966–979 (2007).
384. Mason, J. A., Hagel, K. R., Hawk, M. A. & Schafer, Z. T. Metabolism during ECM Detachment: Achilles Heel of Cancer Cells? *Trends in Cancer* **3**, 475–481 (2017).
385. Krishna, S. *et al.* PIKfyve regulates vacuole maturation and nutrient recovery following engulfment. *Dev. Cell* **38**, 536–547 (2016).
386. Jorgensen, I. & Miao, E. A. Pyroptotic cell death defends against intracellular pathogens. *Immunol. Rev.* **265**, 130–142 (2015).
387. Shi, J., Gao, W. & Shao, F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends Biochem. Sci.* **42**, 245–254 (2017).
388. Lamkanfi, M. Emerging inflammasome effector mechanisms. *Nat. Rev. Immunol.* **11**, 213–220 (2011).
389. Brinkmann, V. & Zychlinsky, A. Neutrophil extracellular traps: Is immunity the second function of chromatin? *J. Cell Biol.* **198**, 773–783 (2012).
390. Remijne, Q. *et al.* Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death

- modality. *Cell Death Differ.* **18**, 581–588 (2011).
391. Abi Abdallah, D. S. & Denkers, E. Y. Neutrophils cast extracellular traps in response to protozoan parasites. *Front. Immunol.* **3**, 1–6 (2012).
392. Dixon, S. J. *et al.* Ferroptosis: An iron-dependent form of nonapoptotic cell death. *Cell* **149**, 1060–1072 (2012).
393. Dolma, S., Lessnick, S. L., Hahn, W. C. & Stockwell, B. R. Identification of genotype-selective antitumor agents using synthetic lethal chemical screening in engineered human tumor cells. *Cancer Cell* **3**, 285–296 (2003).
394. Mou, Y. *et al.* Ferroptosis, a new form of cell death: Opportunities and challenges in cancer. *J. Hematol. Oncol.* **12**, 1–16 (2019).
395. Han, C. *et al.* Ferroptosis and Its Potential Role in Human Diseases. *Front. Pharmacol.* **11**, 239–258 (2020).
396. Xie, Y. *et al.* Ferroptosis: Process and function. *Cell Death Differ.* **23**, 369–379 (2016).
397. Yu, H., Guo, P., Xie, X., Wang, Y. & Chen, G. Ferroptosis, a new form of cell death, and its relationships with tumorous diseases. *J. Cell. Mol. Med.* **21**, 648–657 (2017).
398. Latunde-Dada, G. O. Ferroptosis: Role of lipid peroxidation, iron and ferritinophagy. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1861**, 1893–1900 (2017).
399. Cao, J. Y. & Dixon, S. J. Mechanisms of ferroptosis. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 2195–2209 (2016).
400. WS, Y. & Stockwell Brent R. Synthetic lethal screening identifies compounds activating iron-dependent, nonapoptotic cell death in oncogenic-RAS-harboring cancer cells. *Chem. Biol.* **15**, 234–245 (2008).
401. Land, W. G. Regulated Cell Death. in 427–466 (2018).
402. Dixon, S. J. Ferroptosis: bug or feature? *Immunol. Rev.* **277**, 150–157 (2017).
403. Linkermann, A. *et al.* Synchronized renal tubular cell death involves ferroptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 16836–16841 (2014).
404. Kornienko, A., Mathieu, V., Rastogi, S. K., Lefranc, F. & Kiss, R. Therapeutic agents triggering

- nonapoptotic cancer cell death. *J. Med. Chem.* **56**, 4823–4839 (2013).
405. Overmeyer, J. H., Kaul, A., Johnson, E. E. & Maltese, W. A. Active Ras triggers death in glioblastoma cells through hyperstimulation of macropinocytosis. *Mol. Cancer Res.* **6**, 965–977 (2008).
406. Kerr, M. C. & Teasdale, R. D. Defining macropinocytosis. *Traffic* **10**, 364–371 (2009).
407. Recouvreux, M. V. & Commisso, C. Macropinocytosis: A metabolic adaptation to nutrient stress in cancer. *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. **8**, 1–7 (2017).
408. Swanson, J. A. Shaping cups into phagosomes and macropinosomes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 639–649 (2008).
409. Commisso, C., Flinn, R. J. & Bar-Sagi, D. Determining the macropinocytic index of cancer cells through a quantitative image-based assay. *Nat. Protoc.* **9**, 182–192 (2014).
410. Maltese, W. A. & Overmeyer, J. H. Methuosis: Nonapoptotic cell death associated with vacuolization of macropinosome and endosome compartments. *American Journal of Pathology* vol. 184 1630–1642 (2014).
411. Bhanot, H., Young, A. M., Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. Induction of nonapoptotic cell death by activated ras requires inverse regulation of Rac1 and Arf6. *Mol. Cancer Res.* **8**, 1358–1374 (2010).
412. Broker, L. E., Kruyt, F. A. E. & Giaccone, G. Cell death independent of caspases: A review. *Clin. Cancer Res.* **11**, 3155–3162 (2005).
413. Lefranc, F., Brotchi, J. & Kiss, R. Possible future issues in the treatment of glioblastomas: Special emphasis on cell migration and the resistance of migrating glioblastoma cells to apoptosis. *J. Clin. Oncol.* **23**, 2411–2422 (2005).
414. Chi, S. *et al.* Oncogenic Ras triggers cell suicide through the activation of a caspase-independent cell death program in human cancer cells. *Oncogene* **18**, 2281–2290 (1999).
415. Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. Death Pathways Triggered by Activated Ras in Cancer Cells. *Fronti* vol. 16 1693–1713 (2011).
416. Robinson, M. W., Overmeyer, J. H., Young, A. M., Erhardt, P. W. & Maltese, W. A. Synthesis and evaluation of indole-based chalcones as inducers of methuosis, a novel type of nonapoptotic cell

- death. *J. Med. Chem.* **55**, 1940–1956 (2012).
417. Mbah, N. E., Overmeyer, J. H. & Maltese, W. A. Disruption of endolysosomal trafficking pathways in glioma cells by methuosis-inducing indole-based chalcones. *Cell Biol. Toxicol.* **33**, 263–282 (2017).
418. Li, Z. *et al.* The JNK signaling pathway plays a key role in methuosis (non-apoptotic cell death) induced by MOMIPP in glioblastoma. *BMC Cancer* **19**, 77–97 (2019).
419. Billcliff, P. G. & Lowe, M. Inositol lipid phosphatases in membrane trafficking and human disease. *Biochem. J.* **461**, 159–175 (2014).
420. De Craene, J. O., Bertazzi, D. L., Bär, S. & Friant, S. Phosphoinositides, major actors in membrane trafficking and lipid signaling pathways. *Int. J. Mol. Sci.* **18**, (2017).
421. Cho, H. *et al.* Indolyl-Pyridinyl-Propenone-Induced Methuosis through the Inhibition of PIKFYVE. *ACS Omega* **3**, 6097–6103 (2018).
422. Lertsuwan, J. *et al.* CX-4945 induces methuosis in cholangiocarcinoma cell lines by a CK2-independent mechanism. *Cancers (Basel)*. **10**, 283–305 (2018).
423. Silva-Pavez, E. *et al.* CK2 inhibition with silmitasertib promotes methuosis-like cell death associated to catastrophic massive vacuolization of colorectal cancer cells. *Cell Death Dis.* **10**, 73–85 (2019).
424. Hwang, D. W. *et al.* Autophagy Induced by CX-4945, a Casein Kinase 2 Inhibitor, Enhances Apoptosis in Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas* **46**, 575–581 (2017).
425. Litchfield, D. W. Protein kinase CK2 : structure, regulation and role in cellular decisions of life and death. *Biochem. J* **369**, 1–15 (2003).
426. Hessenauer, A., Schneider, C. C., Götz Claudia, C. & Montenarh, M. CK2 inhibition induces apoptosis via the ER stress response. *Cell. Signal.* **23**, 145–151 (2011).
427. Pierre, F. *et al.* Pre-clinical characterization of CX-4945, a potent and selective small molecule inhibitor of CK2 for the treatment of cancer. *Mol. Cell. Biochem.* **356**, 37–43 (2011).
428. Pasello, M., Manara, M. C. & Scotlandi, K. CD99 at the crossroads of physiology and pathology. *J. Cell Commun. Signal.* **12**, 55–68 (2018).
429. Manara, M. C. *et al.* CD99 triggering induces methuosis of Ewing sarcoma cells through IGF-

- 1R/RAS/Rac1 signaling. *Oncotarget* **7**, 79925–79942 (2016).
430. Jiang, X. *et al.* Recent applications of click chemistry in drug discovery. *Expert Opin. Drug Discov.* **14**, 779–789 (2019).
431. Choi, J. Y. & Lee, B. C. Click Reaction: An Applicable Radiolabeling Method for Molecular Imaging. *Nucl. Med. Mol. Imaging (2010)*. **49**, 258–267 (2015).
432. Dubinsky, L., Krom, B. P. & Meijler, M. M. Diazirine based photoaffinity labeling. *Bioorganic Med. Chem.* **20**, 554–570 (2012).
433. Müskens, F. M. *et al.* Design, Synthesis, and Evaluation of a Diazirine Photoaffinity Probe for Ligand-Based Receptor Capture Targeting G Protein-Coupled Receptors *s. Mol. Pharmacol.* **95**, 196–209 (2019).
434. Zhang, H. *et al.* A diazirine-based photoaffinity probe for facile and efficient aptamer-protein covalent conjugation. *Chem. Commun.* **50**, 4891–4894 (2014).
435. Lahiri, S. *et al.* Kinetic characterization of mammalian ceramide synthases: Determination of Km values towards sphinganine. *FEBS Lett.* **581**, 5289–5294 (2007).
436. Shevchenko, A., Tomas, H., Havliš, J., Olsen, J. V. & Mann, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat. Protoc.* **1**, 2856–2860 (2007).
437. Käll, L., Canterbury, J. D., Weston, J., Noble, W. S. & MacCoss, M. J. Semi-supervised learning for peptide identification from shotgun proteomics datasets. *Nat. Methods* **4**, 923–925 (2007).
438. Spivak, M., Weston, J., Bottou, L., Käll, L. & Noble, W. S. Improvements to the percolator algorithm for peptide identification from shotgun proteomics data sets. *J. Proteome Res.* **8**, 3737–3745 (2009).
439. Alamudj, S. H. *et al.* A palette of background-free tame fluorescent probes for intracellular multi-color labelling in live cells. *Chem. Sci.* **9**, 2376–2383 (2018).
440. Van Geel, R., Pruijn, G. J. M., Van Delft, F. L. & Boelens, W. C. Preventing thiol-yne addition improves the specificity of strain-promoted azide-alkyne cycloaddition. *Bioconjug. Chem.* **23**, 392–398 (2012).
441. Casasampere, M. *et al.* Activity of neutral and alkaline ceramidases on fluorogenic N -acylated

- coumarin-containing aminodiols. *J. Lipid Res.* **56**, 2019–2028 (2015).
442. Duan, R. D. Anticancer compounds and sphingolipid metabolism in the colon. *In Vivo (Brooklyn)*. **19**, 293–300 (2005).
443. Uekama, K. Design and evaluation of cyclodextrin-based drug formulation. *Chem. Pharm. Bull.* **52**, 900–915 (2004).
444. Usta, J. *et al.* Structural requirements of ceramide and sphingosine based inhibitors of mitochondrial ceramidase. *Biochemistry* **40**, 9657–9668 (2001).
445. Shubin, A. V., Demidyuk, I. V., Komissarov, A. A., Rafieva, L. M. & Kostrov, S. V. Cytoplasmic vacuolization in cell death and survival. *Oncotarget* **7**, 55863–55889 (2016).
446. Yang, Z., Vadlamudi, R. K. & Kumar, R. Dynein light chain 1 phosphorylation controls macropinocytosis. *J. Biol. Chem.* **280**, 660 (2005).
447. Casasampere, M. *et al.* New fluorogenic probes for neutral and alkaline ceramidases. *J. Lipid Res.* **60**, 1174–1181 (2019).
448. Mahammad, S. & Parmryd, I. Cholesterol Depletion Using Methyl- $\beta$ -cyclodextrin. *Methods Mol. Biol.* **1232**, 91–102 (2014).
449. Gebai, A., Gorelik, A., Li, Z., Illes, K. & Nagar, B. Structural basis for the activation of acid ceramidase. *Nat. Commun.* **9**, 1–11 (2018).
450. Vasiliauskaitė-Brooks, I. *et al.* Structure of a human intramembrane ceramidase explains enzymatic dysfunction found in leukodystrophy. *Nat. Commun.* **9**, 1–13 (2018).
451. Ballereau, S., Levade, T., Genisson, Y. & Andrieu-Abadie, N. Alteration of Ceramide 1-O-Functionalization as a Promising Approach for Cancer Therapy. *Anticancer. Agents Med. Chem.* **12**, 316–328 (2012).
452. Danilczyk, U. G., Cohen-Doyle, M. F. & Williams, D. B. Functional relationship between calreticulin, calnexin, and the endoplasmic reticulum luminal domain of calnexin. *J. Biol. Chem.* **275**, 13089–13097 (2000).
453. Wang, K. *et al.* Targeting alkaline ceramidase 3 alleviates the severity of nonalcoholic steatohepatitis by reducing oxidative stress. *Cell Death Dis.* **11**, 1–15 (2020).

454. Wang, K. *et al.* Alkaline Ceramidase 3 Deficiency Results in Purkinje Cell Degeneration and Cerebellar Ataxia Due to Dyshomeostasis of Sphingolipids in the Brain. *PLoS Genet.* **11**, 1–31 (2015).
455. Yin, Y., Xu, M., Gao, J. & Li, M. Alkaline ceramidase 3 promotes growth of hepatocellular carcinoma cells via regulating S1P/S1PR2/PI3K/AKT signaling. *Pathol. Res. Pract.* **214**, 1381–1387 (2018).
456. Romiti, E. *et al.* Localization of neutral ceramidase in caveolin-enriched light membranes of murine endothelial cells. *FEBS Lett.* **506**, 163–168 (2001).
457. Trabbic, C. J. *et al.* Differential induction of cytoplasmic vacuolization and methuosis by novel 2-indolyl-substituted pyridinylpropenones. *ACS Med. Chem. Lett.* **5**, 73–77 (2014).
458. Zhang, E. *et al.* Discovery of novel jaspine B analogues as autophagy inducer. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* **28**, 497–502 (2018).
459. Overmeyer, J. H., Young, A. M., Bhanot, H. & Maltese, W. A. A chalcone-related small molecule that induces methuosis, a novel form of non-apoptotic cell death, in glioblastoma cells. *Mol. Cancer* **10**, 69–86 (2011).
460. Ghosal, P., Ajay, S., Meena, S., Sinha, S. & Shaw, A. K. Stereoselective total synthesis of Jaspine B (Pachastrissamine) utilizing iodocyclization and an investigation of its cytotoxic activity. *Tetrahedron Asymmetry* **24**, 903–908 (2013).
461. Martinková, M. *et al.* Total synthesis of pachastrissamine together with its 4-epi-congener via [3,3]-sigmatropic rearrangements and antiproliferative/cytotoxic evaluation Dedicated to Associated Professor Ladislav Kniežo on the occasion of his 70th birthday. *Carbohydr. Res.* **402**, 6–24 (2015).
462. Santos, C., Fabing, I., Saffon, N., Ballereau, S. & Génisson, Y. Rapid access to jaspine B and its enantiomer. *Tetrahedron* **69**, 7227–7233 (2013).
463. Martinková, M. & Gonda, J. Marine cytotoxic jaspine B and its stereoisomers: Biological activity and syntheses. *Carbohydr. Res.* **423**, 1–42 (2016).
464. Cingolani, F. New insights into sphingolipid metabolism and functions by using chemical tools. *TDX (Tesis Dr. en Xarxa)* (2015).
465. Donaldson, J. G., Porat-Shliom, N. & Cohen, L. A. Clathrin-independent endocytosis: A unique

- platform for cell signaling and PM remodeling. *Cell. Signal.* **21**, 1–6 (2009).
466. Racoosin, E. L. & Swanson, J. A. Macropinosome maturation and fusion with tubular lysosomes in macrophages. *J. Cell Biol.* **121**, 1011–1020 (1993).
467. Commisso, C. *et al.* Macropinocytosis of protein is an amino acid supply route in Ras-transformed cells. *Nature* **497**, 633–637 (2013).
468. Koivusalo, M. *et al.* Amiloride inhibits macropinocytosis by lowering submembranous pH and preventing Rac1 and Cdc42 signaling. *J. Cell Biol.* **188**, 547–563 (2010).
469. Huang, W. *et al.* Discovery and Identification of Small Molecules as Methuosis Inducers with in Vivo Antitumor Activities. *J. Med. Chem.* **61**, 5424–5434 (2018).
470. Yang, L. *et al.* Isobavachalcone reveals novel characteristics of methuosis-like cell death in leukemia cells. *Chem. Biol. Interact.* **304**, 131–138 (2019).
471. Kapuy, O., Vinod, P. K. & Bánhegyi, G. MTOR inhibition increases cell viability via autophagy induction during endoplasmic reticulum stress - An experimental and modeling study. *FEBS Open Bio* **4**, 704–713 (2014).
472. Yoshida, S., Pacitto, R., Inoki, K. & Swanson, J. Macropinocytosis, mTORC1 and cellular growth control. *Cell. Mol. Life Sci.* **75**, 1227–1239 (2018).
473. Kim, M. H. *et al.* C16-ceramide and sphingosine 1-phosphate/S1PR2 have opposite effects on cell growth through mTOR signaling pathway regulation. *Oncol. Rep.* **40**, 2977–2987 (2018).
474. Duester, G. Retinoic Acid Synthesis and Signaling during Early Organogenesis. *Cell* **134**, 921–931 (2008).
475. Xiao, T. *et al.* Molecular cloning and oxidative modification of human lens ALDH1A1: Implication in impaired detoxification of lipid aldehydes. *J. Toxicol. Environ. Heal. - Part A Curr. Issues* **72**, 577–584 (2009).
476. Stanton, R. C. Glucose-6-phosphate dehydrogenase, NADPH, and cell survival. *IUBMB Life* **64**, 362–369 (2012).
477. Jiang, P. *et al.* p53 regulates biosynthesis through direct inactivation of glucose-6-phosphate dehydrogenase. *Nat Cell Biol* **13**, 310–316 (2011).



478. Boros, L. G. *et al.* Inhibition of the oxidative and nonoxidative pentose phosphate pathways by somatostatin: A possible mechanism of antitumor action. *Med. Hypotheses* **50**, 501–506 (1998).
479. Frederiks, W. M. *et al.* Elevated activity of the oxidative and non-oxidative pentose phosphate pathway in (pre)neoplastic lesions in rat liver. *J. Exp. Path* **89**, 232–240 (2008).
480. Kuo, W., Lin, J. & Tang, T. K. Human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) gene transforms NIH 3T3 cells and induces tumors in nude mice. *Int. J. Cancer* **85**, 857–864 (2000).
481. Yang, X. *et al.* Chaperonin-containing T-complex protein 1 subunit 8 promotes cell migration and invasion in human esophageal squamous cell carcinoma by regulating  $\alpha$ -Actin and  $\beta$ -tubulin expression. *Int. J. Oncol.* **52**, 2021–2030 (2018).
482. Freund, A. *et al.* Proteostatic control of telomerase function through TRiC-mediated folding of TCAB1. *Cell* **159**, 1389–1403 (2014).
483. Wang, D. Y., Kamuda, K., Montoya, G. & Mesa, P. The TRiC/CCT Chaperonin and Its Role in Uncontrolled Proliferation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1243**, 21–40 (2020).
484. Hsu, L. C., Chang, W. C., Shibuya, A. & Yoshida, A. Human stomach aldehyde dehydrogenase cDNA and genomic cloning, primary structure, and expression in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **267**, 3030–3037 (1992).
485. Estey, T., Piatigorsky, J., Lassen, N. & Vasiliou, V. ALDH3A1: a corneal crystallin with diverse functions. *Exp. Eye Res.* **84**, 3–12 (2007).
486. Estey, T., Chen, Y., Carpenter, J. F. & Vasiliou, V. Structural and functional modifications of corneal crystallin ALDH3A1 by UVB light. *PLoS One* **5**, 1–13 (2010).
487. Van Kuijk, F. J. G. M. Effects of Ultraviolet Light on the Eye: Role of Protective Glasses. *Environ. Health Perspect.* **96**, 177–184 (1991).
488. Brocker, C. *et al.* Aldehyde Dehydrogenase 7A1 (ALDH7A1) Is a Novel Enzyme Involved in Cellular Defense against Hyperosmotic Stress. *J. Biol. Chem.* **285**, 18452–18463 (2010).
489. Revollo, J. R., Grimm, A. A. & Imai, S. I. The regulation of nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis by Nampt/PBEF/visfatin in mammals. *Curr. Opin. Gastroenterol.* **23**, 164–170 (2007).
490. Grolla, A. A., Travelli, C., Genazzani, A. A. & Sethi, J. K. Extracellular nicotinamide

- 
- phosphoribosyltransferase, a new cancer metabokine. *Br. J. Pharmacol.* **173**, 2182–2194 (2016).
491. Galal, A. M. F., Mohamed, H. S., Abdel-Aziz, M. M. & Hanna, A. G. Development, synthesis, and biological evaluation of sulfonyl- $\alpha$ -l-amino acids as potential anti-*Helicobacter pylori* and IMPDH inhibitors. *Arch. Pharm. (Weinheim)*. (2021) doi:10.1002/ardp.202000385.
492. Dehm, P. & Nordwig, A. The Cleavage of Prolyl Peptides by Kidney Peptidases. *Eur. J. Biochem.* **17**, 364–371 (1970).
493. Cappiello, M. *et al.* Metal ion substitution in the catalytic site greatly affects the binding of sulfhydryl-containing compounds to leucyl aminopeptidase. *Biochemistry* **45**, 3226–3234 (2006).
494. Cappiello, M. *et al.* New role for leucyl aminopeptidase in glutathione turnover. *Biochem. J.* **378**, 35–44 (2004).
495. Komander, D. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem. Soc. Trans.* **37**, 937–953 (2009).
496. Huang, F., Kirkpatrick, D., Jiang, X., Gygi, S. & Sorkin, A. Differential regulation of EGF receptor internalization and degradation by multiubiquitination within the kinase domain. *Mol. Cell* **21**, 737–748 (2006).