

Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej

im. Mirosława Mossakowskiego

Polska Akademia Nauk

Zespół Kliniczno - Badawczy Neurochirurgii

**Pracownia Badań Przedklinicznych Związków
Neuroprotekcyjnych i Czynników Środowiskowych**

Kinga Czubowicz

**ROLA CERAMIDU W MOLEKULARNYCH
MECHANIZMACH ŚMIERCI KOMÓREK LUDZKIEJ
NEUROBLASTOMA SH-SY5Y. ANALIZA DZIAŁANIA
WYBRANYCH CYTOPROTEKTANTÓW.**

Praca doktorska wykonana pod kierunkiem

Dr hab. n. med. Roberta Strosznajdera

Warszawa 2014

*Promotorowi mojej pracy Panu Dr hab. n. med. Robertowi Strosznajderowi
składam serdeczne podziękowania
za ukierunkowanie mojego rozwoju naukowego, cenne
wskazówki udzielone w trakcie wykonywania i redagowania tej pracy oraz
za życzliwość i pomoc*

*Składam także serdeczne podziękowania:
Koleżankom i Kolegom z Zakładu Komórkowej Transdukcji Sygnału i Pracowni
Neurochirurgii Doświadczalnej, a w szczególności Pani mgr Joannie Motyl*

*Niniejszą pracę dedykuję moim Rodzicom i Arturowi, którzy zawsze we
mnie wierzyli i mocno mnie wspierali*

Wyniki zamieszczone w rozprawie doktorskiej zostały częściowo opublikowane w pracy:

Czubowicz K, Strosznajder RP (2014)

Ceramide in the Molecular Mechanisms of Neuronal Cell Death. The Role of Sphingosine-1-Phosphate. *Mol Neurobiol.* 2014;50(1):26-37.

doi: 10.1007/s12035-013-8606-4.

Przedstawione były również w formie licznych komunikatów na konferencjach krajowych i zagranicznych.

Badania, których wyniki przedstawiono w tej pracy były finansowane z funduszy statutowych Zespołu Kliniczno – Badawczego Neurochirurgii oraz przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach projektu badawczego nr 5870/PO1/2011/40.

Spis treści

WYKAZ WAŻNIEJSZYCH SKRÓTÓW STOSOWANYCH W TEJ PRACY	8
WPROWADZENIE	10
SFINGOLIPIDY.....	10
CERAMIDY.....	12
<i>Synteza de novo</i>	13
<i>Aktywacja sfingomielinaz i synteza ceramidu</i>	14
<i>Szlak ratunkowy</i>	15
<i>Fosforylacja ceramidu</i>	15
<i>Degradacja ceramidu</i>	16
<i>Rola kinaz sfingozyny w syntezie sfingozyno-1-fosforanu</i>	16
ROLA CERAMIDU W ŚMIERCI KOMÓREK	18
<i>Wewnętrzny szlak apoptozy</i>	18
POLIMERAZA POLI(ADP-RYBOZY)	23
UDZIAŁ BIAŁKA AIF I POLIMERAZY POLI(ADP-RYBOZY) W ŚMIERCI KOMÓREK	25
DZIAŁANIE SFINGOZYNO-1-FOSFORANU ZA POŚREDNICTWEM BŁONOWYCH RECEPTORÓW SPRZĘŻONYCH Z BIAŁKAMI G.....	27
ZNACZENIE CERAMIDU/S1P W WYBRANYCH STANACH PATOLOGICZNYCH.....	29
<i>Choroba Alzheimera</i>	29
<i>Stwardnienie rozsiane</i>	30
<i>Proces nowotworzenia</i>	30
ZAŁOŻENIA I CEL PRACY	32
MATERIAŁY I METODY.....	34
KOMÓRKOWY MODEL BADAWCZY	34
<i>Komórki neuroblastoma SH-SY5Y</i>	34
<i>Zastosowane warunki doświadczalne</i>	35
CHARAKTERYSTYKA I WZORY CHEMICZNE STOSOWANYCH ZWIĄZKÓW	36
PRZYGOTOWANIE MATERIAŁU DO DOŚWIADCZEŃ I ANALIZ.....	38
OTRZYMYWANIE FRAKCJI PODKOMÓRKOWYCH	38
METODY SPEKTROFOTOMETRYCZNE.....	38
OZNACZANIE ZAWARTOŚCI BIAŁKA.....	38
ANALIZA PRZEŻYWALNOŚCI KOMÓREK ZA POMOCĄ TESTU MTT	38
ANALIZA POZIOMU WOLNYCH RODNIKÓW W CYTOZOLU KOMÓREK PRZY UŻYCIU SONDY FLUORESCENCYJNEJ DCF	39
OZNACZANIE STOPNIA CYTOTOKSYCZNOŚCI C2-CERAMIDU ZA POMOCĄ TESTU LDH	39
OZNACZANIE AKTYWNOŚCI KINAZY SFINGOZYNY 1	40
METODY RADIOCHEMICZNE OZNACZANIA AKTYWNOŚCI ENZYMÓW	40
OZNACZANIE AKTYWNOŚCI POLIMERAZY POLI (ADP-RYBOZY)	40
METODY IMMUNOCHEMICZNE	41
IMMUNODETEKCJA BIAŁEK METODĄ WESTERN BLOT.....	41
ANALIZA EKSPRESJI GENÓW.....	44
IZOLACJA RNA	44
REAKCJA ODWROTNEJ TRANSKRYPCJI	44
REAKCJA ŁAŃCUCHOWA POLIMERAZY W CZASIE RZECZYWISTYM (ANG. REAL-TIME PCR)	45

OZNACZANIE APOPTOZY KOMÓREK <i>IN VITRO</i> METODĄ MIKROSKOPII FLUORESCENCYJNEJ	45
STATYSTYCZNE OPRACOWANIE WYNIKÓW	45
WYNIKI	46
Wpływ egzogenego C2-ceramidu na przeżywalność komórek SH-SY5Y i indukcję stresu oksydacyjnego	46
Zbadanie roli polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1) w mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y	49
Rola szlaku przekazywania sygnału PI3-K/AKT/GSK3B w zależności od PARP-1/PAR/AIF śmierci komórek SH-SY5Y	54
Analiza wpływu zahamowania aktywności PARP-1 na ekspresję genów/immunoreaktywność dla pro- i anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2	58
Identyfikacja apoptozy w warunkach zahamowania aktywności PARP-1 i stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu	60
Znaczenie megakanału mitochondrialnego oraz udział białka p53 w śmierci komórek SH-SY5Y indukowanej C2-ceramidem	62
Wpływ C2-ceramidu na enzymy metabolizujące S1P	63
Zbadanie roli egzogenego sfingozyno-1-fosforanu w stresie oksydacyjnym wywołanym C2-ceramidem	66
Wpływ S1P na szlak przekazywania sygnału zależnego od PI3-K/AKT w komórkach SH-SY5Y	69
Analiza wpływu S1P na ekspresję genów/immunoreaktywność dla pro- i anty-apoptotycznych białek z rodziny BCL-2	72
Identyfikacja apoptozy w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu z zastosowaniem S1P	74
DYSKUSJA	75
PODSUMOWANIE	86
WNIOSKI	88
STRESZCZENIE	89
SUMMARY	92
LITERATURA	94

Wykaz ważniejszych skrótów stosowanych w tej pracy

AC – kwaśna ceramidaza, ang. acidic ceramidase
ACER – zasadowa ceramidaza, ang. alkaline ceramidase
AIF – czynnik indukujący apoptozę, ang. apoptosis inducing factor
ANT – translokaza nukleotydów adeninowych, ang. adenine nucleotide translocator
AP-1 – czynnik transkrypcyjny, ang. activating protein-1
AP-2 – czynnik transkrypcyjny, ang. activating enhancer-binding protein 2
Apaf-1 – ang. apoptosis protease-activating factor 1
A β – amyloid beta
BACE – β -sekreতাза
BDNF – czynnik wzrostu nerwu pochodzenia mózgowego
C1P – ceramido-1-fosforan
cAMP – cykliczny adenozylo-3',5'-monofosforan
CERK – kinaza ceramidu, ang. ceramide kinase
CERT – ang. ceramide transfer protein
CerS – syntazy ceramidu, ang. ceramide synthase
cPLA₂ – cytozolowa izoforma fosfolipazy A₂
CREB – ang. cAMP response element-binding protein
CsA – cyklosporyna A
DCF – 2',7-dichlorofluoresceina
DPPH – 1,1-difenylo-2-pikrylohydrazyl
DTT – ditiotreitól
EDTA – sól disodowa kwasu etylenodiaminotetraoctowego
EGTA – kwas etylenoglikol-O-O'-bis(2-aminoetyl)-N,N,N',N'tetraoctowy
ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym, ang. extracellular signal regulated kinase
FAD – dinukleotyd flawinoadeninowy
FLIP – białkowy inhibitor podobny do FLICE, ang. FLICE-like inhibitory protein
GAPDH – dehydrogenaza fosforanu aldehydu glicerynowego, ang. glyceraldehyde 3-phosphodehydrogenase
GSK-3 – kinaza 3 syntazy glikogenu
H2DCF-DA – dwuoctan 2',7-dichlorodihydrofluoresceiny
MPTP – megakanał mitochondrialny, ang. mitochondrial permeability transition pore
HEPES – kwas 2-[4-(2-hydroksetylo)-1-piperazylo]etanosulfonowy
IAPS – ang. inhibitors of apoptotic proteases
IFN γ – interferon γ
IL1 β – interleukina 1beta
iNOS – indukowana izoforma syntazy tlenku azotu
JNK – kinaza N-końcowa c-JUN, ang. c-Jun NH2-terminal kinase
LDH – dehydrogenaza mleczanowa, ang. lactate dehydrogenase
LPS – lipopolisacharyd
MAM – ang. mitochondria associated membranes
MAPK – kinazy aktywowane mitogenami, ang. mitogen activated protein kinases
MTT – błękit tiazolu, bromek 3-(4,5-dimetylo-2-tiazolylo)-2,5-difenylo-tetrazolowy
NAD – dinukleotyd nikotynamidoadeninowy
NADH – dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy, postać zredukowana

Wykaz ważniejszych skrótów stosowanych w tej pracy

NADPH – forma zredukowana NADP⁺
NC – obojętna ceramidaza, ang. neutral ceramidase
NES – sekwencja odpowiedzialna za eksport z jądra do cytoplazmy, ang. nuclear export signal
NF-κB – czynnik jądrowy kappa B, ang. nuclear factor kappa B
NGF – czynnik wzrostu neuronów, ang. neuronal growth factor
NLS – sekwencja lokalizacji jądrowej, ang. nuclear localization signal
p75NTR – ang. p75 neurotrophin receptor
PAR – poli(ADP-ryboza)
PARP – polimeraza poli(ADP-rybozy)
PBS – bufor fosforanowy – buforowany roztwór soli fizjologicznej
PJ-43 – chlorowodorek N-(6-okso-5,6-dihydrofenantrydyn-2-yl) (N,N-dimetylamino)acetamidu
PKB/Akt – kinaza białkowa B
PKC – kinaza białkowa C izofromy: α, β, ζ
PKC δ – kinaza białkowa C delta
PLC – fosfolipaza C
PP2A – fosfatza białek
PtdIns(3,4)P₂ – fosfatydyloinozytolo-3,4 bisfosforan
PtdIns(3,4,5)P₃ – fosfatydyloinozytolo -3,4,5 trisfosforan
PI3-K – kinaza 3-fosfatydyloinozytoli
InsP₃ – inozytolo-(1,4,5)-trisfosforan
DAG – diacyloglicerol
aSMasa – sfingomielinaza kwaśna
nSMasa – sfingomielinaza obojętna
bSMasa – sfingomielinaza alkaliczna
PVDF – polifluorek winylidenu
Raf – serynowo-treoninowa kinaza
Ras – małe białko G
S1P – sfingozyno-1-fosforan
SDS – dodecylosiarczan sodowy
Sphk1/2 – kinazy sfingozyny typu 1 i 2
SPT – palmitylotransferaza serynowa
SSP1, SPP2 – fosfatazy dla S1P
TNF-α – czynnik martwicy nowotworu α
FBS – cieleńca surowica płodowa, ang. fetal bovine serum
TRAIL – związany z TNF ligand indukujący apoptozę, ang. TNF related apoptosis inducing ligand
Tris – tris(hydroksymetylo)aminometan
VDAC – kanał anionowy zależny od napięcia, ang. voltage dependent anion channel

Wprowadzenie

Sfingolipidy

Lipidy wchodzące w skład błon komórkowych ssaków można podzielić na 3 grupy: fosfolipidy, sfingolipidy oraz sterole (Berg i wsp., 2011). Lipidy pełnią funkcje strukturalne, odgrywają też ważną rolę jako cząsteczki sygnalizacyjne i regulacyjne. Pierwsze dane na temat lipidów jako wtórnych przekaźników informacji datuje się od pionierskich badań Hokin i Hokin (Hokin i Hokin 1953 a, b). Wyniki ich prac opublikowane w 1953 r. wykazały, że acetylocholina powoduje rozpad, a następnie resyntezę fosfatydyloinozytolu (Hokin i Hokin, 1953 a, b). Późniejsze badania wykazały, że fosfolipaza C (PLC) jest kluczowym enzymem w zależnej od agonistów degradacji fosfoinozytydów i mobilizacji wewnątrzkomórkowych jonów wapnia (Michell 1975). Lipidy działają za pośrednictwem dwóch mechanizmów: bezpośrednich interakcji m.in. z odpowiednimi receptorami, kinazami białkowymi lub fosfatazami oraz tworzenia lipidowych mikrodomen i tratw. Tratwy lipidowe, stanowiące domeny sfingolipidowo-cholesterolowe uczestniczą w wielu ważnych procesach komórkowych (Pike 2003).

Do grupy bioaktywnych lipidów, które są przedmiotem zainteresowań badaczy w ciągu ostatnich dwóch dekad zalicza się: eikozanoidy i sfingolipidy.

Centralną cząsteczką w strukturze sfingolipidów stanowią alifatyczne aminoalkohole – sfingozyna lub dihydroksyfingozyna. Lipidy, w których cząsteczka sfingozyny tworzy wiązanie amidowe z nasyconym lub nienasyconym kwasem tłuszczowym o długości łańcucha głównie 14–32 atomów węgla to ceramidy (np., mirystynowy C14, palmitynowy C16, stearynowy C18, lignocerynowy C24). Charakterystyczną cechą ceramidu jest obecność w jego cząsteczce reaktywnej grupy hydroksylowej przy węglu C1 sfingozyny. Grupa ta może ulegać estryfikacji, co w zależności od podstawnika prowadzi do powstania dalszych klas sfingolipidów. Jeśli tym podstawnikiem jest fosfocholina, powstały produkt nosi nazwę sfingomieliny i jest najczęściej występującym sfingolipidem w tkankach ssaków.

Ceramidy stanowią centralne miejsce w metabolizmie sfingolipidów i biorą udział w regulacji takich procesów komórkowych jak: proliferacja i różnicowanie, wzrost, starzenie się oraz śmierć komórki (Taha i wsp., 2006, Jana i wsp., 2009, Mencarelli i Martinez-Martinez 2012).

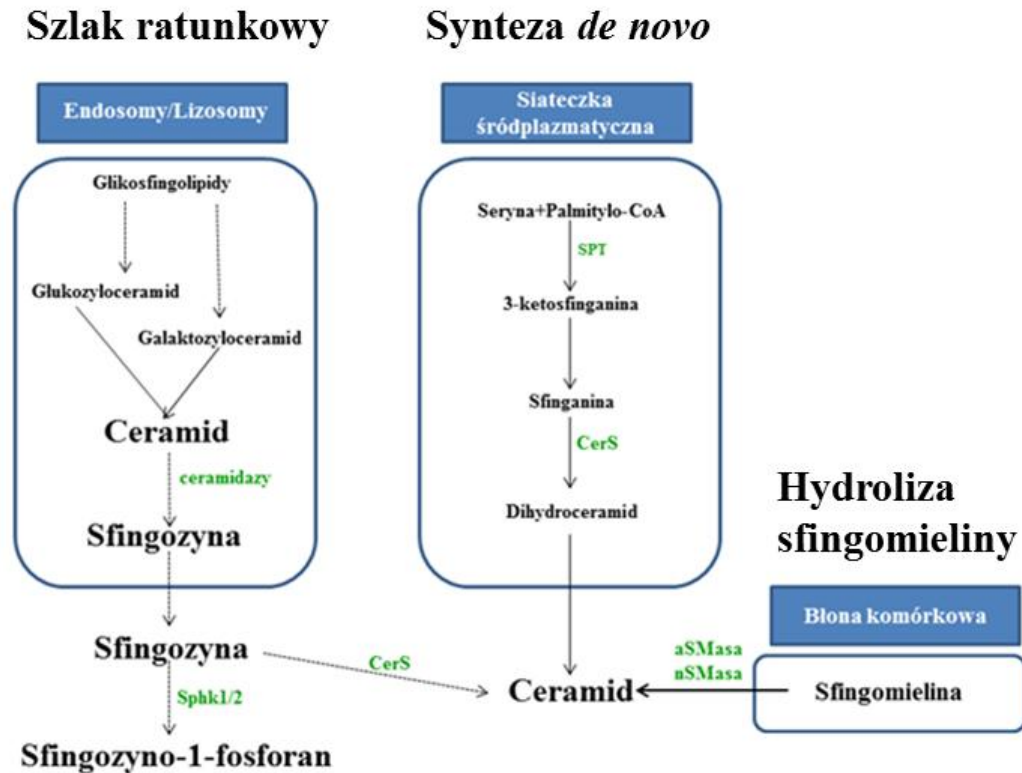
Ceramidy mogą ulegać fosforylacji z wytworzeniem ceramido-1-fosforanu (C1P) lub też mogą być przekształcane przy udziale ceramidaz do sfingozyny, która ulega fosforylacji przez kinazy sfingozyny typu 1 i 2 do sfingozyno-1-fosforanu (S1P) (Okada i wsp., 2009).

Fosforylowane pochodne S1P i C1P wykazują działanie proliferacyjne i anty-apoptotyczne.

W przedstawionej pracy swoją uwagę skoncentrowałam na dwóch bioaktywnych sfingolipidach: ceramidzie i sfingozyno-1-fosforanie.

Ceramidy

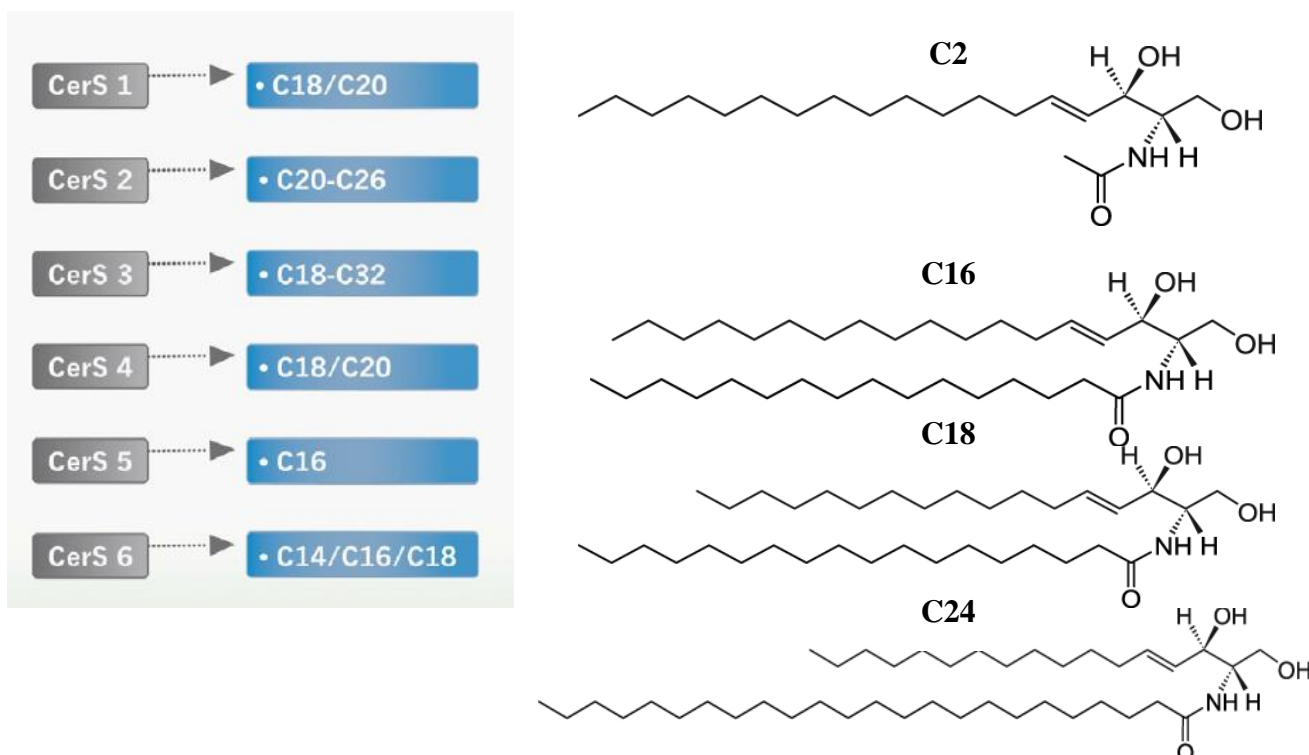
Ceramidy powstają w wyniku: syntezy *de novo*, hydrolizy sfingomieliny i w tzw. szlaku ratunkowym (Hannun i Obeid 2008) (Schemat 1– objaśnienia w tekście poniżej).



Schemat 1. Schemat syntezy *de novo* ceramidu, hydrolizy sfingomieliny i szlaku ratunkowego z uwzględnieniem odpowiednich kompartmentów w komórce wg Morales i wsp., 2007. Objaśnienia skrótów: Sphk1/2 – kinazy sfingozyny typu 1 i 2, CerS – syntazy ceramidu, SPT – palmitylotransferaza serynowa, aSMasa – kwaśna sfingomielinaza, nSMasa – obojętna sfingomielinaza.

Synteza de novo

Synteza *de novo* ceramidów odbywa się w siateczce śródplazmatycznej. Pierwszym etapem jest synteza 3-ketosfinganiny polegająca na kondensacji L-seryny i palmito-CoA, katalizowana przez palmitotransferazę serynową (SPT). Jest to kluczowy enzym w regulacji syntezy tego związku. W kolejnym etapie 3-ketosfinganina jest redukowana do sfinganiny, która jest następnie acylowana do dihydroceramidu przez odpowiednie syntazy ceramidu (CerS). Ostatnim etapem syntezy jest utlenienie dihydroceramidu do ceramidu katalizowane przez desaturazę dihydroceramidu (Schemat 1). Znanych jest 6 różnych syntaz ceramidu, które różnią się powinowactwem do kwasów tłuszczowych w zależności od długości łańcucha oraz dystrybucją tkankową (Schemat 2) (Stiban i wsp., 2010, Mullen i wsp., 2012, Park i wsp., 2014).



Schemat 2. Specyficzność syntaz ceramidu co do długości łańcucha kwasu tłuszczowego wg Grösch i wsp., 2012 oraz przykładowe wzory chemiczne ceramidów.

W stanie homeostazy komórkowej ceramid nie jest akumulowany, lecz przemieszczany do aparatu Golgiego, gdzie staje się prekursorem innych sfingolipidów, takich jak sfingomielina i glikosfingolipidy. Ceramid transportowany jest z siateczki śródplazmatycznej do aparatu Golgiego przez specjalne białko transportowe CERT. Jest to białko cytozolowe, które wykazuje specyficzność substratową co do długości łańcucha węglowego ceramidów, jak również stereospecyficzność. Białko to najefektywniej transportuje ceramidy o następujących

długościach łańcucha węglowego: C14, C16, C18 i C20 (Kumagai i wsp., 2005, Perry i Ridgway 2005, Hanada i wsp., 2007). Białko CERT posiada wiele miejsc fosforylacji dla kinaz białkowych (np. kinazy białkowej D), co wpływa na regulację jego aktywności (Kumagai i wsp., 2007).

Aktywacja sfingomielinaz i synteza ceramidu

Ceramidy syntetyzowane są również w wyniku hydrolizy sfingomieliny (Schemat 1). Szereg niekorzystnie działających bodźców na komórkę powoduje hydrolizę sfingomieliny w wyniku aktywacji sfingomielinaz (Taniguchi i Okazaki 2014). Podział sfingomielinaz opiera się na różnicach optimum pH katalizowanej reakcji i w związku z tym wyróżnia się następujące izoformy: sfingomielinaza kwaśna (aSMasa), sfingomielinaza obojętna (nSMasa) oraz sfingomielinaza alkaliczna (bSMasa) (Marchesini i Hannun 2004). Kwaśna sfingomielinaza występuje w komórkach w dwóch izoformach: lizosomalnej/endosomalnej i sekrecyjnej (Jenkins i wsp., 2009). Kwaśna sfingomielinaza aktywowana jest przez szereg czynników takich jak: ligandy dla receptorów śmierci (TNF- α , CD95 (Fas), TRAIL/DR5), promieniowanie UV, γ , infekcje wirusowe i bakteryjne, stres oksydacyjny, cytokiny (np. IL-1 β) oraz cytostatyki (Schütze i wsp., 1992, Mathias i wsp., 1993, Cifone i wsp., 1994, Gulbins i wsp., 1995, Brenner i wsp., 1998, Grassmé i wsp., 1997, Zeidan i Hannun 2010). Obojętna sfingomielinaza występuje w trzech izoformach: nSMasa1, nSMasa2, nSMasa3. Aktywność enzymatyczna obojętnych sfingomielinaz 1 i 2 jest zależna od jonów magnezu. Obojętna sfingomielinaza podobnie jak kwaśna sfingomielinaza aktywowana jest m.in. przez cytostatyki, cytokiny (TNF- α , IL-1 β), peptydy amyloidu beta (Wu i wsp., 2010, 2011, Clarke i wsp., 2011, Horres i Hannun 2012). Obojętna sfingomielinaza odpowiedzialna jest za produkcję ceramidów w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) w odpowiedzi na działanie neurotrofin. Neurotrofina NGF, która wiąże się z receptorem p75NTR, stymuluje wzrost hodowli neuronów hipokampa poprzez produkcję ceramidów w wyniku aktywacji obojętnej sfingomielinazy (Brann i wsp., 1999). W dalszych badaniach wykazano, że wraz ze wzrostem ekspresji receptora p75NTR i stężenia ceramidu dochodzi do indukcji apoptozy. W procesie tym nie bierze udziału kwaśna sfingomielinaza (Brann i wsp., 2002). Badania wykazały, że do produkcji ceramidu w wyniku aktywacji kwaśnej i obojętnej sfingomielinazy dochodzi w czasie sekund i minut w porównaniu do syntezy *de novo* ceramidów, która następuje w ciągu godzin (Wiegmann i wsp., 1994).

Szlak ratunkowy

Szlak ratunkowy zachodzi w późnych endosomach i w lizosomach, gdzie katabolizmowi ulegają złożone glikosfingolipidy, co prowadzi do powstania ceramidu. Ceramidy następnie przy udziale kwaśnej ceramidazy przekształcane są do sfingozyny (Kitatani i wsp., 2008). Z badań wynika, że sfingozyna opuszcza lizosomy i może być metabolizowana do ceramidów lub ulegać fosforylacji do sfingozyno-1-fosforanu (Schemat 1) (Riboni i wsp., 1998, Chatelut i wsp., 1998).

Istnieje niewiele badań na temat regulacji i warunków w jakich dochodzi do aktywacji szlaku ratunkowego. Wydaje się, że ważną rolę w jego regulacji odgrywa kinaza białkowa C (PKC) (Becker i wsp., 2005, Kitatani i wsp., 2006).

Fosforylacja ceramidu

Ceramido-1-fosforan (C1P) syntetyzowany jest w wyniku fosforylacji wolnej grupy hydroksylowej przy pierwszym atomie węgla łańcucha sfingozyny w cząsteczce ceramidu przez kinazę ceramidu (CERK). Reakcja odwrotna jest katalizowana przez fosfatazę ceramido-1-fosforanu. Aktywność kinazy CERK jest zależna od jonów wapnia i może być regulowana poprzez procesy fosforylacji/defosforylacji (Van Overloop i wsp., 2006, Tada i wsp., 2010). Badania pokazują, że substratami dla CERK są głównie ceramidy posiadające minimum 12 atomów węgla w łańcuchu (Wijesinghe i wsp., 2005). Jednakże, ceramidy o krótkich łańcuchach węglowych $C \leq 8$ mogą również ulegać fosforylacji katalizowanej przez CERK (Van Overloop i wsp., 2007). C1P bierze udział w regulacji takich procesów komórkowych jak: proliferacja, apoptoza, uwalnianie czynników prozapalnych, migracja i fagocytoza makrofagów (Arana i wsp., 2012, Ouro i wsp., 2012). Mechanizm działania C1P związany jest z indukcją fosforylacji kinaz w szlakach MAPK, ERK1/2, JNK oraz PI3-K/Akt (Gómez-Muñoz i wsp., 2005, Gangoiti i wsp., 2008, Ouro i wsp., 2012).

Degradacja ceramidu

Degradacja ceramidu do sfingozyny i kwasu tłuszczowego odbywa się za pośrednictwem ceramidaz. Do tej pory zostało zidentyfikowanych pięć różnych enzymów katalizujących tę reakcję: kwaśna ceramidaza (AC), obojętna ceramidaza (NC) i trzy izoformy zasadowej ceramidazy (ACER1, 2 i 3) (Mao i Obeid 2008). Podobnie jak syntazy ceramidu, ceramidazy różnią się powinowactwem do kwasów tłuszczowych w zależności od długości łańcucha i miejscem występowania w komórce. Dla kwaśnej ceramidazy lepszymi substratami od krótko ($C \leq 6$) i długołańcuchowych ($C \geq 16$) ceramidów są ceramidy o średnich długościach łańcucha węglowego (Momoi i wsp., 1982). Obojętna ceramidaza natomiast preferencyjnie katalizuje reakcje z udziałem długołańcuchowych ceramidów (El Bawab i wsp., 1999). Gwałtowny wzrost aktywności zasadowych ceramidaz *in vitro* powodują jony wapnia (Sun i wsp., 2008). Ceramidazy te katalizują reakcje z udziałem ceramidów o długich i bardzo długich ($C \geq 24$) łańcuchach węglowych (Mao i wsp., 2001, Xu i wsp., 2006). Ceramidazy mogą być aktywowane przez cytokiny (TNF- α , IL-1 β), cytostatyki, promieniowanie UV i γ (Ferlinz i wsp., 2001).

Rola kinaz sfingozyny w syntezie sfingozyno-1-fosforanu

Powstająca w wyniku działania ceramidaz, sfingozyna może być fosforylowana przez kinazy sfingozyny do sfingozyno-1-fosforanu (S1P). Ścieżka sygnalizacji sfingozyno-1-fosforanu jest jednym z kluczowych regulatorów przeżycia, proliferacji i różnicowania komórek (Hait i wsp., 2006, Strub i wsp., 2010, Maceyka i wsp., 2012). Tym samym kinazy sfingozyny są ważnymi enzymami biorącymi udział w utrzymaniu równowagi pomiędzy bioaktywnymi sfingolipidami takimi jak: S1P, ceramid i sfingozyna (Cuvillier i wsp., 1996, Fyrst i Saba 2010, Pitson 2011, Van Brocklyn i Williams 2012). Wyróżnia się dwie izoformy kinaz sfingozyny (Sphk1 i Sphk2), które charakteryzują się różną lokalizacją wewnątrzkomórkową (Wattenberg 2010). Kinaza sfingozyny 1 zlokalizowana jest głównie w cytozolu. Istnieje szereg czynników aktywujących Sphk1, do których należą m. in. czynniki wzrostu, agoniści receptorów sprzężonych z białkami G, cytokiny, estry forbolu (Pitson 2011, Van Brocklyn i Williams 2012). W wyniku ich działania Sphk1 jest fosforylowana przez ERK1/2 co powoduje 14-krotny wzrost jej aktywności i translokację do błony komórkowej (Pitson i wsp., 2003). Translokacja Sphk1 do błony komórkowej może odbywać się także w wyniku wzajemnego oddziaływania Sphk1 z białkami np. z białkiem wiążącym wapń i integrynę 1 (CIB1) (Jarman i wsp., 2010).

Sphk2, w zależności od typu komórek, może występować w siateczce śródplazmatycznej, w jądrze komórkowym i mitochondriach. Sphk2 posiada w swej strukturze sekwencję lokalizacji jądrowej (ang. nuclear localization signal, NLS) oraz sekwencję odpowiedzialną za eksport z jądra do cytoplazmy (ang. nuclear export signal, NES) (Neubauer i Pitson 2013). Kinaza białkowa D fosforyluje Sphk2 powodując jej translokację z jądra komórkowego do cytoplazmy (Ding i wsp., 2007). Aktywność Sphk2 podobnie jak Sphk1 wzrasta pod wpływem m.in. czynników wzrostu, cytokin czy estrów forbolu (Hait i wsp., 2005, Mastrandrea i wsp., 2005, Olivera i wsp., 2006, Neubauer i Pitson 2013). Sphk2 również może być fosforylowana przez kinazy ERK1/2 co powoduje wzrost jej aktywności od 2 do 6 razy (Hait i wsp., 2007).

Wewnątrzkomórkowy poziom S1P jest wynikiem równowagi między jego syntezą i degradacją katalizowaną przez fosfatazy S1P i liazę S1P. Liaza S1P i fosfatazy S1P są zlokalizowane w siateczce śródplazmatycznej. Liaza S1P katalizuje rozkład S1P do fosforanu etanoloaminy i heksadecenal. Reakcja defosforylacji S1P katalizowana jest przez specyficzne dla S1P fosfatazy (SPP1 i SPP2) oraz przez fosfohydrolazy o szerokiej specyficzności substratowej (LPP1, LPP2 i LPP3) (Spiegel i Milstien 2003).

Rola ceramidu w śmierci komórek

Wyniki badań przeprowadzonych w warunkach *in vitro* wskazują na istnienie wielu mechanizmów odpowiedzialnych za toksyczność krótko (C2, C6, C8) i długołańcuchowych ceramidów (C16, C18, C24). Należą do nich między innymi indukcja apoptozy zależnej zarówno od pobudzenia receptorów śmierci jak i dysfunkcji mitochondriów, zaburzenia siateczki śródplazmatycznej oraz aktywacja procesu autofagii (Tavarini i wsp., 2000, Movsesyan i wsp., 2002, Toman i wsp., 2002, Darios i wsp., 2003, Stoica i wsp., 2003, Kim i wsp., 2007, Zhang i wsp., 2009, Gong i wsp., 2012, Jiang i Ogretmen 2014).

Wewnętrzny szlak apoptozy

W warunkach fizjologicznych w poprzek wewnętrznej błony mitochondrialnej tworzy się elektrochemiczny gradient protonów-siła protonomotoryczna (stężenie jonów H^+ po stronie cytoplazmatycznej jest znacznie wyższe niż po stronie macierzy mitochondrialnej). Składnikami tej siły jest potencjał transbłonowy i gradient chemiczny. Spadek potencjału transbłonowego poniżej krytycznej wartości tzw. potencjału bramkującego sprzyja otwieraniu megakanałów mitochondrialnych (MPTP, ang. mitochondria permeability transition pore) znajdujących się na styku błon wewnętrznej i zewnętrznej. Głównym elementem struktury megakanału jest translokaza nukleotydów adeninowych (ANT, ang. adenine nucleotide translocator) umiejscowiona w błonie wewnętrznej. ANT tworzy kompleksy z białkami zewnętrznej błony: poryną i obwodowym receptorem benzodiazepiny. Inne występujące w tym kompleksie białka pełnią funkcje regulacyjne. Do białek oddziaływujących z poryną należą: kinazy kreatynowe, heksokinazy oraz kinazy glicerolowe. Od strony cytoplazmatycznej z kanałem mogą wiązać się także białka z rodziny Bcl-2 np.: Bcl-2 i Bax (Beutner i wsp., 1998, Wei i wsp., 2001, Shosan-Barmatz i Gincel 2003, Vyssokikh i Brdiczka 2003, Chandra i wsp., 2005, Gillies i Kuwana 2014). Otwarcie megakanałów mitochondrialnych powoduje wypływ z macierzy mitochondrialnej do cytozolu jonów wapnia oraz białek pro-apoptotycznych takich jak: cytochrom c, Smac/Diablo, HTRA2/OMI oraz czynnik indukujący apoptozę (AIF ang. apoptosis inducing factor) (Du i wsp., 2000, Verhagen i wsp., 2000, Martins i wsp., 2002, Cilenti i wsp., 2003). Uwolniony cytochrom c oddziałuje z białkiem Apaf-1 (ang. apoptosis protease-activating factor 1), zlokalizowanym przy błonie mitochondrialnej, zmieniając jego konformację co pozwala na związanie prokaspazy-9, a następnie jej aktywację. Proces ten odbywa się w kompleksie zwanym apoptosomem, którego zadaniem jest aktywacja kaspazy-9 inicjującej szlak mitochondrialny apoptozy, oraz na dalszym etapie kaspaz wykonawczych-3, -6 i -7 (Shi 2002, Reubold 2009,

Malladi i wsp., 2009, Bratton i Salvesen 2010, Yuan i Akey 2013). Aktywna kaspaza-3 doprowadza do degradacji polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1). Następuje wówczas zmniejszenie procesów naprawczych uszkodzonych nici DNA i poli(ADP-rybozylacja) białek docelowych. Produkty degradacji PARP-1 mogą również aktywować apoptozę (D'Amours i wsp., 2001). Z przeprowadzonych badań wynika, że w wyniku działania krótkołańcuchowego C2-ceramidu w warunkach *in vitro* dochodzi do aktywacji kaspaz wykonawczych i degradacji PARP-1 (Ito i wsp., 1999, Movsesyan i wsp., 2002, Stoica i wsp., 2003, Ardestani i wsp., 2013). Istnieją również doniesienia literaturowe stwierdzające brak skuteczności działania inhibitorów kaspaz w warunkach inkubacji z C2-ceramidem (Willaime i wsp., 2001, Kim i wsp., 2007).

Do czynników regulujących proces apoptozy poprzez wpływ na przepuszczalność zewnętrznej błony mitochondrialnej należą białka z rodziny Bcl-2.

W komórkach prawidłowych białka te znajdują się w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, siateczce śródplazmatycznej oraz w cytozolu. Białka te stanowią grupę onkogenów posiadających wspólny region, co najmniej jeden z czterech, które nazywane są domenami homologii z Bcl-2 (ang. Bcl-2 homology-BH): BH1, BH2, BH3, BH4. Dzielą się one na dwie podrodziny: białka anty-apoptotyczne (Bcl-2, Bcl-X_L, Mcl-1) oraz białka pro-apoptotyczne: Bax i Bak wykazujące homologię domen BH1, BH2 i BH3 oraz białka Bik, Bad, Bid, Bim, Hrk/DR5, Noxa, Puma, Bmf posiadające homologię tylko domeny BH3 (tzw. ang. BH3 only proteins). Białka Bcl-2 i Bcl-X_L tworzą heterodimery z białkami pro-apoptotycznymi poprzez wiązanie domen BH3. Białka pro-apoptotyczne Bax i Bak indukują apoptozę poprzez tworzenie kanałów w zewnętrznej błonie mitochondrialnej (Kuwana i Newmeyer 2003, Danial i Korsmeyer 2004, Brunelle i Letai 2009, Czabotar i wsp., 2011, 2013). Niezbędnym warunkiem do uformowania takiego kanału jest oligomeryzacja tych białek oraz translokacja z cytoplazmy do błony mitochondrialnej z udziałem białka Bid. Białko Bid powoduje zmiany konformacyjne białek Bax i Bak, co powoduje ich wbudowanie się do zewnętrznej błony mitochondrialnej (Lovell i wsp., 2008). Uważa się, że białka Bax i Bak mogą tworzyć kanały złożone z homomultimerów lub współdziałać z megakanalem mitochondrialnym poprzez oddziaływanie z kanałem anionowym zależnym od napięcia (ang. voltage dependent anion channel-VDAC) oraz z translokazą nukleotydów adeninowych (Shamas-Din i wsp., 2011, Dewson i wsp., 2008 i 2012, Happo i wsp., 2012, Roy i wsp., 2014).

Ekspresja białek z rodziny Bcl-2 w przebiegu apoptozy może być kontrolowana przez białko p53. Białko p53 w warunkach fizjologicznych występuje w formie nieaktywnej i jego stężenie w komórce utrzymywane jest na niskim poziomie. Pod wpływem czynników uszkodzających

DNA dochodzi do jego aktywacji przez oligomeryzację i fosforylację oraz do wzrostu poziomu białka p53. Białko p53 zatrzymuje wówczas cykl komórkowy na granicy przejścia z fazy G1 do S oraz w fazie G2, umożliwiając uruchomienie procesów naprawczych DNA. Jeśli naprawa DNA jest niemożliwa lub nieskuteczna białko p53 indukuje proces apoptozy (Pietsch i wsp., 2008). Aktywne białko p53 jako czynnik transkrypcyjny odpowiedzialne jest za wzrost ekspresji czynników pro-apoptotycznych związanych z mitochondrialną ścieżką apoptozy (np. białka z rodziny Bcl-2 takie jak: Bax, Bak, Noxa, Puma) (Miyashita i Reed 1995, Chipuk i wsp., 2005), jak również z receptorami śmierci (np. CD95, TRAIL-R1 i TRAIL-R2) (Haupt i wsp., 2003).

Białko p53 hamuje ekspresję białek anti-apoptotycznych takich jak: Bcl-2, Bcl-X_L, FLIP i surwiwina (Miyashita i wsp., 1994, Hoffman i wsp., 2002, Chi i wsp., 2014). Białko p53 wykazuje działanie apoptogenne *per se*, niezależnie od aktywności jako czynnika transkrypcyjnego (Chi i wsp., 2014). Akumulacja endogennego białka p53 w cytoplazmie prowadzi do aktywacji białka Bax, wzrostu przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej i apoptozy (Chipuk i wsp., 2004). Wykazano także, że białko p53 może tworzyć kompleksy z anti-apoptotycznymi białkami Bcl-2, Bcl-X_L, hamując w ten sposób ich działanie (Mihara i wsp., 2003).

Istnieje szereg białek sygnałowych, które ulegają aktywacji w wyniku oddziaływania z ceramidem. Mogą one inicjować kilka różnych niezależnych od siebie szlaków sygnałowych, które prowadzą do apoptozy. Akumulacja ceramidu w wyniku syntezy *de novo* lub hydrolizy sfingomieliny przy udziale obojętnej sfingomielinazy, jak również dodawane egzogenicznie ceramidy, powodują obniżenie lub zahamowanie aktywności kinazy białkowej Akt. Proces ten, jak pokazały liczne prace może być zależny od aktywacji kinazy białkowej C typu zeta (PKC ζ , atypowej niezależnej od Ca²⁺ lub diacyloglicerolu). Wykazano, że C6-ceramid powoduje aktywację PKC ζ , co w dalszej kolejności powoduje defosforylację Akt na Ser473 i Thr308 (fosforylacja obu tych miejsc jest konieczna do aktywacji Akt) (Powell i wsp., 2003). Kinaza białkowa PKC ζ hamuje również przyłączenie PtdIns(3,4,5)P₃ do domeny PH Akt, co jest warunkiem koniecznym do translokacji Akt z cytozolu do błony komórkowej poprzez fosforylację PtdIns(3,4,5)P₃ na Thr34 (Bourbon i wsp., 2000, 2002, Powell i wsp., 2003, Fox i wsp., 2007). Inne kinazy białkowe aktywowane przez ceramid to kinazy z grupy kinaz MAPK takie jak: JNK oraz p38 (Mazière i wsp., 2001, Kong i wsp., 2005, Kim i wsp., 2008). Ceramid wpływa na obniżenie fosforylacji kinazy Akt również poprzez aktywację fosfatazy białek PP2A (Dobrowsky i wsp., 1993). Aktywna fosfataza PP2A powoduje również defosforylację białek Bax i Bad, które stają się wówczas aktywnymi pro-apoptotycznymi

białkami. Towarzyszy temu defosforylacja białka Bcl-2, które traci swoje anty-apoptotyczne właściwości (Ruvolo i wsp., 1999, Xin i Deng 2006).

Wiele badań wskazuje, że ceramid i białko p53 współdziałają wzajemnie w indukcji apoptozy (Heffernan-Stroud i Obeid 2011, Hage-Sleiman i wsp., 2013). Wykazano, że ceramid przyczynia się do wzrostu poziomu białka p53. Również czynniki stresogenne powodujące wzrost poziomu p53 mogą, poprzez aktywację syntaz ceramidu i obojętnej sfingomielinazy, przyczynić się do wzrostu poziomu ceramidu (Jaffrezou i wsp., 1996, Kolettas i wsp., 2006, Panjarian i wsp., 2008, Deng i wsp., 2009). Jednakże istnieją również doniesienia, które pokazują, że ceramid nie powoduje wzrostu ekspresji białka p53 i, że białko to nie jest konieczne do indukcji apoptozy wywołanej przez ceramid (Yang i Duerksen-Hughes 2001, Hage-Sleiman i wsp., 2013).

Istnienie oddziaływań między mitochondriami, siateczką śródplazmatyczną i błoną plazmatyczną odgrywa istotną rolę w regulacji przekazywania sygnału w komórkach. Badania Stiban i wsp., (2007) wykazały, że ceramid powstający w siateczce śródplazmatycznej poprzez MAM (ang. mitochondria associated membranes) może translokować się do mitochondriów, powodując wzrost przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej. Jednakże, w wyizolowanych mitochondriach stwierdzono obecność dihydroceramidu w zewnętrznej i wewnętrznej błonie mitochondrialnej (Ardail i wsp., 2001). W związku z tym możliwa jest synteza *de novo* ceramidu w mitochondriach, co w konsekwencji powoduje indukcję apoptozy. Dalsze badania potwierdziły obecność syntaz ceramidu, jak również obojętnej sfingomielinazy i ceramidaz w mitochondriach (Shimeno i wsp., 1998, El Bawab i wsp., 2000, Birbes i wsp., 2001, Bionda i wsp., 2004, Yu i wsp., 2007, Wu i wsp., 2010). Ceramidy powodują zaburzenie homeostazy wapniowej (Pinton i wsp., 2001, Muriel i wsp., 2000), hamowanie kompleksów łańcucha transportu elektronów, zaburzenie potencjału obu błon mitochondrialnych (Arora i wsp., 1997, Ghafourifar i wsp., 1999), wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (Garcia-Ruiz i wsp., 1997, Quillet-Mary i wsp., 1997, France-Lanord i wsp., 1997, Di Paola i wsp., 2000) i w konsekwencji wpływ z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium białek indukujących apoptozę (Siskind i wsp., 2002, Di Paola i wsp., 2000 i 2004).

Jak wcześniej wspomniano, badania *in vitro* oraz *in vivo* pokazują, że ceramidy hamują łańcuch transportu elektronów. Eksperymenty Gudz i wsp., (1997) i Di Paola i wsp., (2000) pokazały, że C2-ceramid powoduje hamowanie kompleksu I, III i IV łańcucha oddechowego. Z kolei długołańcuchowe ceramidy takie jak C16 powodują hamowanie kompleksu IV.

Ze względu na swoją hydrofobowość ceramid może wpływać na właściwości błon komórkowych, powodując zmniejszenie ich płynności oraz szczelności. Ma to znaczenie w indukowanej przez ceramid apoptozie. Zarówno krótko jak i długołańcuchowe ceramidy powodują wzrost przepuszczalności zewnętrznej błony mitochondrialnej poprzez formowanie kanałów, które są przepuszczalne dla np. cytochromu c (Siskind i Colombini 2000, Siskind i wsp., 2002, Siskind i wsp., 2006, Colombini 2010). W formowanie tych kanałów zaangażowane jest pro-apoptotyczne białko Bax (Kim i wsp., 2001, von Haefen i wsp., 2002). Ceramid i białko Bax działają ze sobą synergistycznie, powodując wzrost przepuszczalności błony (Ganesan i wsp., 2010). Zjawisku temu zapobiega nadekspresja w komórkach białek anty-apoptotycznych Bcl-2 i Bcl-X_L (Zhang i wsp., 1996, Siskind i wsp., 2008, Perera i wsp., 2012). Translokacja białka Bax z cytozolu do mitochondrium wymaga aktywności kinazy JNK (Tsuruta i wsp., 2004). Krótko i długołańcuchowe ceramidy, poprzez aktywację szlaku kinaz MAPK oraz zahamowanie aktywności kinazy Akt, przyczyniają się do translokacji białka Bax (Kim i wsp., 2008).

Polimeraza poli(ADP-rybozy)

Polimeraza poli(ADP-rybozy) (PARP-1) (EC.2.4.2.30) jest enzymem jądrowym biorącym udział w naprawie uszkodzeń DNA i regulacji procesów transkrypcji (Krishnakumar i Kraus 2010, Virág i wsp., 2013). Jest to białko monomeryczne o masie cząsteczkowej w granicach 110-130kDa, u ssaków wynosi 113kDa. PARP-1 jest najlepiej poznanym członkiem rodziny PARP, w skład której wchodzi również m.in.: sPARP-1, PARP-2, PARP-3, tankyryza. PARP-1 zawiera trzy istotne dla swej funkcji domeny strukturalne: domenę N-końcową wiążącą DNA, zawierającą dwa palce cynkowe i umożliwiającą wiązanie do pojedynczej lub podwójnej nici DNA, a także sekwencje lokalizacji jądrowej (NLS – ang. nuclear localization sequence), domenę centralną automodyfikującą, która zawiera motyw BRCT, odpowiedzialny za interakcje na poziomie białko-białko oraz C-końcową domenę katalityczną, przeprowadzającą proces ADP-rybozylacji (Kameshita i wsp., 1984, Desmarais i wsp., 1991, D'Amours i wsp., 1999, Altmeyer i wsp., 2009). W komórkach prawidłowych podstawowa aktywność PARP-1 jest na niskim poziomie i ulega gwałtownemu, nawet 500-krotnemu wzrostowi, w warunkach stresu genotoksycznego i oksydacyjnego (de Murcia i de Murcia 1994). Enzym w wyniku aktywacji syntetyzuje poli(ADP-rybozę) (PAR) i powoduje ADP-rybozylację licznych białek takich jak: histony, polimerazy DNA 1 i 2, ligazy DNA, topoizomerazy, Ca^{2+} , Mg^{2+} zależna endonukleaza i sam PARP, który ulega autorybozylacji (D'Amours i wsp., 1999, Luo i Kraus 2012). Przyłączenie PAR zmniejsza powinowactwo PARP-1 do DNA i hamuje aktywność katalityczną enzymu (D'Amours i wsp., 1999). Białka modyfikowane przez PARP-1 zawierają motyw wiążący PAR, który często znajduje się w obrębie ich domen funkcjonalnych, odpowiedzialnych np. za wiązanie do DNA lub innych białek. Przyłączenie PAR może zatem modulować aktywność białek docelowych, ze względu na silnie ujemny ładunek i duży rozmiar polimeru (Kraus 2008, Krishnakumar i Kraus 2010, Schreiber i wsp., 2006).

PARP-1 odgrywa istotną rolę w regulacji aktywności licznych czynników transkrypcyjnych (np.: AP-1, AP-2) poprzez interakcje na poziomie białko-białko lub poprzez poli(ADP-rybozylację) czynnika transkrypcyjnego (np.: p53, NF- κ B) (Kraus 2008, Krishnakumar i Kraus 2010). W ten sposób PARP-1 może wpływać na ekspresję białek pro- i antyoksydacyjnych.

Modyfikacje potranslacyjne stanowią ważny mechanizm kontroli funkcji PARP-1 (Bürkle i Virág 2013). Badacze z zespołu Swansona (Kauppinen i wsp., 2006) stwierdzili korelację między szlakiem kinaz ERK1/2, a śmiercią neuronów i astrocytów zależną od PARP-1.

Zaobserwowali, że farmakologiczna inhibicja kinaz ERK1/2 zapobiegała aktywacji PARP-1 poprzez spadek poziomu PAR. Badania wykazały, że aktywacja PARP-1 indukowana przez ERK1/2 zachodzi poprzez fosforylację. PARP-1 może być fosforylowany również m.in. przez kinazę białkową C (PKC α i β) i kinazę JNK1 (Cohen-Armon 2007, Bürkle i Virág 2013). Oprócz fosforylacji, PARP-1 w warunkach stresu ulega acetylacji, a ta modyfikacja wzmacnia jej aktywność katalityczną. PARP-1 ulega modyfikacji przez acetylazy p300 i CBP (ang. cAMP-response element binding protein), co zwiększa zdolność tego enzymu do regulacji transkrypcji genów zależnych od NF- κ B (Bürkle i Virág 2013).

Badania wskazują, że nadmierna aktywacja enzymu PARP-1 powodowana występowaniem stresu oksydacyjnego ma udział w patomechanizmie wielu chorób w tym neurodegeneracyjnych, nowotworowych, niedokrwieniu, hipoglikemii (Suh i wsp., 2003, Strosznajder i wsp., 2003, 2005a, b, 2010, Kauppinen 2007, Strosznajder i wsp., 2012, Weaver i Yang 2013, Morales i wsp., 2014).

Dotychczas niezbadana jest jednak rola PARP oraz PAR w mechanizmach działania bioaktywnych sfingolipidów w procesach neurodegeneracji i neuroprotekcji.

Udział białka AIF i polimerazy poli(ADP-rybozy) w śmierci komórek

Oprócz ścieżki apoptozy związanej z aktywacją kaspazy-3, ważną rolę odgrywają również procesy kaspazo niezależne. Do czynników biorących udział w apoptozie niezależnej od aktywacji kaspaz należy białko AIF zidentyfikowane przez grupę Guido Kroemera (Susin i wsp., 1999). Białko AIF jest mitochondrialną flawoproteiną, która zaangażowana jest zarówno w procesy przeżycia jak i śmierci komórek. W warunkach fizjologicznych AIF odgrywa istotną rolę w fosforylacji oksydacyjnej, a w sytuacjach patologicznych może prowadzić do śmierci komórek niezależnej od kaspaz poprzez translokację do jądra komórkowego, kondensację chromatyny i fragmentację DNA. Następnie AIF wraz z innymi czynnikami, takimi jak cyklofilina A i endonukleaza G tworzy degradosom, który bierze udział w procesie fragmentacji DNA na charakterystyczne odcinki wielkości około 50 kbp (kilo par zasad) (Daugas i wsp., 2000, Modjtahedi i wsp., 2006), co prowadzi do apoptotycznej śmierci komórki (Yu i wsp., 2002, 2003, Cregan i wsp., 2004). AIF zakotwiczony jest w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. W budowie białka AIF wyróżnia się trzy funkcjonalne domeny: domenę wiążącą FAD, domenę wiążącą NADH oraz domenę C-kończącą. Dwie pierwsze z nich wykazują właściwości oksydoreduktazy NADH, natomiast domena C-kończąca wykazuje właściwości pro-apoptyczne (Susin i wsp., 1999). Na powierzchni białka AIF znajdują się dodatkowo naładowane aminokwasy, które oddziałują elektrostatycznie z DNA (Ye i wsp., 2002). Badania wykazały, że AIF ma większe powinowactwo do nici pojedynczej niż podwójnej i że wiele cząsteczek AIF wiąże się z kilkoma cząsteczkami DNA (ang. clustered fashion) (Vahsen i wsp., 2006). Zaproponowane zostały dwa hipotetyczne modele działania AIF w łańcuchu transportu elektronów. Pierwszy model zakłada, że AIF jest czynnikiem „integrującym” zaangażowanym w przenoszenie lub gromadzenie podjednostek białkowych kompleksu I, a także prawdopodobnie kompleksu III. Druga hipoteza przedstawia AIF jako czynnik utrzymujący, niezbędny do utrzymania oraz stabilności kompleksu I i III (Modjtahedi i wsp., 2006). AIF jest głównym czynnikiem prowadzącym do śmierci komórki w szlaku przekazywania związanego z polimerazą poli(ADP-rybozy). Badania dowodzą, że AIF (62kDa) umieszczony w wewnętrznej błonie mitochondrialnej ulega proteolizie do rozpuszczalnej postaci (57kDa), która może opuścić mitochondrium (Otera i wsp., 2005, Vosler i wsp., 2009). Stwierdzono, że za proteolizę białka AIF odpowiada występująca w przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (Heeres i Hergenrother 2007), zależna od Ca^{2+} proteaza – μ -kalpaina, do

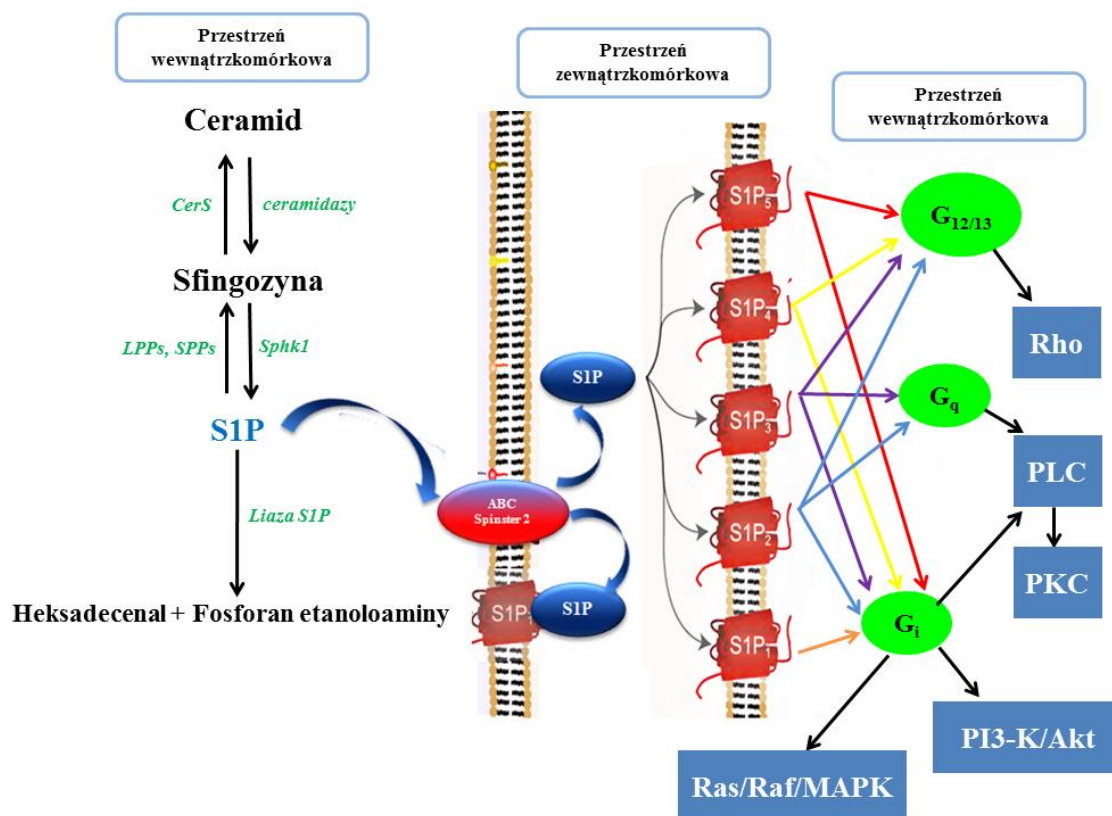
której aktywności wymagana jest podjednostka *capn4* oraz pro-apoptotyczne białko Bax (Moubarak i wsp., 2007). Białko Bax w postaci oligomerów formuje pory w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, przez które może być uwalniane białko AIF.

Przeprowadzone badania pokazują również, że endogenny AIF w komórkach mózgu zlokalizowany jest nie tylko w przestrzeni międzybłonowej mitochondrium lecz także pewna jego ilość (około 30%) znajduje się po cytozolowej stronie mitochondriów i luźno oddziałuje z zewnętrzną błoną mitochondrialną (Yu i wsp., 2009). W związku z tym możliwe jest, że to ta pula AIF, która nie ulega proteolizie, translokuje się do jądra komórkowego pod wpływem sygnału śmierci. Potwierdzają to dane, które sugerują brak konieczności aktywacji kalpajny w komórkach ulegających apoptozie z udziałem białka AIF (Yu i wsp., 2002, Joshi i wsp., 2009, Wang i wsp., 2009).

Istotne znaczenie w uwalnianiu białka AIF przypisuje się poli(ADP-rybozie) (PAR). PARP-1 katalizuje reakcje z βNAD^+ (dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy) i syntetyzuje polimery ADP-rybozy. W odpowiedzi na uszkodzenia DNA, komórka rozpoczyna procesy naprawcze. Następuje aktywacja PARP-1 i ADP-rybozylacja histonów, co prowadzi do ich uwolnienia z uszkodzonego DNA. Jednakże, kiedy dochodzi do masywnego uszkodzenia DNA, następuje nadmierna aktywacja PARP-1, co może prowadzić do wyczerpania βNAD^+ i ATP oraz śmierci komórek (Alano i wsp., 2010). Wykazano, że PAR przenosi informację między jądrem a mitochondrium i wpływa na uwalnianie białka AIF (Andrabi i wsp., 2006; Yu i wsp., 2006, Moubarak i wsp., 2007). Stwierdzono, że AIF posiada trzy domeny wiążące PAR, które są niezbędne do indukcji translokacji AIF do jądra komórkowego (Wang i wsp., 2011). Jednak dokładny mechanizm uwalniania AIF w odpowiedzi na związanie PAR nie jest do końca poznany.

Działanie sfingozyno-1-fosforanu za pośrednictwem błonowych receptorów sprzężonych z białkami G

Sfingozyno-1-fosforan może działać jako przekaźnik pierwszego rzędu za pośrednictwem błonowych receptorów (GPCR) sprzężonych z białkami G oznaczonych S1PR1 do S1PR5 w sposób autokryny lub parakryny oraz jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu (Schemat 3) (Blaho i Hla 2014, Takabe i Spiegel 2014). Głównym ligandem jest dla nich S1P oraz wykazujący mniejsze powinowactwo dihydro-S1P (Pyne i Pyne, 2002, 2011). S1P syntetyzowany wewnątrz komórek może dotrzeć do receptorów na powierzchni błony za pomocą białek transportowych zawierających kasetę wiążącą ATP z rodziny ABC (ABC1, ABCG2, ABCA1) (van Meer i Lisman 2002) oraz białka Spinster 2 (SPNS2), które należy do super-rodziny transporterów błonowych (ang. major facilitator superfamily, MFS) (Osborne i wsp., 2008, Hisano i wsp., 2012, Nagahashi i wsp., 2013).



Schemat 3. Synteza i mechanizm działania sfingozyno-1-fosforanu wg. Obinata i Hla 2012. Objaśnienia skrótów: Cer-syntazy ceramidu, LPPs- fosfohydrolazy o szerokiej specyficzności substratowej, SPPs-fosfatazy dla S1P, Sphk1-kinaza sfingozyny typu 1, Rho, Ras-białka należące do rodziny małych białek G, MAPK-kinazy aktywnowane mitogenami, Akt-kinaza białkowa B, PI3-K-kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, PKC-kinaza białkowa C, PLC-fosfolipaza C.

Receptor S1PR1 sprzężony jest z białkiem $G_{i/o}$, receptor S1PR2 i S1PR3 z białkami $G_{i/o}$, G_q , oraz $G_{12/13}$, natomiast receptor S1PR4 i S1PR5 z białkami $G_{i/o}$ oraz $G_{12/13}$. Receptor będąc związany z białkiem $G_{i/o}$, hamuje aktywność cykazy adenylanowej i zmniejsza stężenie cAMP w komórce, aktywuje białko Ras, które stymuluje serynowo-treoninową kinazę Raf, a następnie kaskadę tzw. kinaz MAPK. Kinazy MAPK pośredniczą w przekazywaniu sygnałów związanych z procesami, takimi jak: proliferacja, różnicowanie, przeżycie, śmierć i transformacja nowotworowa (Walker i wsp., 2013, Tournier 2013, Koul i wsp., 2013). Przez podjednostkę β/γ białka $G_{i/o}$ aktywowana jest fosfolipaza C typu β , która jest również aktywowana przez podjednostkę α białka G_q . Zaktywowany enzym działa hydrolitycznie na fosfolipid $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$. W wyniku hydrolizy powstają dwa wtórne przekaźniki informacji: InsP_3 i 1,2-diacylglicerol (DAG) oraz następuje zwiększenie poziomu wolnych jonów wapnia w komórce. $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$ może ulegać także fosforylacji pod wpływem kinazy PI3-K. Powstaje wówczas $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$, który rekrutuje z cytoplazmy do błony plazmatycznej nieaktywną kinazę Akt i wiążąc się z nią umożliwia jej fosforylację a przez to aktywację. Szlak sygnałowy włączający PI3-K/Akt pełni istotne funkcje w procesach pro-życiowych (Polivka i Janku 2014). Białko $G_{i/o}$ oraz $G_{12/13}$ aktywują małe białka G-Rho (Schemat 3) (Nowak i wsp., 2008, Klimaszewska i wsp., 2011).

Receptory S1PR1-S1PR5 są obecne w wielu komórkach organizmu. Obecność S1PR1, S1PR 2 i S1PR3 stwierdzono w mózgu, sercu, płucach, śledzionie i wątrobie. W mniejszym stopniu receptory te zlokalizowane są w nerkach, mięśniach i grasicy. S1PR4 występuje głównie w tkankach limfatycznych (grasicy, śledzionie, węzłach chłonnych) oraz w płucach. S1PR5 jest obecny głównie w układzie nerwowym (Sanchez i Hla 2004).

W neuronach i mikrogleju zlokalizowane są receptory: S1PR1, S1PR2 S1PR3, w oligodendrocytach znajdują się S1PR1, S1PR3 oraz S1PR5, a w astrocytach występują S1PR1 i S1PR3 (Mehling i wsp., 2011). S1P poprzez zależne od pobudzenia receptorów szlaki przekaźnictwa informacji zaangażowany jest w procesy przeżycia, proliferacji, różnicowania komórek, organizację cytoszkieletu oraz komunikacji między komórkami (Hait i wsp., 2006, Chalfant i wsp., 2005, Strub i wsp., 2010). S1P wpływa na morfologię neurytów, reguluje podstawowe funkcje neuronów oraz sekrecję neuroprzekaźników m. in. glutaminianu (Kajimoto i wsp., 2007, Okada i wsp., 2009).

Znaczenie ceramidu/S1P w wybranych stanach patologicznych

Istnienie ścieżki, której kolejne metabolity mają przeciwstawne pro- i anty-apoptotyczne działanie (ceramid/S1P) sugeruje, iż zachwianie jej regulacji może mieć niezwykle istotne znaczenie w wielu procesach patologicznych. Stwierdzono, że zaburzenie biostatu ceramid/S1P obserwowane jest m.in. w niedotlenieniu/niedokrwieniu mózgu (Tian i wsp., 2009), w chorobach neurodegeneracyjnych (Katsel i wsp., 2007, Haughey i wsp., 2010, Filippov i wsp. 2012, Ceccom i wsp., 2014, Couttas i wsp., 2014), w procesie nowotworzenia (Ogretmen i Hannun 2004, Ponnusamy i wsp., 2010, Oskouian i Saba 2010, Kunkel i wsp., 2013), w stwardnieniu rozsianym (Jana i Pahan 2010, van Doorn i wsp., 2012, Podbielska i wsp., 2012, Davies i wsp., 2013) oraz w hiperglikemii (Car i wsp., 2012, Larsen i Tennagels 2014).

Choroba Alzheimerera

Z przeprowadzonych badań wynika, że źródłem ceramidów w patologii choroby Alzheimerera (ChA) jest hydroliza sfingomieliny i synteza *de novo*. Zaobserwowano, że peptydy amyloidu beta (A β) indukują apoptozę poprzez aktywację kwaśnej i obojętnej sfingomielinazy przyczyniając się w ten sposób do wzrostu poziomu ceramidów (Ayasolla i wsp., 2004, Lee i wsp., 2004, Zeng i wsp., 2005, Malaplate-Armand i wsp., 2006, Gomez-Brouchet i wsp., 2007). Badania pokazują również możliwość aktywacji palmitylotransferazy serynowej przez peptydy A β , w wyniku czego dochodzi do wzrostu poziomu ceramidów na drodze syntezy *de novo* (Cutler i wsp., 2004, Geekiyanage i wsp., 2013).

Wzrost stężenia ceramidów i spadek poziomu S1P obserwowano w mózgach *post mortem* pacjentów chorych na ChA (Cutler i wsp., 2004, He i wsp., 2010, Filippov i wsp. 2012, Ceccom i wsp., 2014, Couttas i wsp., 2014). Stężenie ceramidów badane w płynie mózgowo-rdzeniowym osób z ChA było prawie dwukrotnie wyższe w porównaniu z grupą kontrolą (Satoi i wsp., 2005). He i wsp., (2010) wykazali podwyższony poziom kwaśnej sfingomielinazy w mózgach *post mortem* pacjentów z ChA w porównaniu ze zdrowymi mózgami osób starszych. Prowadziło to do wzrostu ilości ceramidów. Ponadto zaobserwowano wzrost aktywności kwaśnej ceramidazy, co skutkowało wzrostem poziomu sfingozyny, jednak ilość protekcyjnego sfingozyno-1-fosforanu ulegała obniżeniu. Autorzy postulują, że S1P jest rozkładany przez liazy lub defosforylowany przez fosfatazy. Badania *post mortem* wykazały także zmiany w aktywności kinaz sfingozyny. Couttas i wsp., (2014) pokazali spadek poziomu S1P w próbkach pobranych z rejonu CA1 hipokampa oraz z dolnego zakrętu skroniowego istoty szarej i białej *post mortem* od ludzi chorych na ChA.

Stwierdzono również wzrost poziomu ceramidów głównie C16, spadek aktywności kinaz sfingozyny 1 i 2 oraz wzrost aktywności fosfataz SPP1 i SPP2. Badania Ceccom i wsp., (2014) pokazały spadek immunoreaktywności kinazy sfingozyny 1, receptora 1 dla S1P oraz wzrost dla liazy S1P w próbkach pobranych z kory czołowej oraz śródwęchowej *post mortem* od ludzi chorych na ChA.

Stwardnienie rozsiane

Fingolimod (Gilenya) jest lekiem stosowanym w monoterapii do modyfikacji przebiegu postaci rzutowo-remisyjnej stwardnienia rozsianego. Fingolimod ulega fosforylacji przez kinazę sfingozyny typu 2 do aktywnego metabolitu fosforanu fingolimodu, który jest modulatorem receptorów dla S1P. Fingolimod powoduje zatrzymanie autoreaktywnych limfocytów T w węzłach chłonnych. Ponadto wykazuje również bezpośrednio neuroprotekcjne działanie na ośrodkowy układ nerwowy. Podany doustnie ma zdolność do przekraczania bariery krew-mózg i działania na receptory S1P w mózgu (Miron i wsp., 2008, 2009, Hla i Brinkmann 2011, Pinschewer i wsp., 2011).

W próbkach pobranych *post mortem* od pacjentów ze stwardnieniem rozsianym stwierdzono wzrost poziomu ceramidów. Zaobserwowano wzrost proporcji ceramidów C16/C24 oraz C18/C24 w porównaniu do próbek pobranych od zdrowych pacjentów (van Doorn i wsp., 2012). Stwierdzono również wzrost ekspresji kwaśnej sfingomielinazy w astrocytach. W mikrogleju wykazano wzrost ekspresji kwaśnej ceramidazy, kinazy sfingozyny 2 – enzymów biorących udział w degradacji ceramidu oraz fosfatazy S1P (SPP2) – enzymu rozkładającego protekcyjny S1P.

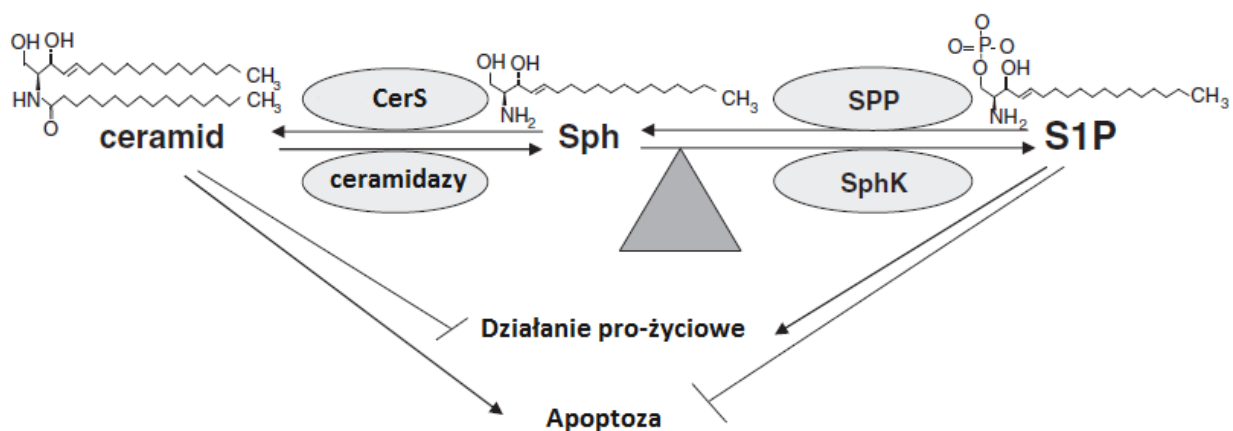
Proces nowotworzenia

Czynniki stresogenne np. TNF- α , chemioterapeutyki, hipo-i hiperglikemia wpływają na poziom ceramidu, co sugerowałoby, że w komórkach nowotworowych może dochodzić do wzmożonej produkcji ceramidów (Nikolova-Karakashian i Rozenova 2010). Ceramid powinien jako cząsteczka pro-apoptotyczna przyczyniać się do indukcji procesów śmierci komórek, jednak komórki nowotworowe charakteryzują się znaczną opornością na apoptozę. Biorąc ten fakt pod uwagę należy przypuszczać, że w komórkach nowotworowych istnieją mechanizmy, które powodują zmniejszenie poziomu ceramidu lub umożliwiają im przeżycie w warunkach wysokiego stężenia tego sfingolipidu. Jednym z mechanizmów wpływających na zmniejszenie poziomu ceramidu jest jego glikozylacja i galaktozylacja. Wzrost poziomu glikozyloceramidu i galaktozyloceramidu związany jest z wystąpieniem zjawiska oporności wielolekowej (Liu i wsp., 2001, Ogretmen i Hannun 2004, Gouaze-Andersson i Cabot 2006,

Giussani i wsp., 2012, Owczarek i wsp., 2013). W komórkach nowotworowych dochodzi również do wzrostu ekspresji kinazy sfingozyny 1, która uważana jest za onkogen, a tym samym do wzmożonej syntezy anty-apoptotycznego S1P (Pitson i wsp., 2005, Vadas i wsp., 2008, Pyne i Pyne 2010, Kunkel i wsp., 2013). Reasumując podawane egzogennie ceramidy i zwiększanie puli endogennych ceramidów oraz hamowanie metabolizmu ceramidów stwarza możliwości rozwinięcia skutecznej strategii przeciwnowotworowej (Barth i wsp., 2011).

Założenia i cel pracy

Należy zwrócić uwagę, że w ostatnim dziesięcioleciu dokonał się ogromny postęp w zrozumieniu funkcji bioaktywnych sfingolipidów takich jak: ceramid i sfingozyno-1-fosforan oraz enzymów biorących udział w ich metabolizmie w regulacji wielu procesów komórkowych. Dotychczasowe prace wykazały, że ceramid i sfingozyna odgrywają ważną rolę w procesach hamowania wzrostu i indukcji śmierci komórki, natomiast ich aktywny metabolit S1P pełni w komórce funkcję pro-życiową, stymulując wzrost komórki i hamując jej apoptozę (Schemat 4).



Schemat 4. Model biostatu ceramid/S1P wg Van Brocklyn i wsp., 2012.

Objaśnienia skrótów: CerS-syntazy ceramidu, SPP-fosfataza dla S1P, SphK-kinaza sfingozyny, Sph-sfingozyna, S1P-sfingozyno-1-fosforan.

Mimo intensywnych badań w tym zakresie, wiele zagadnień pozostaje nadal nie do końca wyjaśnionych. Uzasadnione jest więc podjęcie prac badawczych dotyczących roli ceramidu oraz S1P w molekularnych mechanizmach przeżycia i śmierci komórek. Udział polimerazy poli(ADP-rybozy) w mechanizmie śmierci komórek indukowanej ceramidem jest tematem dotychczas nie poruszonym w bogatym piśmiennictwie dotyczącym ceramidu.

W związku z tym celem pracy było: zbadanie jakie procesy molekularne oraz szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego biorą udział w śmierci komórek ludzkiej *neuroblastoma* SH-SY5Y wywołanej działaniem ceramidem, z uwzględnieniem udziału enzymu jądrowego polimerazy poli(ADP-rybozy). Ponadto zbadanie mechanizmu protekcyjnego działania S1P oraz agonistów receptorów dla S1P w stresie oksydacyjnym wywołanym działaniem ceramidem.

Realizacja projektu przebiegała z uwzględnieniem następujących zadań szczegółowych:

- Wpływ egzogenego C2-ceramidu na przeżywalność komórek SH-SY5Y i indukcję stresu oksydacyjnego.
- Zbadanie roli polimerazy poli(ADP-rybozy) oraz udziału kinaz ERK1/2, PKC, JNK i białka p53 w mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y.
- Określenie roli szlaku przekazywania sygnału PI3-K/Akt/GSK3 β w zależnej od PARP-1/PAR/AIF śmierci komórek SH-SY5Y.
- Analiza wpływu zahamowania aktywności PARP-1 na ekspresję genów/immunoreaktywność dla pro- i anti-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 oraz na śmierć komórek SH-SY5Y.
- Analiza wpływu ceramidu na enzymy metabolizujące S1P oraz zbadanie roli egzogenego sfingozyno-1-fosforanu (S1P) w stresie oksydacyjnym wywołanym ceramidem.
- Badanie wpływu S1P na szlak przekazywania sygnału zależnego od PI3-K/Akt.
- Analiza wpływu S1P na ekspresję genów/immunoreaktywność dla pro- i anti-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 oraz na przeżywalność komórek SH-SY5Y.

Materiały i Metody

Komórkowy model badawczy

Komórki neuroblastoma SH-SY5Y

Badania dotyczące mechanizmów przeżycia i śmierci komórek prowadzono z wykorzystaniem linii komórek ludzkich *neuroblastoma* (nerwiak płodowy współczulny, nowotwór wywodzący się z komórek cewy nerwowej) SH-SY5Y. Linia komórek SH-SY5Y jest trzykrotnym klonem linii komórkowej *neuroblastoma* SK-N-SH, która została wyizolowana z materiału biopsyjnego pochodzącego ze szpiku kostnego pacjenta z nerwiakiem płodowym we wczesnych latach 70 XX wieku (Biedler i wsp., 1973). Komórki SH-SY5Y to stosunkowo jednorodna linia komórek o neuronalnym fenotypie (Ciccarone i wsp., 1989, Tieu i wsp., 1999, Xie i wsp., 2010). Komórki te wykazują aktywność enzymów takich jak: hydroksylaza tyrozynowa, β -hydroksylaza dopaminy i charakteryzują się możliwością syntezy amin katecholowych (dopaminy, noradrenaliny) (Oyarce i Fleming 1991). Wykazują również ekspresję receptorów opioidowych i muskarynowych oraz receptorów dla neuronalnych czynników wzrostu. Komórki SH-SY5Y są szeroko stosowanym modelem badawczym w doświadczeniach *in vitro* nad molekularnymi mechanizmami prowadzącymi do przeżycia lub śmierci ze szczególnym uwzględnieniem procesów neurotoksyczności i neuroprotekcji (Bir i wsp., 2014, Banerjee i wsp., 2014, Law i wsp., 2014, Petroni i wsp., 2013, Wong i wsp., 2012, Rhein i wsp., 2009). Komórki SH-SY5Y hodowane były w pożywce MEM/F12 Ham (1:1) (Minimum Essential Medium Eagle/Nutrient Mixtures) (Sigma – Aldrich) z dodatkiem 15% płodowej surowicy bydlęcej (FBS, ang. fetal bovine serum) inaktywowanej w 56°C, 2 mM glutaminy i antybiotyków (50 jednostek/ml penicyliny, 50 μ g/ml streptomycyny). Hodowlę prowadzono w sterylnych jednorazowych plastikowych szalkach w inkubatorze w temperaturze 37°C, w atmosferze nasyconej parą wodną i zawierającej 5% CO₂. Morfologię komórek w trakcie hodowli, a następnie po podaniu wybranych związków chemicznych w tym farmakologicznie czynnych obserwowano w mikroskopie świetlnym Olympus CKX41.

Zastosowane warunki doświadczalne

Do eksperymentów stosowano komórki między 5 a 12 pasażem. Po 24 godzinach od wysiania komórek na odpowiednie szalki, pożywki hodowlane wymieniano na pożywki zawierające 2% FBS oraz 2 mM glutaminę i antybiotyki w stężeniach takich jak w mediach hodowlanych. Następnie komórki traktowano C2-ceramidem (N-acetylo-D-erytro-sfingozyna), sfingolipidem mającym właściwości przechodzenia przez błony komórkowe oraz badanymi związkami i inkubowano w czasie 0-24 godz. w temperaturze 37°C. Odpowiednie inhibitory, sfingozyno1-fosforan i agoniści/antagoniści receptorów dla S1P, dodawano 1 godz. przed podaniem C2-ceramidu.

Kontrolami w prowadzonych doświadczeniach były komórki SH-SY5Y:

- nie poddane działaniu C2-ceramidu.
- poddane działaniu nieaktywnego C2-dihydroceramidu (D-erytro-N-acetylosfinganina).
- traktowane stosowanymi w doświadczeniach związkami bez udziału C2-ceramidu.
- poddane działaniu odpowiednich rozpuszczalników takich jak: DMSO i etanol.

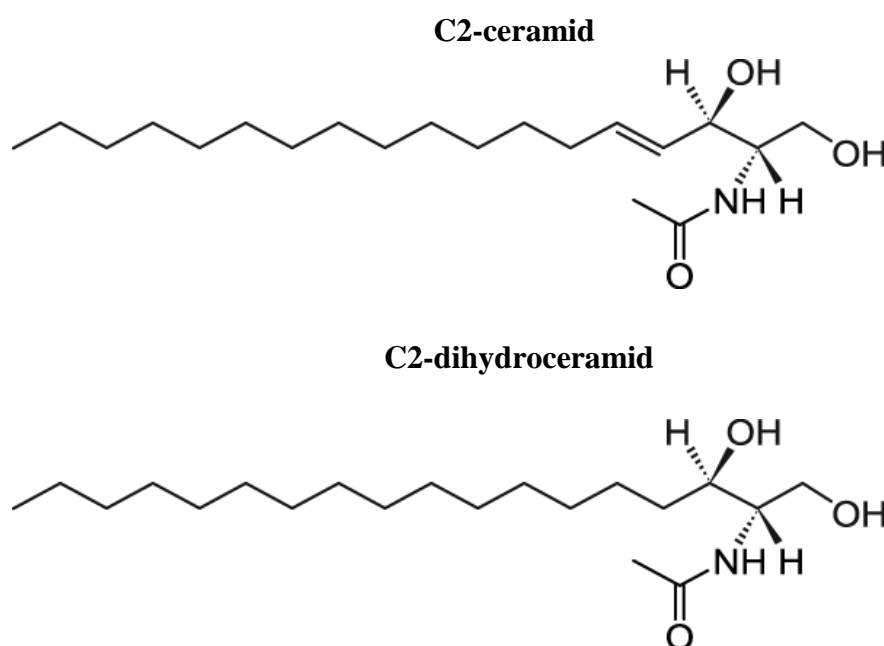
Nie stwierdzono wpływu stosowanych rozpuszczalników na przeżywalność komórek SH-SY5Y i poziom wolnych rodników.

Do zaplanowanych doświadczeń komórki wysiewano z gęstością $1-1,5 \times 10^6$ komórek na szalkę o średnicy 10cm lub 1×10^4 do dołka na płytce 96-dołkowej pokrytej kolagenem.

Charakterystyka i wzory chemiczne stosowanych związków

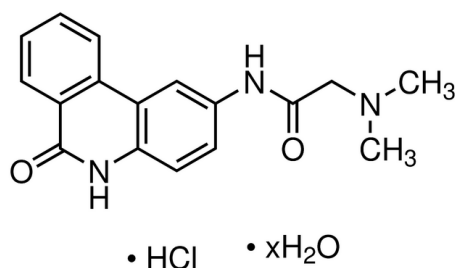
W prowadzonych badaniach stosowano następujące związki, których stężenia zostały wybrane na podstawie dostępnej literatury:

- 1) C2-ceramid (N-acetylo-D-erythro-sfingozyna), Enzo Life Sciences. Stosowany w stężeniu 25 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 2) C2-dihydroceramid (D-erythro-N-acetylosfinganina), Enzo Life Sciences. Stosowany w stężeniu 25 μ M i rozpuszczony w DMSO.



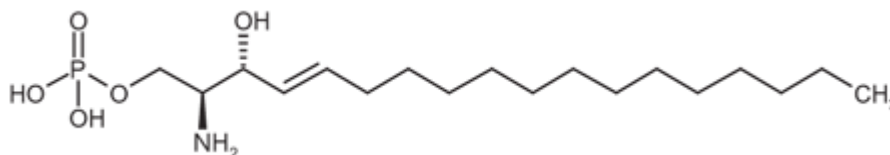
Schemat 5. Wzory chemiczne C2-ceramidu i C2-dihydroceramidu.

- 3) Staurosporyna (STS, Sigma – Aldrich). Stosowana *in vitro* w celu aktywacji procesu apoptozy zależnej od kaspaz. Rozpuszczona w wodzie i stosowana w stężeniu 100nM
- 4) Inhibitor PARP-1 - PJ-34, Sigma – Aldrich. Stosowany w stężeniu 20 μ M i rozpuszczony w wodzie.



Schemat 6. Wzór chemiczny inhibitora PJ-34.

- 5) Inhibitor megakanálu mitochondrialnego – cyklosporyna A, R&D Systems. Stosowana w stężeniu 2 μ M i rozpuszczona w etanolu
- 6) Inhibitor białka p53 – pifinitryna- α , Sigma – Aldrich. Stosowana w stężeniu 20 μ M i rozpuszczona w DMSO.
- 7) Inhibitor pan kaspaz – Z-VAD-FMK, R&D Systems. Stosowany w stężeniu 20 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 8) Inhibitor PI3-K/Akt – LY294002, Sigma – Aldrich. Stosowany w stężeniu 50 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 9) Sfingozyno-1-fosforan, Enzo Life Sciences. Stosowany w stężeniu 1 μ M i rozpuszczony w 4% BSA .



Schemat 7. Wzór chemiczny stosowanego w doświadczeniach S1P.

- 10) Agonista receptorów dla S1P – pFTY720 (S1PR1, S1PR3, S1PR4 i S1PR5), Cayman Biochemicals. Stosowany w stężeniu 100pM i rozpuszczony w DMSO.
- 11) Agonista receptora S1PR1 – SEW2871, Cayman Biochemicals. Stosowany w stężeniu 10 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 12) Antagonista receptora S1PR1 – W123, Cayman Biochemicals. Stosowany w stężeniu 20 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 13) Antagonista receptora S1PR1 i S1PR3 – VPC 23019. Stosowany w stężeniu 1 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 14) Inhibitor kinazy ERK1/2 – UO126, Sigma – Aldrich. Stosowany w stężeniu 1 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 15) Inhibitor kinazy JNK – SP600125, Sigma – Aldrich. Stosowany w stężeniu 5 μ M i rozpuszczony w DMSO.
- 16) Inhibitor kinazy białkowej C (PKC) – GF109203x, Sigma – Aldrich. Stosowany w stężeniu 1 μ M i rozpuszczony w DMSO.

Przygotowanie materiału do doświadczeń i analiz

Komórki na szalkach płukano dwukrotnie za pomocą PBS, zawieszano w komercyjnym buforze do lizy komórek firmy Cell Signalling Technology (#9803) zeskrobywano z szalek i sonifikowano. Tak przygotowany materiał przechowywano w temperaturze -20°C i używano do oznaczeń immunochemicznych (western blot).

Otrzymywanie frakcji podkomórkowych

Przygotowanie frakcji podkomórkowych odbywało się wg metody opisanej przez Wang i wsp., (2004). Komórki hodowane na szalkach o średnicy 10cm płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zawieszano w buforze hipotonicznym zawierającym 10mM Tris-HCl pH 7,4, 10mM KCl, 1,5mM MgCl₂, 1mM EDTA, 1mM EGTA, 1mM DTT i mieszaninę inhibitorów proteaz Complete (Roche Diagnostics).

Po 5 minutowej inkubacji w temperaturze 4°C w w/w buforze, komórki homogenizowano za pomocą strzykawki, przeciągając tłok strzykawki 12 razy, co ustalono kontrolując jakość homogenizacji pod mikroskopem. Homogenat wirowano 10 min. z przyspieszeniem 500 x g w temperaturze 4°C. Osad (P1) zawierający zgrubną frakcję jądrową zawieszano w 25mM buforze Tris-HCl o pH 7,4 z inhibitorami proteaz Complete. Supernatant (S1) wirowano przez 15 min. z przyspieszeniem 15000 x g w temperaturze 4°C, do otrzymania frakcji mitochondrialnej (P2) i cytozolowej (S2). Uzyskany w ten sposób materiał przechowywano w w temperaturze -20°C i używano do oznaczania białek metodą western blot.

Metody spektrofotometryczne

Oznaczanie zawartości białka

Zawartość białka w preparacie oznaczano metodą Lowry'ego przy użyciu fenolowego odczynnika Folina (Lowry i wsp.,1951).

Analiza przeżywalności komórek za pomocą testu MTT

Test MTT jest ilościowym kolorymetrycznym testem. Aktywne metabolicznie komórki mogą przekształcać w mitochondriach sole tetrazolowe o zabarwieniu żółtym do nierozpuszczalnego w wodzie formazanu o zabarwieniu fioletowym. Powstałe kryształki rozpuszczane są w DMSO. Sole tetrazolowe są redukowane do formazanu dzięki działaniu dehydrogenazy bursztynianowej.

Komórki SH-SY5Y wysiewano na szalki 96-dołkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia pożywkę wymieniano na taką z niską zawartością surowicy (2% FBS) i dodawano

C2-ceramid oraz odpowiednie związki. Po 24 godz. medium hodowlane wymieniano ponownie na pozbawione surowicy, dodawano MTT (0,25mg/ml) i inkubowano przez 2 godz. w temperaturze 37°C. Następnie pożywkę usuwano, a komórki rozpuszczano w DMSO i mierzono spektrofotometrycznie ich absorbancję przy długości fali 595nm za pomocą czytnika do mikropłytek BioRad.

Analiza poziomu wolnych rodników w cytozolu komórek przy użyciu sondy fluorescencyjnej DCF

Poziom wolnych rodników w komórkach SH-SY5Y badano na podstawie reakcji przekształcenia dwuocianu 2',7-dichlorofluoresceiny (H2DCF-DA), na skutek wewnątrzkomórkowej deacetylacji, do 2',7-dichlorofluorescyny (DCFH), która następnie jest utleniana przez wolne rodniki do fluorescencyjnej 2',7-dichlorofluoresceiny (DCF) (Royall i Ischiropoulos 1993). Komórki SH-SY5Y wysiewano na szalki 96-dółkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FBS) i dodawano C2-ceramid oraz odpowiednie związki. Po 24 godz. pożywkę usuwano i dodawano bufor Hank's (Sigma – Aldrich), a następnie 10µM H2DCF-DA (Sigma – Aldrich) i inkubowano przez 50 min. w temperaturze 37°C. Fluorescencję mierzono przy użyciu czytnika FLUOstar Omega przy długości fali pobudzenia 488nm i emisji 525nm.

Skład buforu Hank's: CaCl₂ x 2H₂O – 0.185g/l, MgSO₄ (bezwodny) – 0.09767g/l, KCl – 0.4g/l, KH₂PO₄ (bezwodny) – 0.06g/l, NaHCO₃ – 0.35g/l, NaCl – 8.0g/l, Na₂HPO₄ (bezwodny) – 0.04788 g/l, D-Głukoza – 1.0g/l.

Oznaczanie stopnia cytotoksyczności C2-ceramidu za pomocą testu LDH

Test LDH służy do oceny stopnia toksyczności badanej substancji względem komórek przylegających do podłoża. Do przeprowadzenia testu użyto komercyjnego zestawu odczynników firmy BioVision. Metoda ta oparta jest na reakcjach enzymatycznych, w wyniku których powstaje barwny produkt oznaczany spektrofotometrycznie. Dehydrogenaza mleczanowa (LDH) jest enzymem cytozolowym, który w warunkach fizjologicznych nie jest uwalniany do środowiska. Uszkodzenie mechaniczne błony plazmatycznej oraz śmierć komórki powoduje uwolnienie LDH z komórek. Komórki SH-SY5Y wysiewano na szalki 96-dółkowe pokryte kolagenem. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FBS) i dodawano C2-ceramid. Po 24 godz. inkubacji z C2-ceramidem, komórki wirowano przy 600 x g przez 10 min. Następnie klarowny roztwór pożywki przeniesiono do 96-dółkowej płytki i dodawano po 100µl mieszaniny reakcyjnej

LDH. Po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej mierzono absorbancję przy 450nm.

Oznaczenie aktywności kinazy sfingozyny 1

Oznaczenie aktywności kinazy sfingozyny 1 przeprowadzono zgodnie z metodą opisaną przez Billich i Etmayer (2004) oraz Takasugi i wsp., (2011). Komórki SH-SY5Y wysiewano na szalki o średnicy 10cm. Następnego dnia pożywkę wymieniano na pożywkę z niską zawartością surowicy (2% FBS) i dodawano C2-ceramid. Po odpowiednio 3 godz. i 24 godz. inkubacji, komórki przemywano PBS i zawieszano w buforze o składzie: 50mM HEPES, pH 7,4, 10mM KCl, 15mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 20% glicerol, 2mM ortowanadian, 2mM DTT, 10mM NaF, 1mM deoksyrydoksyna i inhibitory proteaz Complete. Następnie komórki poddano lizie w cyklu zamrażania-rozmrażania i dodatkowo homogenizowano strzykawką, przeciągając tłok strzykawki 12 razy. W dalszej kolejności komórki wirowano przy 15000 obr/min przez 5 min. Osad odrzucano, a w nadsączu oznaczono białko metodą Lowry'ego. Do reakcji pobierano równą ilość białka (80-100µg) z nadsączu i dodano NBD-sfingozynę (10µM w mieszaninie reakcyjnej, Avanti Polar Lipids). Pozostały skład buforu reakcyjnego to: 50mM HEPES pH 7,4, 15mM MgCl₂, 0,5mM KCl, 10% glicerol i 2mM ATP. Inkubację prowadzono przez 30 minut w temperaturze 30°C (100µl objętość mieszaniny reakcyjnej). Reakcje zatrzymano przez dodanie 100µl 1M fosforanu potasu pH 8,5, a następnie przez dodanie 2,5 raza więcej mieszaniny chloroform / metanol (2:1). Następnie mieszaninę wirowano przy 15000 obr/min przez 1 minutę. Po przeprowadzonej ekstrakcji pobierano górną fazę wodną, gdyż w niej znajduje się NBD-S1P. Po dodaniu równej objętości dimetyloformamidu fluorescencję mierzono przy użyciu czytnika FLUOstar Omega przy długości fali pobudzenia 485nm i emisji 538nm

Metody radiochemiczne oznaczania aktywności enzymów

Oznaczenie aktywności polimerazy poli (ADP-rybozy)

Aktywności PARP-1 badano w homogenacie komórek SH-SY5Y zgodnie z metodą opisaną przez Strosznajder i wsp., 2011. Homogenat inkubowano przez 30 min. w łaźni wodnej w temperaturze 37°C. Po inkubacji oznaczano aktywność PARP-1 przy użyciu radioaktywnego substratu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego ([¹⁴C] NAD). Mieszanina reakcyjna w końcowej objętości 100µl zawierała 200µM (4x10⁵ dpm) [Ade-U ¹⁴C] NAD (Amersham Biosciences), 100mM Tris-HCl pH 8,0, 10mM MgCl₂, 5mM DTT oraz 50-100µg białka homogenatu. Reakcję przeprowadzano przez 1 min. w temperaturze 37°C. Reakcję

zatrzymywano poprzez dodanie 0,8ml 25% zimnego kwasu trójchlorooctowego (TCA). Następnie próby przesączano pod ciśnieniem stosując filtry Whatman GF/B i pięciokrotnie przepłukiwano 3ml 5% TCA. Radioaktywność poli(ADP-rybozy) oznaczano w scyntylatorze Braya w liczniku scyntylacyjnym LKB Wallac 1409 stosując czas zliczania 5 min.

Metody immunochemiczne

Immunodetekcja białek metodą western blot

Immunochemiczną metodą western blot oznaczano poziom AIF, Akt (pSer473), Akt, Bad (pSer136), Bad, GSK3 β , Bcl-2, PAR, GAPDH oraz β -aktyny. Homogenat (40-60 μ g białka) mieszano z buforem denaturującym Laemmli o składzie: 62,5mM Tris-HCl pH 6,8, 2% SDS, 100 mM DTT, 20% glicerol i 0,2% błękit bromofenolowy. Próbkę następnie ogrzewano przez 5 min. w temp. 95°C. Białka rozdzielano na żelu poliakrylamidowym i przenoszono na błonę PVDF (Amersham Biosciences). Po wykonaniu barwienia białek za pomocą roztworu Ponceau S, membranę płukano w odpowiednim buforze (Tabela nr. 1), a następnie inkubowano w roztworze odtłuszczonego mleka lub BSA (Sigma – Aldrich) w temperaturze pokojowej przez 60 min., w celu zablokowania niespecyficznego wiązania się przeciwciał (szczegółowe warunki reakcji dla poszczególnych białek podano w tabeli 1). Następnie błonę inkubowano przez noc w temperaturze 4°C w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciało pierwszorzędowe. Nadmiar przeciwciała odpłukiwano 3-krotnie przez 10 minut w odpowiednim buforze, a następnie błonę inkubowano 1 godz. w roztworze drugorzędowego przeciwciała sprzężonego z peroksydazą chrzanową. Niezwiązane specyficznie przeciwciała usuwano płuczając błony 3-krotnie przez 10 min w odpowiednim buforze. Następnie błonę poddawano reakcji chemiluminescencyjnej przy użyciu zestawu firmowego ECL (Western Blotting Substrate, Thermo Scientific) i obrazowano naświetlając światłoczuły film (Roche Diagnostics). Klisze poddawano analizie densytometrycznej przy pomocy oprogramowania TotalLab v1.11. Błony wykorzystane uprzednio inkubowano 30 min. w roztworze 1% SDS i 50mM glicyny-HCl, pH 2,0 w celu odmycia związanych przeciwciał i płukano 3 x 15 min w TBS-Tween, po czym używano do kolejnych oznaczeń immunochemicznych.

Oznaczone białko	Gęstość żelu	Bufor	Blokowanie	Przeciwciało I-rzędowe	Przeciwciało II-rzędowe
AIF-frakcja mitochondrialna	10%	TBS-Tween (TBS-T)	1 godz. w temp. pokojowej w 5% mleku w TBS-T	Mysie, monoklonalne, przeciw AIF, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:250 w 5% mleku w TBS-T, noc w 4°C	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β -aktyny.
Akt	10%	TBS-Tween (TBS-T)	1 godz. w temp. pokojowej w 5% BSA w TBS-T	Królicze poliklonalne, przeciw Akt, Cell Signalling Technology, 1:750 w 5% BSA w TBS-T noc w 4°C	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH
pAkt	10%	TBS-Tween (TBS-T)	1 godz. w temp. pokojowej w 5% BSA w TBS-T	Królicze poliklonalne, przeciw Akt (pSer473), Cell Signalling Technology, 1:750 w 5% BSA w TBS-T noc w 4°C	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH
GSK3beta Ser9	10%	TBS-Tween (TBS-T)	30 min w temp. pokojowej w 5% mleku w TBS-T	Mysie, monoklonalne, przeciw GSK3beta Ser9, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:250 w TBS-T noc w temp. pokojowej	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH.
pBAD	15%	TBS-Tween (TBS-T)	30 min w temp. pokojowej w 5% mleku w TBS-T	Mysie, monoklonalne, przeciw pBAD, Santa Cruz Biotechnology, Inc., 1:250 w TBS-T noc w temp. pokojowej oraz królicze poliklonalne Cell Signalling Technology 1:250 w 5% BSA w TBS-T noc w 4°C	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH.
BAD	15%	TBS-Tween (TBS-T)	1 godz. w temp. pokojowej w 5% mleku w TBS-T	Królicze, poliklonalne, przeciw BAD, Santa Cruz Bio-technology, Inc., 1:250 w TBS-T noc w 4°C	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH.
Bcl-2	15%	TBS-Tween (TBS-T)	30 min w temp. pokojowej w 5% mleku w TBS-T	Królicze, poliklonalne, przeciw Bcl-2 Sigma-Aldrich 1:250-500 w TBS-T noc w 4°C	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH.
Sphk1	10%	TBS-Tween (TBS-T)	1 godz. w temp. pokojowej w 5% BSA w TBS-T	Królicze, poliklonalne, przeciw Sphk1, Cell Signalling Technology, 1:500 w 5% BSA w TBS-T noc w 4°C	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej. Wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH

GAPDH	10%- 15%	TBS- Tween (TBS-T)	1 godz. w temp. pokojowej w 5% mleku w TBS-T	Królicze, poliklonalne przeciw GAPDH, Sigma- Aldrich, 1:40000-10000 w 5% mleku w TBS-T noc w 4°C lub 3-4 godz. w temp. pokojowej	1:4000 w 5% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej
Aktyna	10%	TBS- Tween (TBS-T)	1 godz. w temp. pokojowej w 3% mleku w TBS-T	Mysie, monoklonalne, MP Biomedicals, 1:500 w 3% mleku w TBS-T noc w 4°C lub 3-4 godz. w temp. pokojowej	1:4000 w 3% mleku w TBS-T 1 godz. w temp. pokojowej

Tabela 1. Warunki reakcji immunochemicznej dla poszczególnych oznaczeń

TBS-Tween – bufor Tris o składzie 50mM Tris pH 7,6, 150mM NaCl, 0,1% Tween-20.

BSA - albumina z surowicy bydlęcej.

Analiza ekspresji genów

Izolacja RNA

Całkowite RNA izolowano z komórek w warunkach sterylnych używając odczynnika TRI-reagent (Sigma – Aldrich). Komórki rosnące na szalkach o średnicy 10cm płukano dwukrotnie buforem PBS, a następnie zawieszano w 1ml odczynnika TRI-reagent i odstawiano na 5 minut. Następnie, do 1ml homogenatu dodawano 200 μ l chloroformu, energicznie mieszano przez 15 sekund i pozostawiano na 15 min. w temperaturze pokojowej i wirowano przy obrotach 12000 x g przez 10 min. w temperaturze 4°C. Górną fazę wodną zawierającą RNA przenoszono do nowej probówki, dodawano 500 μ l zimnego izopropanolu, delikatnie mieszano, pozostawiano na 5 min. w temperaturze pokojowej i wirowano przez 10 min. przy obrotach 12000 x g w temperaturze 4°C. Osad przemywano trzykrotnie 1ml 75% etanolu. Po kilkuminutowym odparowaniu etanolu z próbek, osad RNA zawieszano w 20 μ l wody pozbawionej RNaz (RNase-free, Ambion). Następnie mierzono ilość otrzymanego RNA metodą spektrofotometryczną w aparacie NanoDrop (Thermo Scientific) przy długości fali 260nm, oraz zanieczyszczenie RNA białkami i DNA przy długości fali 280nm. Stosunek OD260/OD280 wynosił od 1,7 do 2,0. W celu oczyszczenia wyizolowanego wcześniej mRNA z pozostałości DNA komórkowego do probówek 1,5ml przenoszono 1 μ g mRNA i uzupełniano odczynnikami do trawienia DNA firmy Sigma – Aldrich do 10 μ l. Po przygotowaniu mieszaninę reakcyjną inkubowano 15 min. w temperaturze 25°C. Następnie dodano 1 μ l odczynnika zatrzymującego reakcję (Stop solution) i dalej prowadzono inkubację przez 10 min. w temperaturze 70°C. Po zakończeniu reakcji próbki przenoszono do lodu.

Reakcja odwrotnej transkrypcji

Całkowite wyizolowane RNA (1 μ g) było matrycą dla działania odwrotnej transkryptazy. W reakcji odwrotnej transkrypcji otrzymywano DNA komplementarne (cDNA) do mRNA. Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzano przy użyciu zestawu odczynników firmy Applied Biosystems w końcowej objętości 20 μ l.

Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. Real-time PCR)

Zmiany poziomu mRNA genów kodujących białka z rodziny Bcl-2 (Bax, Hrk, Bcl-2), kinazy sfingozyny typu 1 i 2, liazy dla S1P i fosfatazy S1P (SPP1), receptorów dla S1P (S1PR1 i S1PR3), mt SOD i GPx-4 oraz β -aktyny analizowano za pomocą reakcji PCR w czasie rzeczywistym. Na matrycy cDNA uzyskanej z 1 μ g RNA przeprowadzono reakcję PCR w czasie rzeczywistym przy użyciu odpowiednich sond Taq-Man (Applied Biosystems):

actb Hs99999903_m1, bax Hs00180269_m1, bcl-2 Hs00608023_m1, hrk Hs02621354_s1, gpx4 Hs0098 9766_g1, sod 2 Hs00167309_m1, sphk1 Hs01116530_g1, sphk2 Hs01016543_g1, s1pr1 Hs01922614_s1, s1pr3 Hs00245464_s1, sgpl1 Hs00187407_m1, sgpp1 Hs00229266_m1.

Poziom mRNA wyrażano jako względny stosunek próbki badanej do próbki referencyjnej (kalibratora), po uprzedniej normalizacji obydwu względem genu referencyjnego (ACTB). Reakcję PCR wykonywano przy pomocy aparatu ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems). Względny poziom mRNA obliczono metodą $\Delta\Delta C_t$.

Oznaczanie apoptozy komórek *in vitro* metodą mikroskopii fluorescencyjnej

Apoptozę wykrywano przy użyciu barwnika fluorescencyjnego Hoechst 33342 (Riedel-de-Haën Germany). Barwienie jąder komórkowych za pomocą tego barwnika pozwala na wizualizację kondensacji i agregacji DNA charakterystycznych dla apoptozy. Wybarwione jądra analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Olympus IX71 i fotografowano z użyciem kamery cyfrowej Olympus U-CMAD3 zintegrowanej z mikroskopem przy długości fali pobudzającej 340nm i emitowanej 510nm przy użyciu 40-krotnego powiększenia.

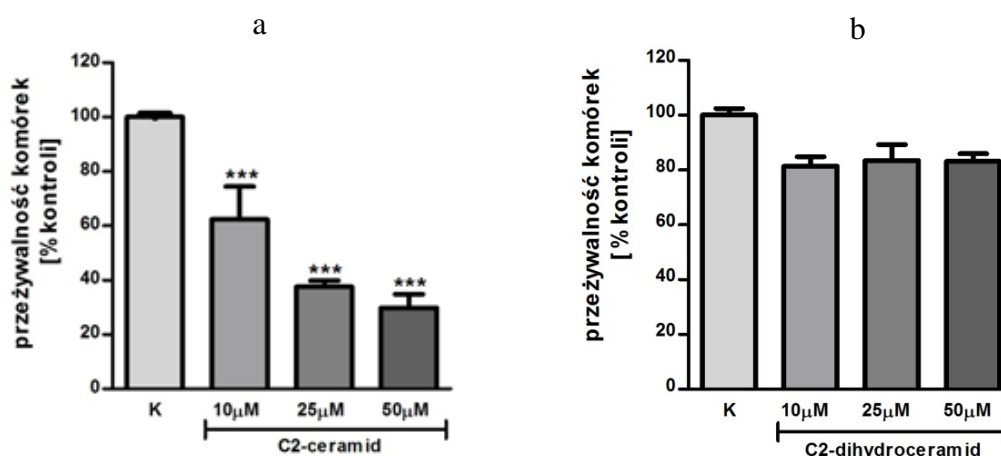
Statystyczne opracowanie wyników

Każde oznaczenie wykonywano w co najmniej trzech powtórzeniach. Za ostateczny wynik przyjmowano wartość średnią \pm błąd standardowy średniej (SEM) obliczone z indywidualnych pomiarów (średnich z powtórzeń). W celu ustalenia wiarygodności zaistniałych różnic w badaniach porównawczych, wartości z poszczególnych eksperymentów weryfikowano testem t-Studenta i jednoczynnikową analizą wariancji (ANOVA) z użyciem testu porównań wielokrotnych Newmana-Keuls'a. Wyniki uznawano za znamienne statystycznie przy poziomie istotności p poniżej 0,05.

Wyniki

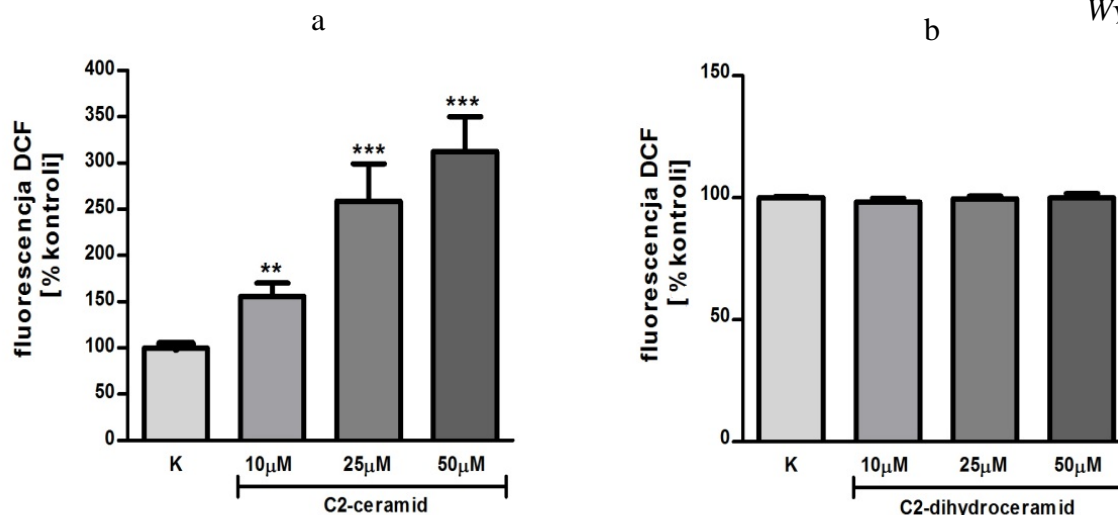
Wpływ egzogenego C2-ceramidu na przeżywalność komórek SH-SY5Y i indukcję stresu oksydacyjnego

Badania rozpoczęto od analizy przeżywalności komórek SH-SY5Y w warunkach 24 godz. inkubacji z C2-ceramidem w zakresie stężeń od 10-50 μ M. Wykazano zależne od stężenia ceramidu obumieranie komórek SH-SY5Y, które w stężeniu 25 μ M wynosiło 62% \pm 2,34 SEM w stosunku do kontroli (100%) (stężenie to zostało wybrane do kolejnych doświadczeń, Rycina 1a). Komórki SH-SY5Y poddane były również działaniu nieaktywnego C2-dihydroceramidu (Rycina 1b).



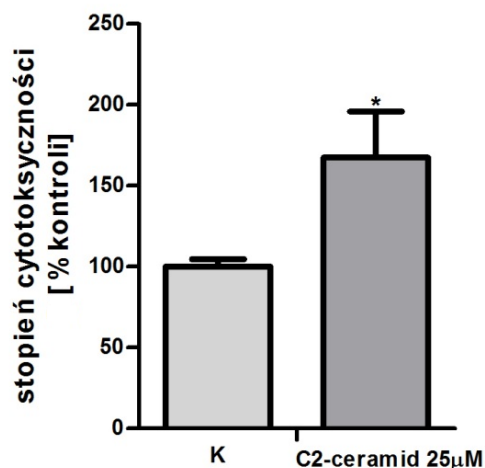
Rycina 1. Wpływ C2-ceramidu (a) i C2-dihydroceramidu (b) na przeżywalność komórek SH-SY5Y
Komórki SH-SY5Y inkubowano odpowiednio z 10,25 i 50 μ M C2-ceramidem i C2-dihydroceramidem przez 24 godz. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń od czterech do sześciu powtórzeń. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, *** p <0,001 – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.

W celu zbadania zdolności C2-ceramidu do indukcji stresu oksydacyjnego w komórkach SH-SY5Y badano wpływ tego związku na poziom wolnych rodników, poprzez pomiar utleniania sondy dichlorodihydrofluoresceiny (H2DCF-DA). Stwierdzono zależny od stężenia C2-ceramidu wzrost poziomu wolnych rodników w komórkach SH-SY5Y, który w stężeniu 25 μ M wynosił 260% \pm 40,34 SEM w stosunku do kontroli (100%) (Rycina 2a). Nieaktywny C2-dihydroceramid nie powodował wzrostu poziomu wolnych rodników (Rycina 2b). W kolejnym doświadczeniu stwierdzono, że ceramid powoduje wzrost aktywności dehydrogenazy mleczanowej, co jest miarą cytotoksyczności tego związku (Rycina 3).



Rycina 2. Wpływ C2-ceramidu (a) i C2-dihydroceramidu (b) na indukcję stresu oksydacyjnego w komórkach SH-SY5Y

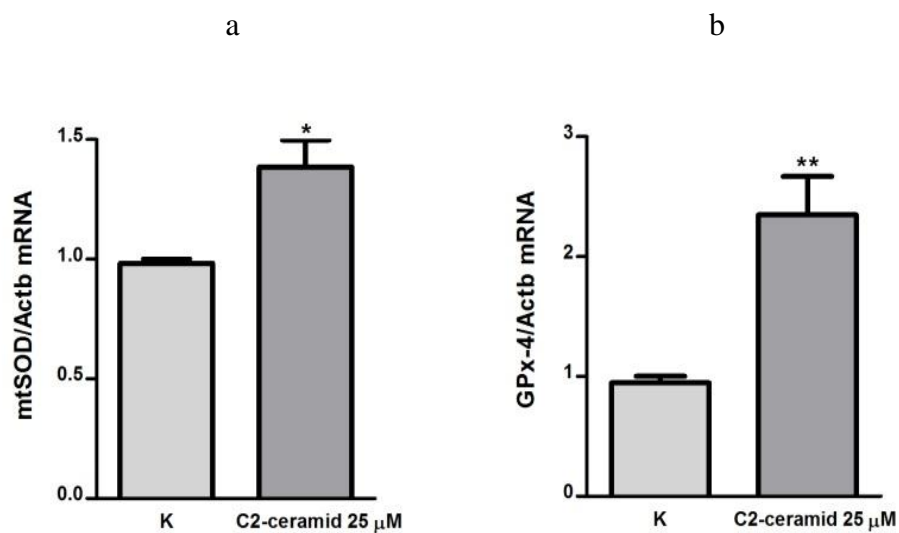
Komórki SH-SY5Y inkubowano odpowiednio z 10,25 i 50 μM C2-ceramidem i C2-dihydroceramidem przez 24 godz. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną ±SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.



Rycina 3. Oznaczanie stopnia cytotoxyczności C2-ceramidu za pomocą testu LDH

Komórki SH-SY5Y inkubowano odpowiednio z 25 μM C2-ceramidem przez 24 godz. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną ±SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.

Do głównych enzymów antyoksydacyjnych usuwających wolne rodniki należą dysmutaza ponadtlenkowa (SOD, EC 1.15.1.1), katalaza (CAT, EC 1.11.1.6) i peroksydaza glutationowa (GPx, EC 1.11.1.9). W dalszej kolejności zbadano wpływ C2-ceramidu na ekspresję mitochondrialnej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (mtSOD) oraz peroksydazy wodoronadtlenków fosfolipidowych (GPx-4) występującej w mitochondriach i cytoplazmie. Po 3 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem zaobserwowano wzrost ekspresji wyżej wymienionych enzymów antyoksydacyjnych (Rycina 4a, b).

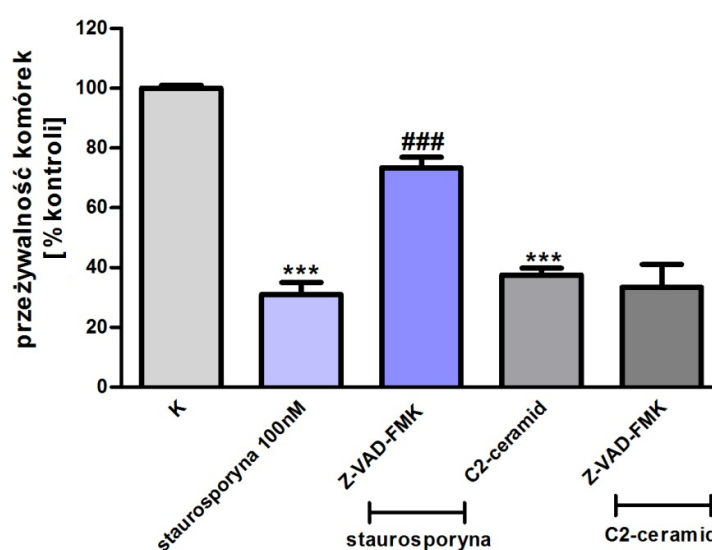


Rycina 4. Wpływ C2-ceramidu na ekspresję genów dla mtSOD oraz GPx-4

Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3 godz. z C2-ceramidem. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech do czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-*t* Studenta, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.

Zbadanie roli polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1) w mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y

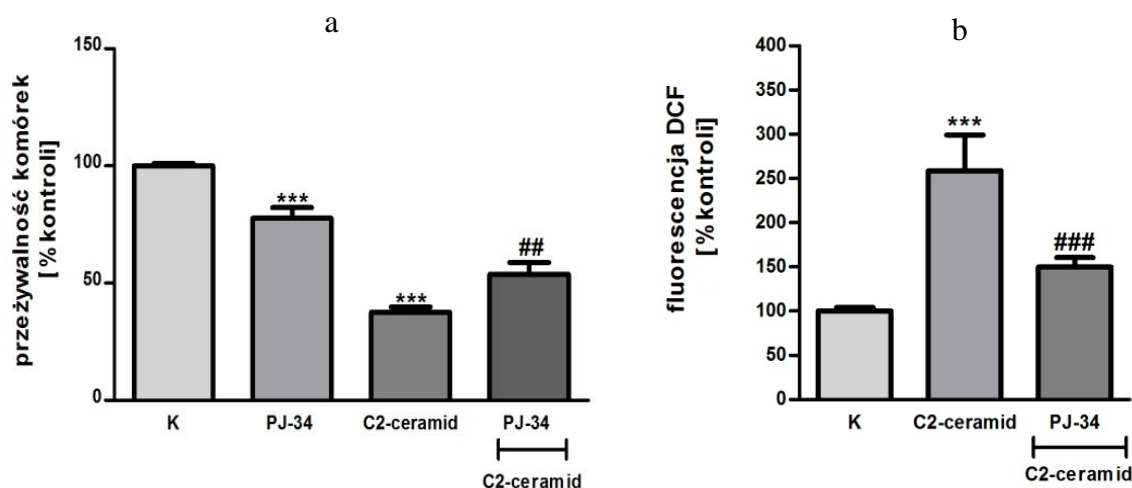
Jak wspomniano we wstępie, nadmierna aktywacja PARP-1 w wyniku stresu oksydacyjnego może powodować śmierć komórki. Ponadto, PAR jest molekułą sygnalizacyjną, której związanie się z błoną mitochondrialną może prowadzić do wypływu AIF z mitochondriów i śmierci komórki na drodze niezależnej od kaspaz. Wiadomo również, że PARP-1 jest klasycznym substratem kaspazy-3. Aktywacja tego enzymu skutkuje pojawianiem się produktów degradacji PARP-1. W związku z tym zbadano wpływ inhibitora kaspaz (Z-VAD-FMK) na przeżywalność komórek SH-SY5Y traktowanych C2-ceramidem. Stwierdzono, że inhibitor ten nie poprawiał żywotności komórek SH-SY5Y po inkubacji z C2-ceramidem. W badaniach jako pozytywną kontrolę zastosowano staurosporynę, która aktywuje kaspazę-3 i prowadzi do cięcia PARP-1 (Rycina 5).



Rycina 5. Wpływ inhibitora Z-VAD-FMK na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Komórki SH-SY5Y poddawane były 2 godzinnej pre-inkubacji z 20 μ M inhibitorem Z-VAD-FMK, a następnie traktowane C2-ceramidem i staurosporyną (100nM) przez 24 godz. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych staurosporyną.

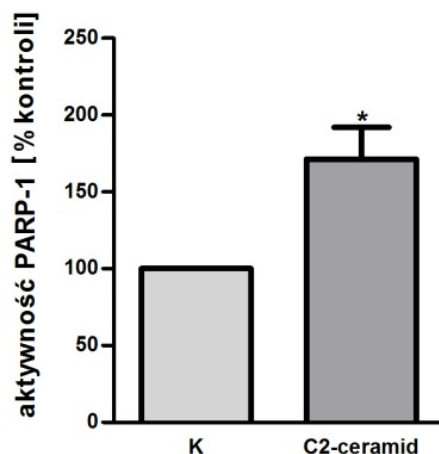
W związku z powyższym w dalszej kolejności zbadano wpływ zahamowania aktywności PARP-1 na przeżywalność komórek SH-SY5Y i poziom wolnych rodników w warunkach inkubacji z C2-ceramidem. Stwierdzono, że podanie samego inhibitora PARP-1 (PJ-34) powodowało obniżenie przeżywalności komórek SH-SY5Y. Zastosowanie inhibitora PARP-1 w warunkach inkubacji z C2-ceramidem powodowało zmniejszenie poziomu wolnych rodników oraz znamienne zwiększało przeżywalność komórek (Rycina 6a, b).



Rycina 6. Wpływ inhibitora PARP-1 (PJ-34) na przeżywalność komórek SH-SY5Y (a) oraz poziom wolnych rodników (b) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu
 Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z 20 μ M inhibitorem PARP-1 (PJ-34), a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Dla wykresu a każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń od czterech do sześciu powtórzeń. Dla wykresu b każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keuls, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

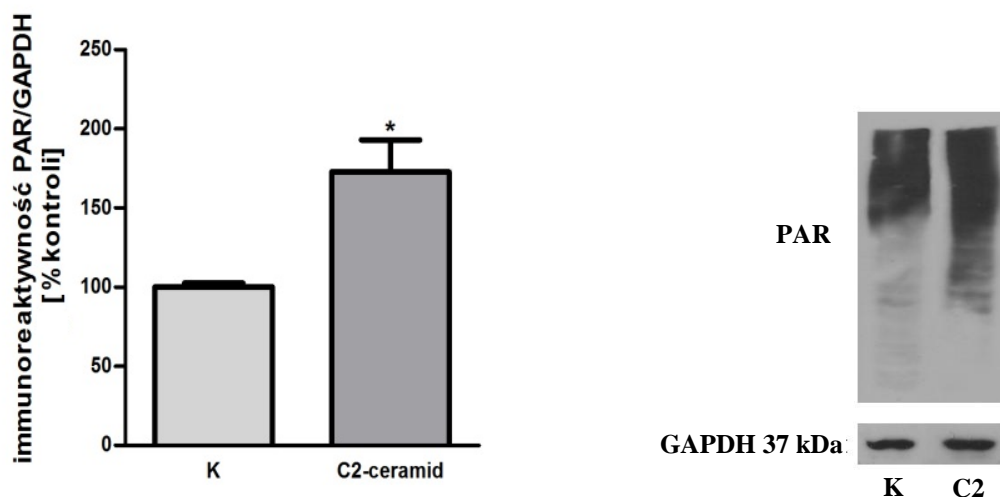
Następnie uzyskane wyniki pokazały, że inkubacja komórek z C2-ceramidem przez 24 godz. powoduje prawie dwukrotny wzrost aktywności PARP-1 (Rycina 6c). Badanie immunoreaktywności PAR metodą western blot, po wcześniejszym przeprowadzeniu reakcji z β NAD⁺, wykazało wyraźnie zwiększoną zdolność do syntezy PAR pod wpływem stresu oksydacyjnego wywołanego ceramidem. Po 12 godz. inkubacji komórek z C2-ceramidem immunoreaktywność PAR wynosiła 170% w stosunku do kontroli (100%) (Rycina 6d). Wyniki pokazują spadek immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej po 12 godz. inkubacji z C2-ceramidem (Rycina 6e). W dalszej kolejności w związku z zaobserwowanym spadkiem poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej oraz wzrostem immunoreaktywności PAR w komórkach SH-SY5Y, zbadano wpływ inhibicji PARP-1 na poziom AIF w mitochondriach. Do doświadczeń użyty został selektywny inhibitor PARP-1

(PJ-34). Analiza western blot wykazała, że podanie inhibitora PJ-34 zapobiega obniżeniu poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej w komórkach SH-SY5Y (Rycina 6e).



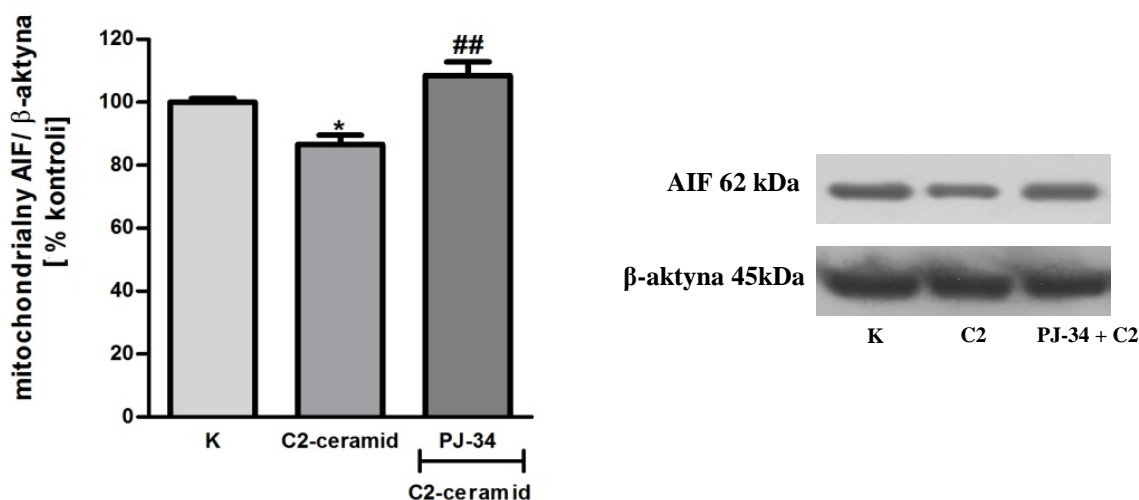
Rycina 6c. Wpływ C2-ceramidu na aktywność PARP-1

Aktywność PARP-1 mierzono w homogenacie komórkowym po 24 godz. inkubacji z C2-ceramidem metodą radiochemiczną. Wyniki wyrażone w pmol/mg białka/min w % kontroli stanowią średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.



Rycina 6d. Wpływ C2-ceramidu na immunoreaktywność PAR

Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych. Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

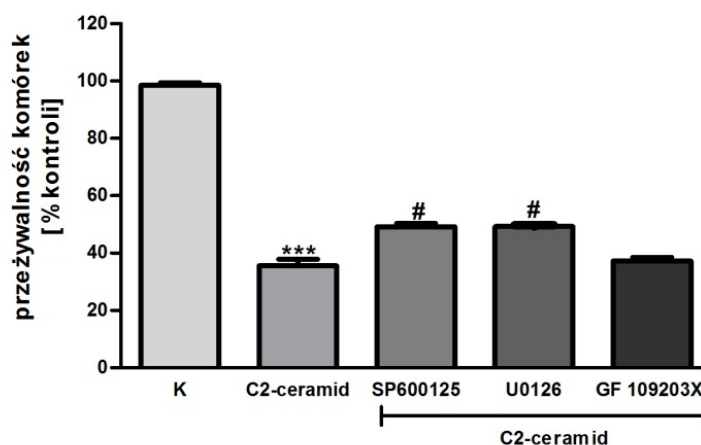


Rycina 6e. Wpływ C2-ceramidu i zahamowania aktywności PARP-1 na immunoreaktywność białka AIF we frakcji mitochondrialnej

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z 20μM inhibitorem PARP-1 (PJ-34), a następnie traktowane C2-ceramidem przez 12 godz. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem β-aktyny, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń ±SEM.

Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie względem komórek traktowanych C2-ceramidem. Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

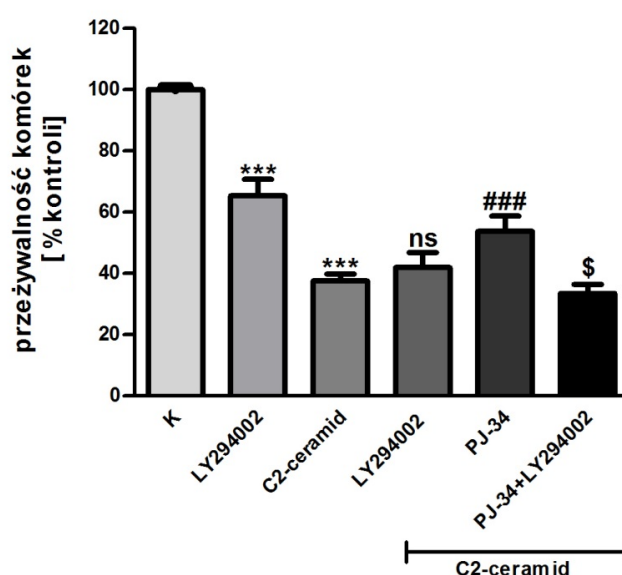
Dane literaturowe wskazują, że w śmierć komórek na drodze zależnej od PARP-1 zaangażowane są również kinazy białkowe. Mogą one bezpośrednio wpływać na fosforylację PARP-1 powodując tym samym wzrost aktywności tego enzymu. Dlatego też, w kolejnych doświadczeniach w warunkach stresu oksydacyjnego i wzmożonej aktywności PARP-1 przebadane zostały inhibitory: kinaz regulowanych sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK1/2, U0126) oraz kinazy białkowej C (PKC, GF109203x). Badania wskazują również, że inhibicja PARP-1 wpływa na zahamowanie aktywności kinazy JNK. W związku z tym w warunkach podwyższonej aktywności PARP-1 może dochodzić do aktywacji kinazy JNK, która może być włączona w transdukcję sygnału apoptotycznego. Dlatego też w warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem został użyty inhibitor kinazy JNK (SP600125). Uzyskane wyniki wykazały pozytywny wpływ inhibitorów kinaz: ERK1/2 oraz JNK, które działały protekcyjnie zwiększając przeżywalność komórek SH-SY5Y po inkubacji z C2-ceramidem (Rycina 7).



Rycina 7. Wpływ inhibitora kinazy ERK1/2, inhibitora kinazy PKC oraz inhibitora kinazy JNK na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z $1\mu\text{M}$ inhibitorem kinazy ERK1/2 (U0126), $1\mu\text{M}$ inhibitorem kinazy PKC (GF 109203X) oraz $5\mu\text{M}$ inhibitorem kinazy JNK (SP600125), a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną $\pm\text{SEM}$ z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, # $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

Rola szlaku przekazywania sygnału PI3-K/Akt/GSK3 β w zależności od PARP-1/PARP/AIF śmierci komórek SH-SY5Y

W celu zbadania zaangażowania ścieżki sygnalizacyjnej związanej z kinazą 3-fosfatydyloinozytolu (PI3-K) na przeżycie komórek SH-SY5Y traktowanych C2-ceramidem, został użyty specyficzny inhibitor PI3-K (LY294002). Do określenia żywotności komórek użyto testu MTT, który wykazał, że zahamowanie ścieżki PI3-K powoduje znamienne obumieranie komórek, ale nie wpływa dodatkowo na obniżenie przeżywalności komórek w warunkach hodowli w obecności C2-ceramidu. Zgodnie z wcześniejszymi wynikami inhibitor PARP-1 wpływał na poprawę przeżywalności komórek SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez C2-ceramid. Zahamowanie PI3 kinazy w tych warunkach znosiło ten pozytywny efekt wskazując, że szlak PI3-K/Akt odgrywa istotne znaczenie w cytoprotekcyjnym działaniu inhibitora PARP-1 (Rycina 8).

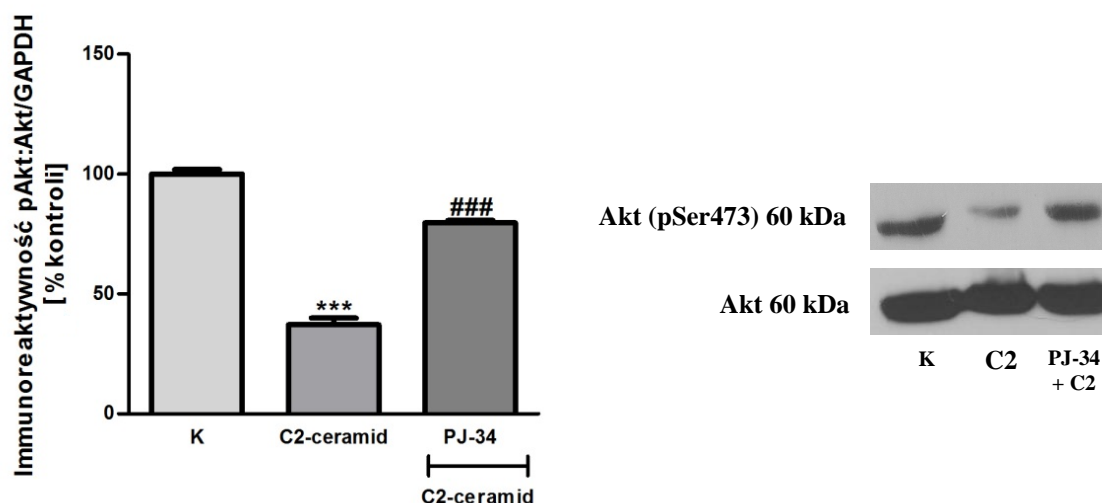


Rycina 8. Wpływ inhibitorów: PI3-K oraz PARP-1 na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z: LY294002 50 μ M i PJ-34 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem, ns – nieistotne statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem, \$ $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem+PJ-34 i PJ-34+LY294002+C2-ceramid.

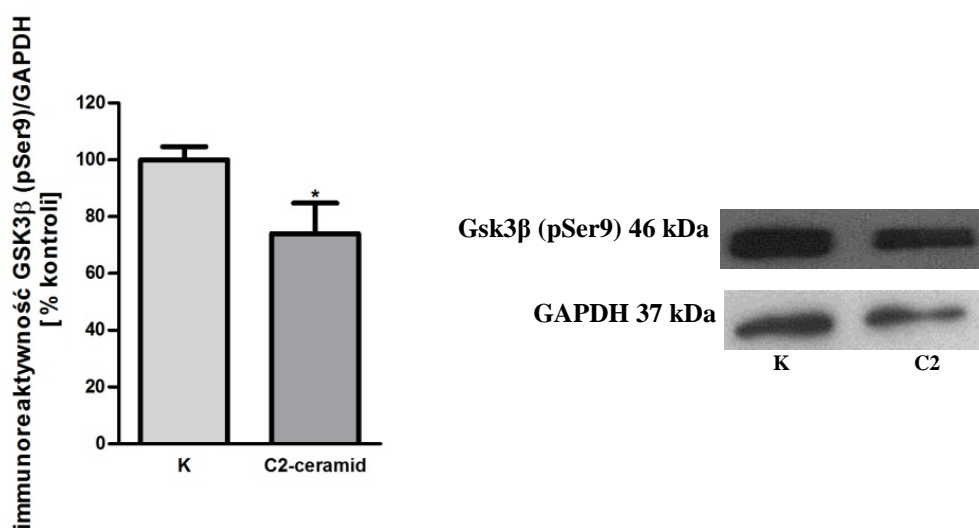
Serynowo-treoninowa kinaza Akt, która jest głównym efektozem PI3 kinazy odpowiada za fosforylację wielu białek związanych z regulacją takich procesów komórkowych jak: transkrypcja, metabolizm, apoptoza czy proliferacja. Wszystkie izoformy kinazy Akt (Akt1, Akt2 i Akt3) wymagają aktywacji poprzez fosforylację reszt seryny w pozycji 473 obecnej w

C-terminalnej domenie regulatorowej i treoniny w pozycji 308 znajdującej się w domenie kinazowej. W dalszej kolejności zbadano więc wpływ C2-ceramidu na fosforylację kinazy Akt (Ser 473). Stwierdzono, że C2-ceramid powoduje obniżenie fosforylacji kinazy Akt po krótkotrwałej 3 godz. inkubacji, przyczyniając się w ten sposób do zahamowania jej aktywności (Rycina 9). Dane literaturowe wskazują, że zastosowanie inhibitorów PARP-1 wpływa na wzrost fosforylacji i tym samym aktywności kinazy Akt. Dlatego w kolejnych doświadczeniach zbadano wpływ zahamowania aktywności PARP-1 poprzez zastosowanie inhibitora PJ-34 na fosforylację kinazy Akt. Inhibitor PARP-1 wykazuje działanie protekcyjne poprzez wzrost fosforylacji kinazy Akt w komórkach SH-SY5Y traktowanych C2-ceramidem po 3 godz. (Rycina 9).



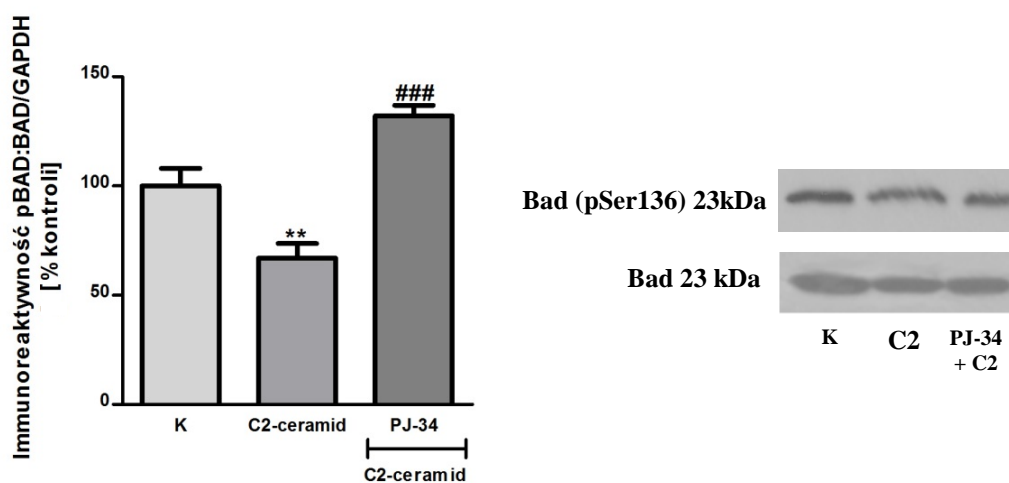
Rycina 9. Wpływ C2-ceramidu i zahamowania aktywności PARP-1 na immunoreaktywność kinazy pAkt i Akt. Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z PJ-34 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 3 godz. Immunoreaktywność wymienionych białek badano metodą western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, *** p <0,001 – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### p <0,001 – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem. Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

Jak wiadomo badania ostatnich lat wskazały na udział PI3-K/Akt w fosforylacji i w wyniku tego procesu obniżeniu aktywności kinazy syntazy glikogenu 3 β (GSK3 β). Uzyskane wyniki wskazują, że C2-ceramid poprzez hamowanie PI3-K/Akt powoduje obniżenie fosforylacji GSK3 β na serynie 9 doprowadzając tym samym do wzrostu jej aktywności (Rycina 10).



Rycina 10. Wpływ C2-ceramidu na immunoreaktywność formy ufosforylowanej (Ser9) białka GSK3β
 Komórki SH-SY5Y inkubowano z C2-ceramidem przez 24 godz. Immunoreaktywność formy ufosforylowanej (Ser9) białka GSK3β badano metodą western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, * $p < 0.05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych. Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

Jednym z białek efektorowych fosforylowanych przez Akt jest pro-apoptotyczne białko Bad. Fosforylacja białka Bad na Ser 136 powoduje jego zwiążanie się z białkiem adaptorowym 14-3-3, sekwestrację w cytoplazmie i zahamowanie pro-apoptotycznego działania. W wyniku 24 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem zaobserwowano spadek fosforylacji białka Bad wynikający z zahamowania aktywności kinazy Akt. Protekcyjnie działanie inhibitora PJ-34 obserwuje się również we wzroście fosforylacji białka Bad (Rycina 11).



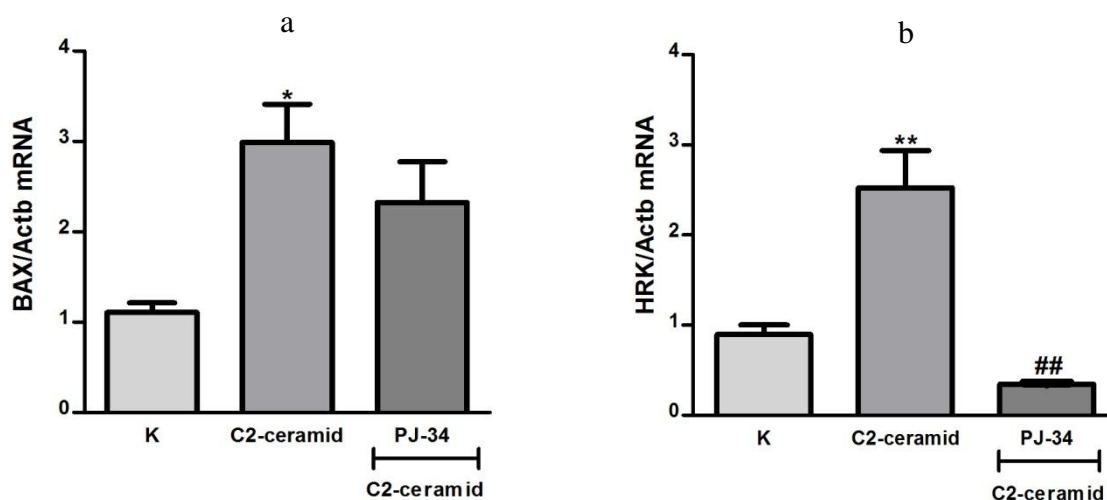
Rycina 11. Wpływ C2-ceramidu i zahamowania aktywności PARP-1 na immunoreaktywność białek pBad i Bad.

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z PJ-34 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Immunoreaktywność wymienionych białek badano metodą western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM.

Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, ** $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem. Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

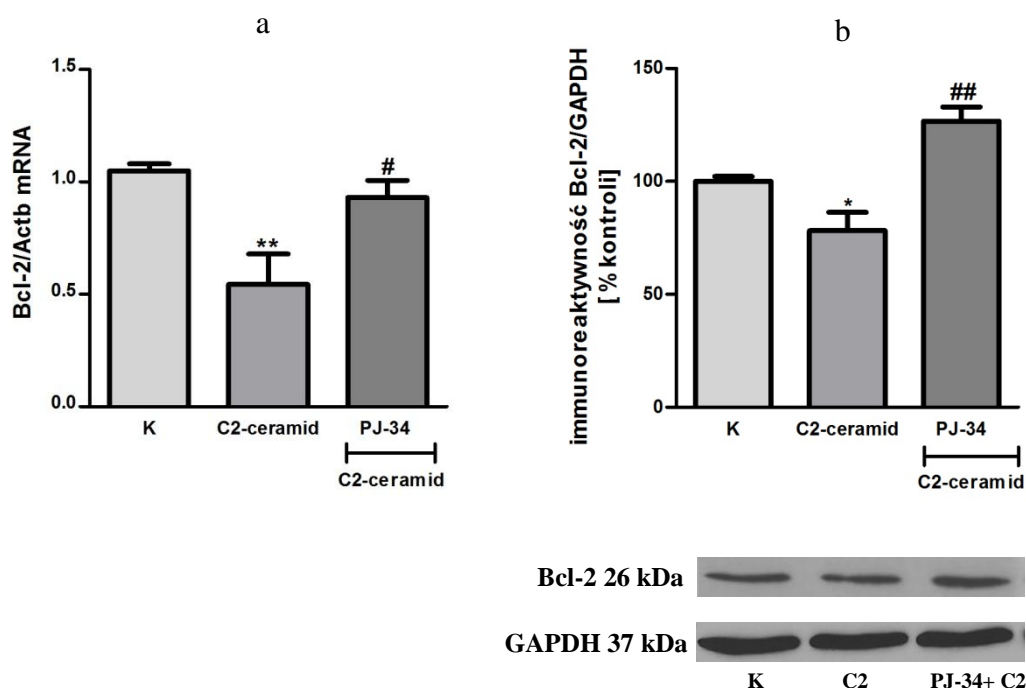
Analiza wpływu zahamowania aktywności PARP-1 na ekspresję genów/immunoreaktywność dla pro- i anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2

Białka z rodziny Bcl-2 odgrywają istotną rolę w szlaku apoptozy i są ważnymi regulatorami uwalniania z mitochondrium białek pro-apoptotycznych. W kolejnych doświadczeniach badano wpływ C2-ceramidu na ekspresję genów oraz immunoreaktywność dla białek pro- i anty-apoptotycznych z rodziny Bcl-2. Analiza PCR w czasie rzeczywistym wykazała wzrost ekspresji genu dla białka Bax w odpowiedzi na krótkotrwałą 3 godz. inkubację komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem. Poziom mRNA dla białka Bax po zastosowaniu PJ-34 nie ulegał istotnym zmianom w porównaniu do wartości obserwowanych po samym C2-ceramidzie (Rycina 12a). Kolejnym badanym pro-apoptotycznym białkiem było Hrk (DP5/harakiri). Po 3 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem zaobserwowano wzrost poziomu mRNA dla tego białka. Zastosowanie PJ-34 w znaczący sposób obniżało ekspresję genu dla białka Hrk (Rycina 12b).



Rycina 12. Wpływ zahamowania aktywności PARP-1 na ekspresję genów dla pro-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (BAX i HRK) (a, b) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z PJ-34 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 3godz. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech do czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

Analiza metodą PCR w czasie rzeczywistym wykazała, że w odpowiedzi na C2-ceramid ekspresja genu dla anty-apoptotycznego białka Bcl-2 maleje po krótkotrwałej 3 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y. Po 24 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem stwierdzono spadek immunoreaktywności białka Bcl-2. Badania wykazały, że inhibitor PARP-1 znacząco zwiększał poziom mRNA i immunoreaktywność anty-apoptotycznego białka Bcl-2 (Rycina 13a, b).



Rycina 13. Wpływ C2-ceramidu, zahamowania aktywności PARP-1 na poziom mRNA (a) i immunoreaktywność białka Bcl-2 (b).

a) Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z PJ-34 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 3 godz. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech do czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM

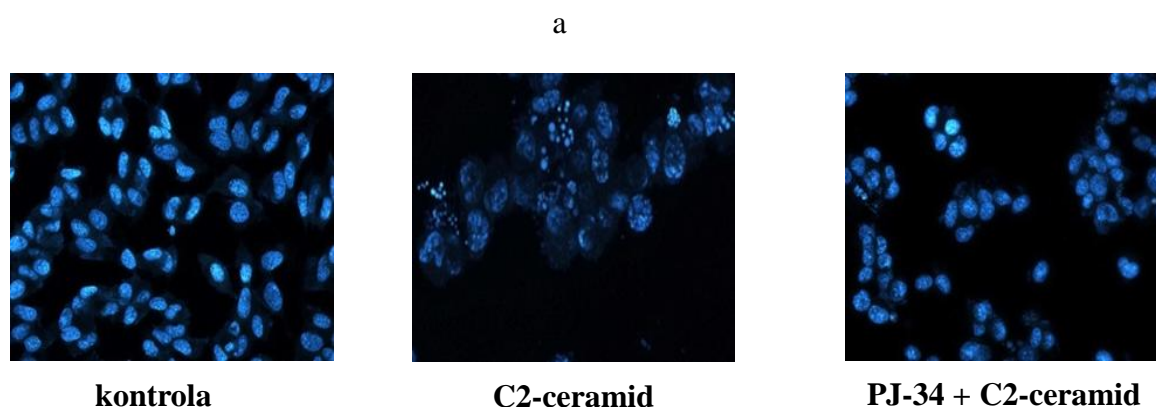
b) Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z PJ-34 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Immunoreaktywność białka Bcl-2 badano metodą western blot w homogenacie komórkowej. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM.

Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,01$, # $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

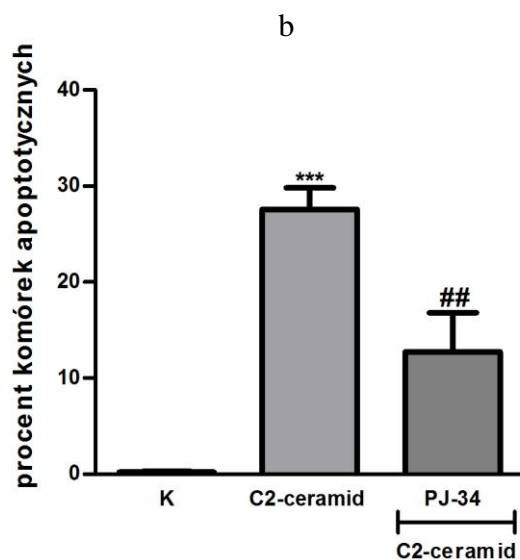
Identyfikacja apoptozy w warunkach zahamowania aktywności PARP-1 i stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Ocena żywotności komórek testem MTT nie pozwala wnioskować, czy obserwowany spadek liczby żywych komórek po podaniu C2-ceramidu, w porównaniu do kontroli jest spowodowany obumieraniem na drodze apoptozy, czy innym rodzajem śmierci. Dlatego przeprowadzono badania morfologii jąder komórkowych pod kątem cech apoptotycznych. Badania w mikroskopie fluorescencyjnym z użyciem barwnika Hoechst 33342 wykazały, że C2-ceramid powoduje wzrost liczby komórek apoptotycznych (Rycina 14b). Po 24 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem zaobserwowano zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy (kondensacja chromatyny, jądra pyknotyczne, fragmentacja chromatyny i tworzenie ciałek apoptotycznych) (Rycina 14a). Po zastosowaniu inhibitora PJ-34 zaobserwowano zmniejszenie liczby komórek apoptotycznych (Rycina 14a, b).



Rycina 14. Apoptoza wywołana C2-ceramidem i ochronne działanie inhibitora PARP-1 w komórkach SH-SY5Y po 24 godz. inkubacji

a) Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z PJ-34 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Po 24 godz. ekspozycji komórek SH-SY5Y wykonano barwienie sondą fluorescencyjną Hoechst 33342. Przykładowe zdjęcia komórek barwionych sondą fluorescencyjną Hoechst 33342.



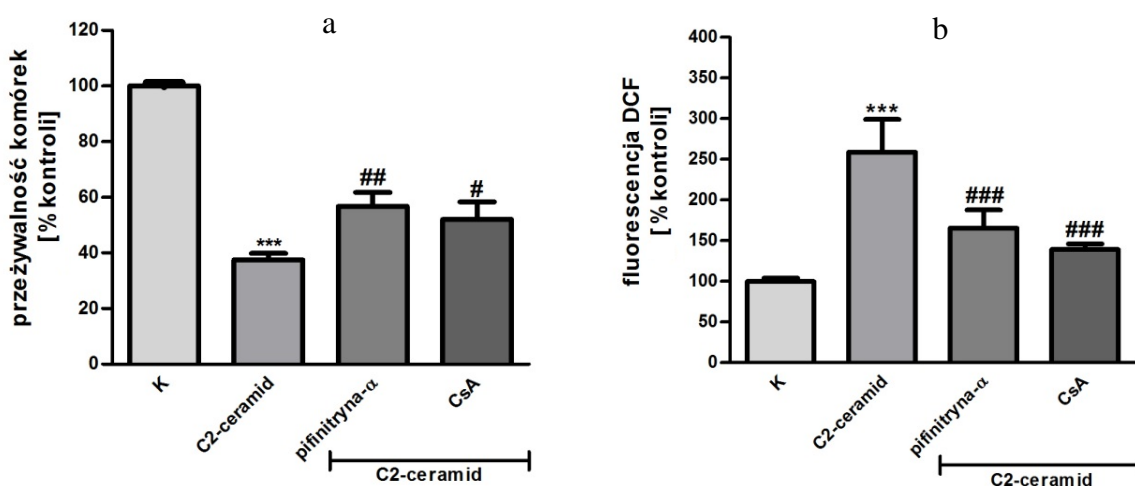
Rycina 14. Apoptoza wywołana C2-ceramidem i ochronne działanie inhibitora PARP-1 w komórkach SH-SY5Y po 24 godz. inkubacji

b) Wartości zostały wyrażone w procentach komórek apoptotycznych. Przedstawione wyniki pochodzą z trzech doświadczeń w trzech powtórzeniach. Zdjęcia w mikroskopie fluorescencyjnym były wykonywane z dwóch pól widzenia, po czym policzono procent komórek apoptotycznych. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

Znaczenie megakanalu mitochondrialnego oraz udział białka p53 w śmierci komórek SH-SY5Y indukowanej C2-ceramidem

Do śmierci komórki może przyczynić się wiele mechanizmów molekularnych. Wpływ C2-ceramidu na zaburzenia funkcji mitochondriów oznaczano pośrednio z użyciem specyficznego inhibitora megakanalów mitochondrialnych – cyklosporyny A (CsA) za pomocą testu MTT. Zastosowanie CsA powodowało statystycznie znamiennej wzrost przeżywalności komórek poddanych działaniu C2-ceramidu (Rycina 15a).

Prezentowane wcześniej dane wskazują, że C2-ceramid jest induktorem stresu oksydacyjnego. Wysoki poziom wolnych rodników może prowadzić do aktywacji ścieżki sygnalizacyjnej zależnej od białka p53. Dane literaturowe pokazują również, że ceramidy i białko p53 współdziałają wzajemnie w indukcji procesu apoptozy. Dlatego też w dalszej kolejności zbadano efekt zahamowania białka p53 na przeżywalność komórek SH-SY5Y pod wpływem działania C2-ceramidu. Inhibitor białka p53 (pifinitryna- α) w sposób statystycznie znamiennej zwiększał przeżywalność komórek (Rycina 15a). Oba związki obniżały również poziom wolnych rodników w warunkach działania C2-ceramidu (Rycina 15b). Badane związki nie miały wpływu na żywotność komórek SH-SY5Y w warunkach bez udziału C2-ceramidu (dane nieprezentowane).

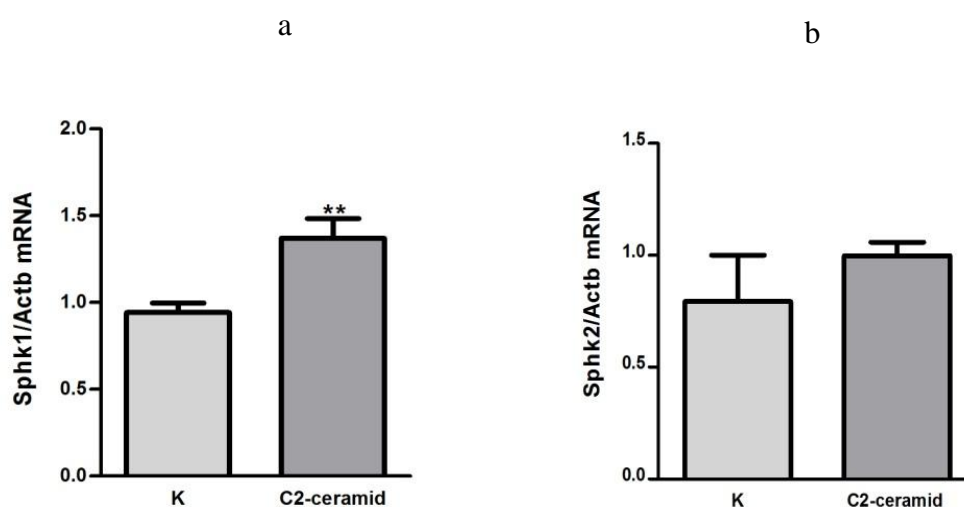


Rycina 15. Wpływ inhibitora: megakanalu mitochondrialnego oraz białka p53 na przeżywalność komórek SH-SY5Y (a) oraz poziom wolnych rodników (b) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z: cyklosporyną 2 μ M, pifinitryną- α 20 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Dla wykresu a każdy wyniki stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń od czterech do sześciu powtórzeń. Dla wykresu b każdy wyniki stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$, ## $p < 0,01$, # $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

Wpływ C2-ceramidu na enzymy metabolizujące S1P

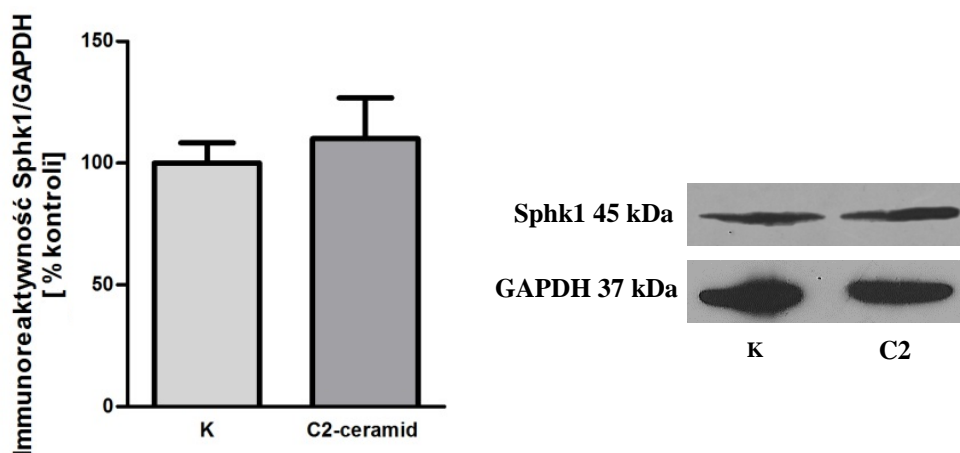
Jak zaznaczono we wstępie pracy kinazy sfingozyny odgrywają ważną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy bioaktywnymi sfingolipidami takimi jak: ceramid i S1P. Dlatego też w kolejnym etapie zbadano wpływ C2-ceramidu na ekspresję, immunoreaktywność i aktywność kinaz sfingozyny. Wyniki wskazują, że C2-ceramid powoduje wzrost ekspresji kinazy sfingozyny typu 1 w wyniku krótkotrwałej 3 godz. inkubacji w komórkach SH-SY5Y (Rycina 16a). W komórkach poddanych działaniu C2-ceramidu nie stwierdzono zmian w ekspresji kinazy sfingozyny typu 2 (Rycina 16b).



Rycina 16. Wpływ C2-ceramidu na ekspresję genów dla kinazy sfingozyny 1 (a) i 2 (b)

*Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3 godz. z C2-ceramidem. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech do czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, $**p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.*

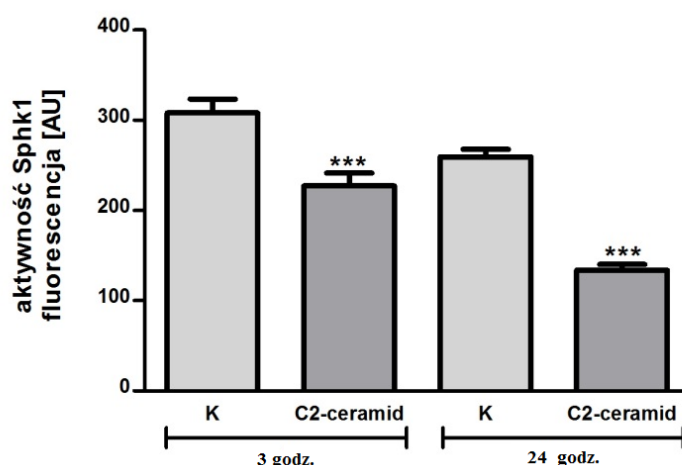
W przedstawionej pracy nie stwierdzono wpływu C2-ceramidu na immunoreaktywność Sphk1 w komórkach SH-SY5Y po 24 godz. inkubacji (Rycina 17).



Rycina 17. Wpływ C2-ceramidu na immunoreaktywność kinazy sfingozyny 1

Komórki SH-SY5Y inkubowano z C2-ceramidem przez 24 godz. Immunoreaktywność kinazy sfingozyny 1 badano metodą western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta. Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

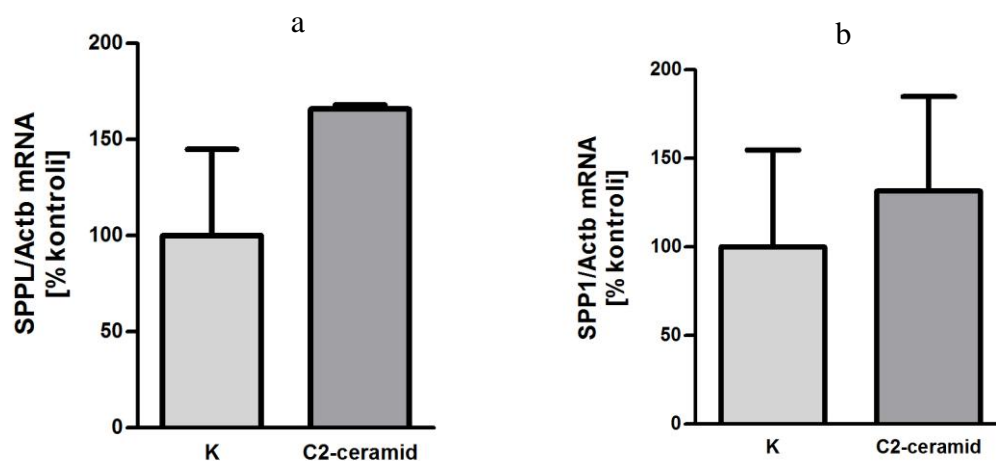
W kolejnym etapie prac stwierdzono, że krótkotrwała 3 godz. jak i 24 godz. inkubacja komórek z C2-ceramidem powoduje spadek aktywności Sphk1. Wynik ten wskazuje, że w komórkach pod wpływem C2-ceramidu synteza endogenego pro-życiowego metabolitu S1P ulega najprawdopodobniej zmniejszeniu (Rycina 18). Wzrost poziomu mRNA dla Sphk1 po 3 godz. sugeruje uruchomienie mechanizmów obronnych w komórce mających na celu dążenie do zwiększenia syntezy endogenego S1P.



Rycina 18. Wpływ C2-ceramidu na aktywność kinaz sfingozyny

Komórki SH-SY5Y inkubowano z C2-ceramidem przez 3 godz. i 24 godz. Wykresy przedstawiają pomiar aktywności kinazy sfingozyny 1 wykonany metodą pomiaru fluorescencji z czterech niezależnych doświadczeń w dwóch powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-t Studenta, *** $p < 0,0001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych.

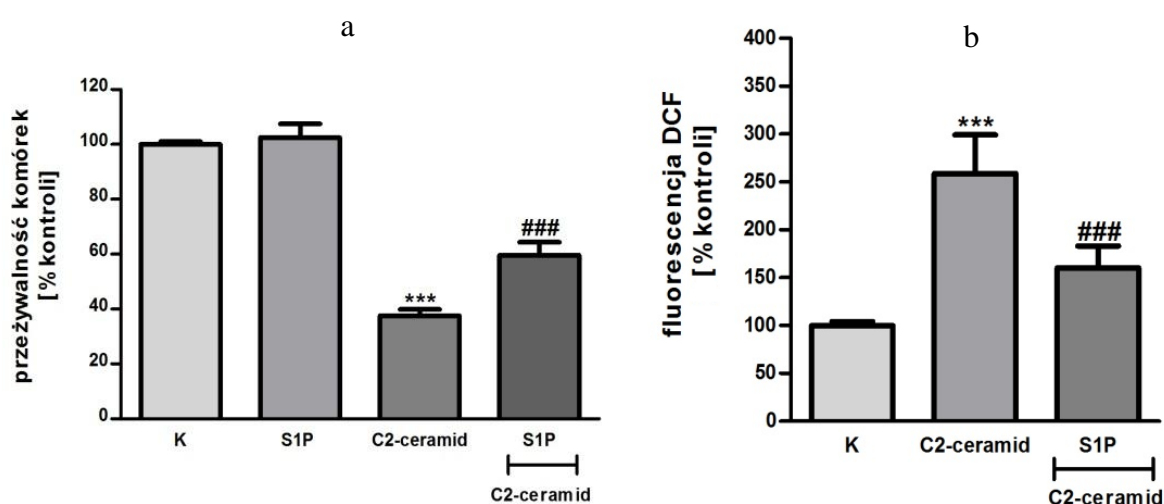
Jak wcześniej zaznaczono poziom S1P w komórce jest regulowany przez fosfatazy S1P oraz liażę S1P. W przeprowadzonych doświadczeniach zaobserwowano, że C2-ceramid po 3 godz. inkubacji nie wpływa na poziom mRNA dla fosfatazy SPP1 oraz liaży S1P (SPPL) w komórkach SH-SY5Y (Rycina 19a, b).



Rycina 19. Wpływ C2-ceramidu na ekspresję genów dla liaży S1P (a) oraz fosfatazy SPP1 (b)
Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3 godz. z C2-ceramidem. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-*t* Studenta.

Zbadanie roli egzogenego sfingozyno-1-fosforanu w stresie oksydacyjnym wywołanym C2-ceramidem

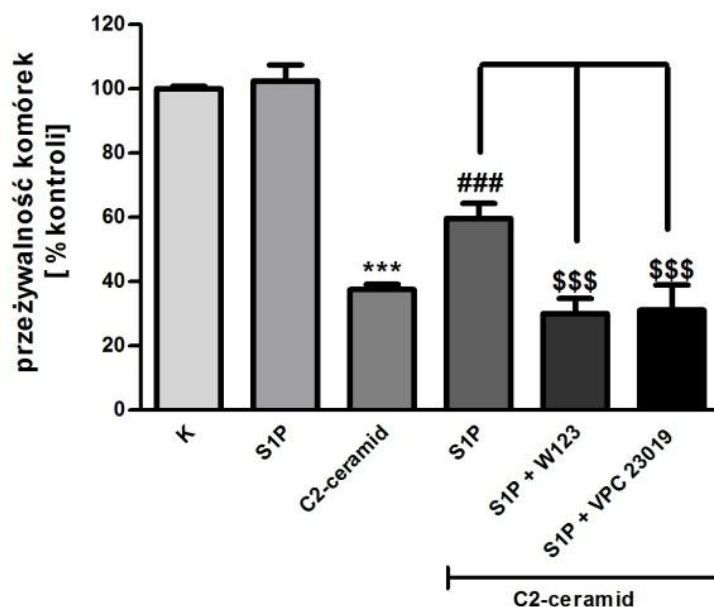
W badanym modelu cytotoksycznego działania C2-ceramidu zastosowano sfingozyno-1-fosforan, który pełni funkcję pro-życiową. W przedstawionej pracy wykazano, że egzogeny sfingozyno-1-fosforan miał znamienne działanie protekcyjne, powodując zarówno zwiększenie przeżywalności komórek jak i zmniejszenie poziomu wolnych rodników w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu C2-ceramidu (Rycina 20a, b).



Rycina 20. Wpływ S1P na przeżywalność komórek SH-SY5Y (a) oraz poziom wolnych rodników (b) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P $1\mu\text{M}$, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Dla wykresu a każdy wyniki stanowi średnią arytmetyczną $\pm\text{SEM}$ z trzech niezależnych doświadczeń od czterech do sześciu powtórzeń. Dla wykresu b każdy wyniki stanowi średnią arytmetyczną $\pm\text{SEM}$ z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

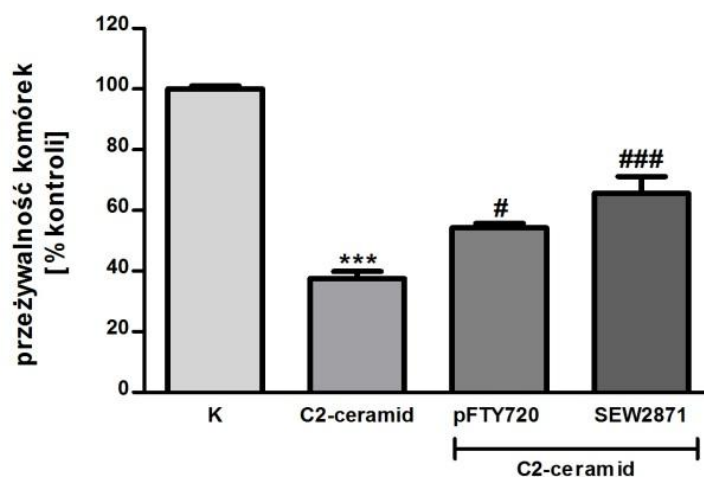
Sfingozyno-1-fosforan może działać jako przekaźnik pierwszego rzędu za pośrednictwem receptorów sprzężonych z białkami G w sposób autokryny lub parakryny. W celu zweryfikowania mechanizmu receptorowego działania S1P użyto antagonistów receptorów S1PR1 i S1PR3. Wyniki pokazują, że zastosowanie antagonistów receptorów dla S1P powodowało obniżenie protekcyjnego działania S1P, wskazując na udział szlaków przekazywania aktywowanych przez te receptory (Rycina 21).



Rycina 21. Wpływ S1P oraz antagonistów receptorów dla S1P na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z: S1P 1 μ M, W123 20 μ M – antagonistą receptora S1PR1, VPC 23019 1 μ M – antagonistą receptorów S1PR1 i S1PR3, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keuls, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem, \$\$\$ $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem i S1P.

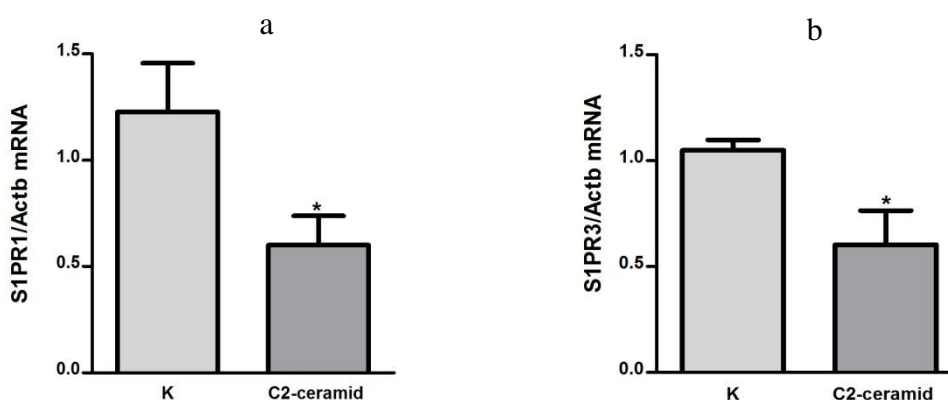
W następnej kolejności w celu dalszego potwierdzenia pobudzenia przez egzogenny S1P szlaku zależnego od jego receptorów zbadano wpływ agonistów. Analiza przeżywalności wykazała, że podobny do S1P protekcyjny efekt wykazują agonista receptora S1PR1-SEW2871 oraz analog S1P – ufosforylowany fingolimod, pFTY720, który wiąże się z czterema receptorami dla S1P (S1PR1, S1PR3, S1PR4 i S1PR5) (Rycina 22).



Rycina 22. Wpływ agonisty receptora S1PR1 oraz analogu S1P na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z pFTY720 100pM oraz SEW2871 10 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Każdy wyniki stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM z trzech niezależnych doświadczeń od trzech do czterech powtórzeń. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newman-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$, # $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

Wyniki w przedstawionej pracy pokazują, że w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego C2-ceramidem dochodzi do spadku ekspresji genów dla receptorów S1PR1 i S1PR3 po krótkotrwałej 3 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y (Rycina 23a, b).

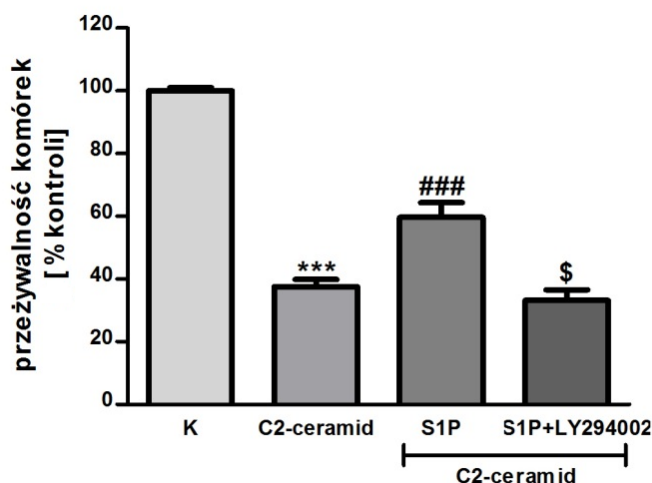


Rycina 23. Wpływ C2-ceramidu na ekspresję genów dla receptora S1PR1 (a) oraz S1PR3 (b)

Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3 godz. z C2-ceramidem. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano test-*t* Studenta, * $p < 0,05$.

Wpływ S1P na szlak przekazywania sygnału zależnego od PI3-K/Akt w komórkach SH-SY5Y

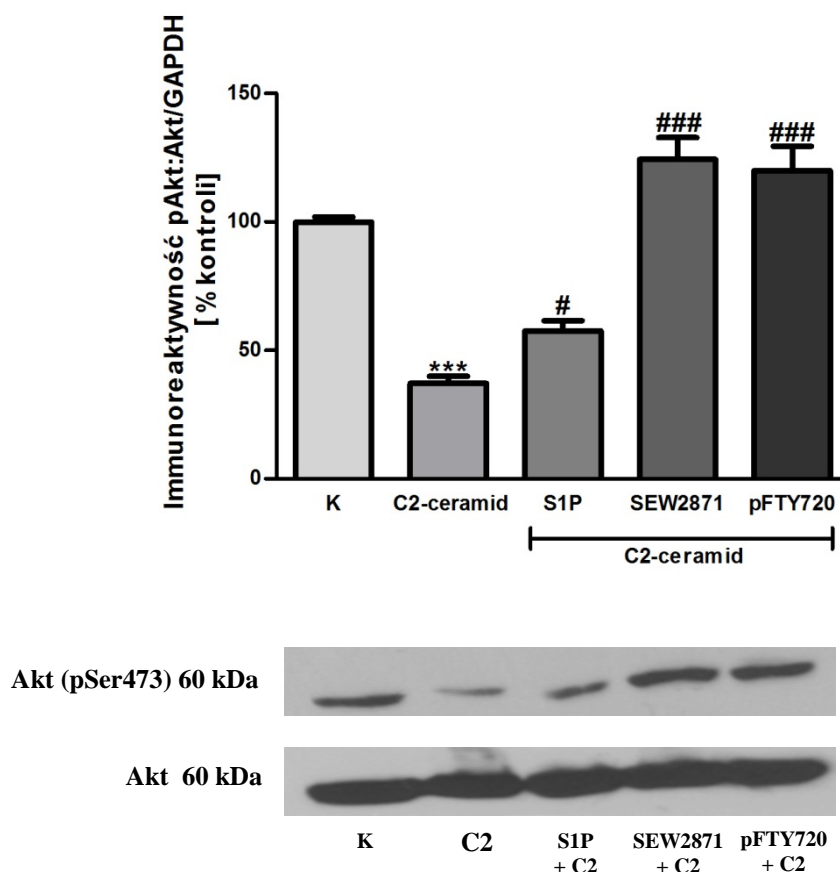
Zahamowanie PI3 kinazy w warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z S1P i C2-ceramidem znosiło pozytywny efekt działania S1P wskazując, że szlak PI3-K/Akt odgrywa istotne znaczenie w cytoprotekcji S1P (Rycina 24).



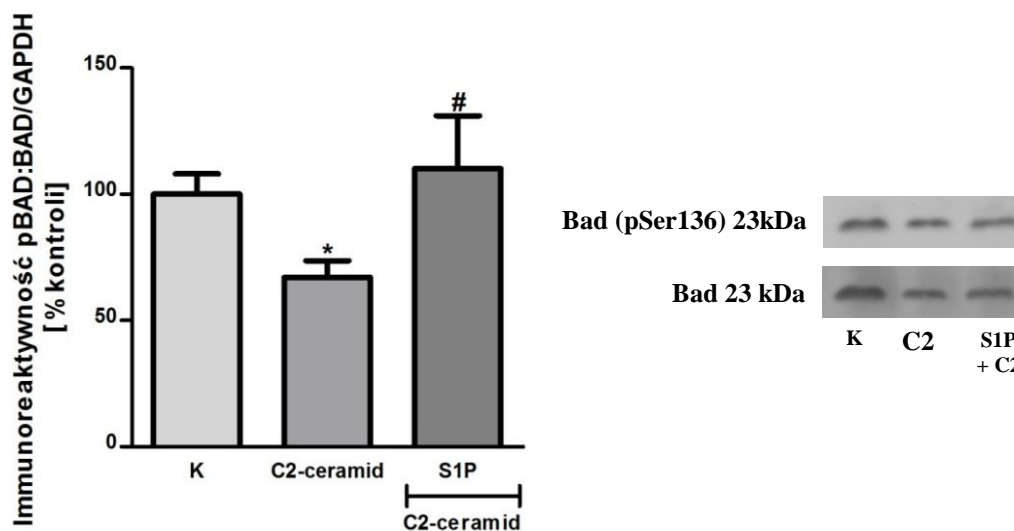
Rycina 24. Wpływ inhibitora PI3-K oraz S1P na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu.

*Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z: LY294002 50 μ M i S1P 1 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem, \$ $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem+S1P i S1P+LY294002+C2-ceramid.*

W związku z powyższym w dalszej kolejności analizowano wpływ S1P oraz agonistów receptorów dla S1P- SEW 2871 oraz pFTY720 na aktywność kinazy Akt oraz fosforylację białka Bad. Stwierdzono wzrost aktywności tej kinazy oraz wzrost fosforylacji białka Bad co prawdopodobnie wynika z pobudzenia receptorów S1PR1 i S1PR3 (Rycina 25, 26).



Rycina 25. Wpływ C2-ceramidu, S1P, SEW2871 oraz pFTY720 na immunoreaktywność kinazy pAkt i Akt. Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z: S1P 1 μ M, SEW2871 10 μ M oraz pFTY720 100pM, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 3 godz. Immunoreaktywność wymienionych białek badano metodą western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keuls, *** p <0,001 – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ### p <0,001, # p <0,05 – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem. Poniżej wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

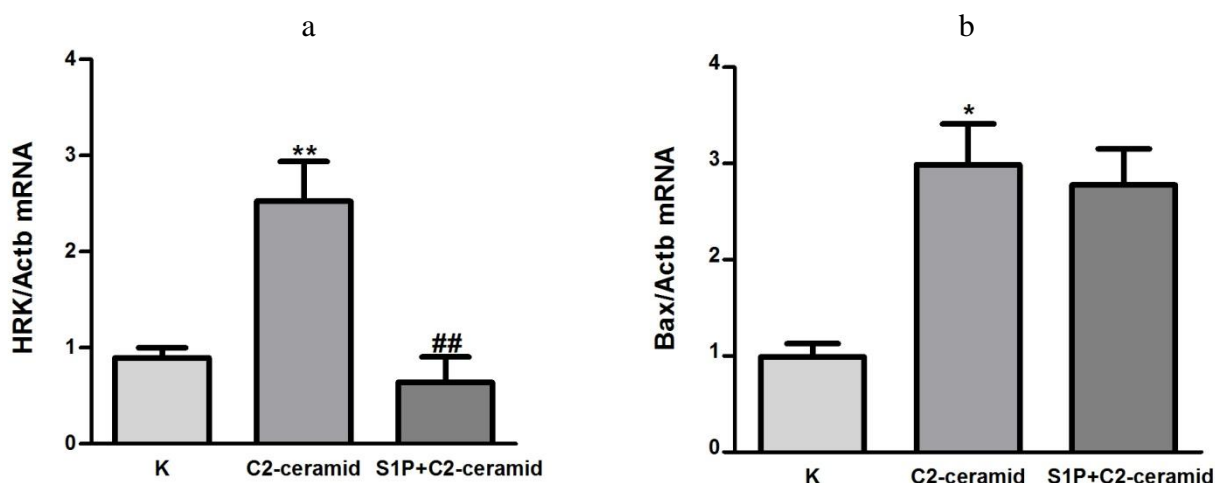


Rycina 26. Wpływ C2-ceramidu i S1P na immunoreaktywność białek pBad i Bad.

Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P $1\mu\text{M}$, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Immunoreaktywność wymienionych białek badano metodą western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń $\pm\text{SEM}$. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, # $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem. Obok wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

Analiza wpływu S1P na ekspresję genów/immunoreaktywność dla pro-i anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2

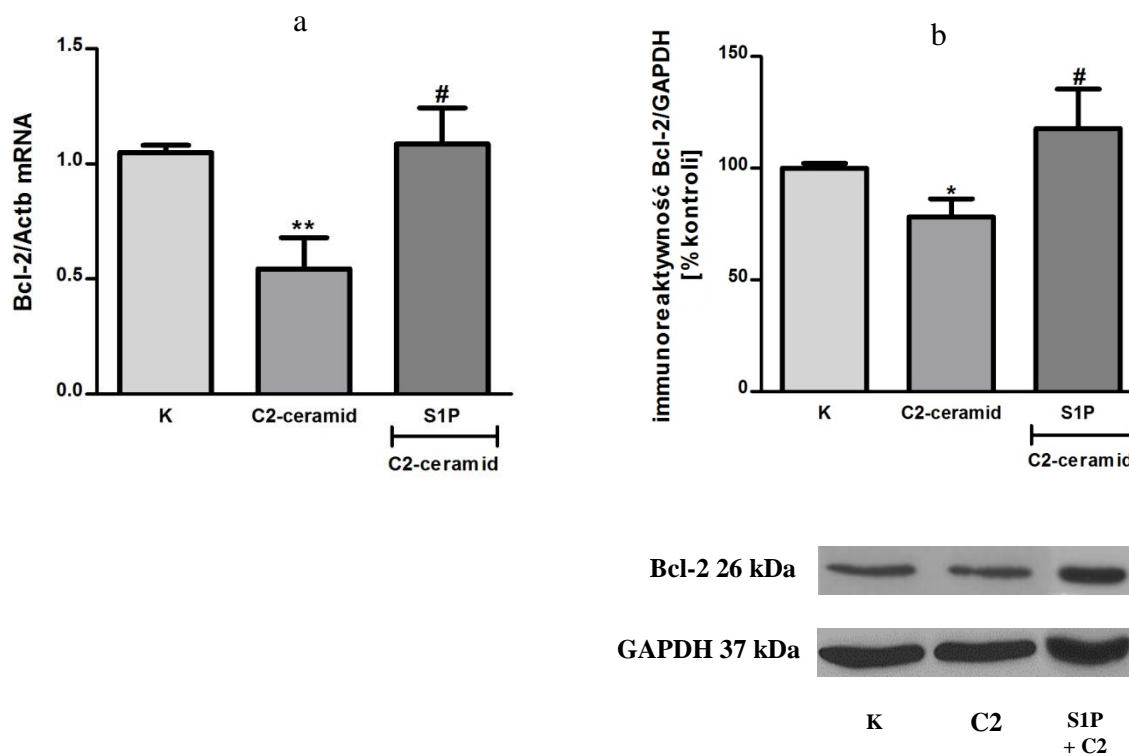
W przeprowadzonych badaniach wykazano, że S1P wywiera korzystne działanie powodując spadek ekspresji pro-apoptotycznego białka Hrk, nie wywiera natomiast wpływu na ekspresję białka Bax w porównaniu do wartości obserwowanych po samym C2-ceramidzie (Rycina 27a, b).



Rycina 27. Wpływ S1P na ekspresję genów dla pro-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (Hrk i Bax) (a, b) w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu

Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3 godz. z wyżej wymienionymi związkami. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech do czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keuls, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

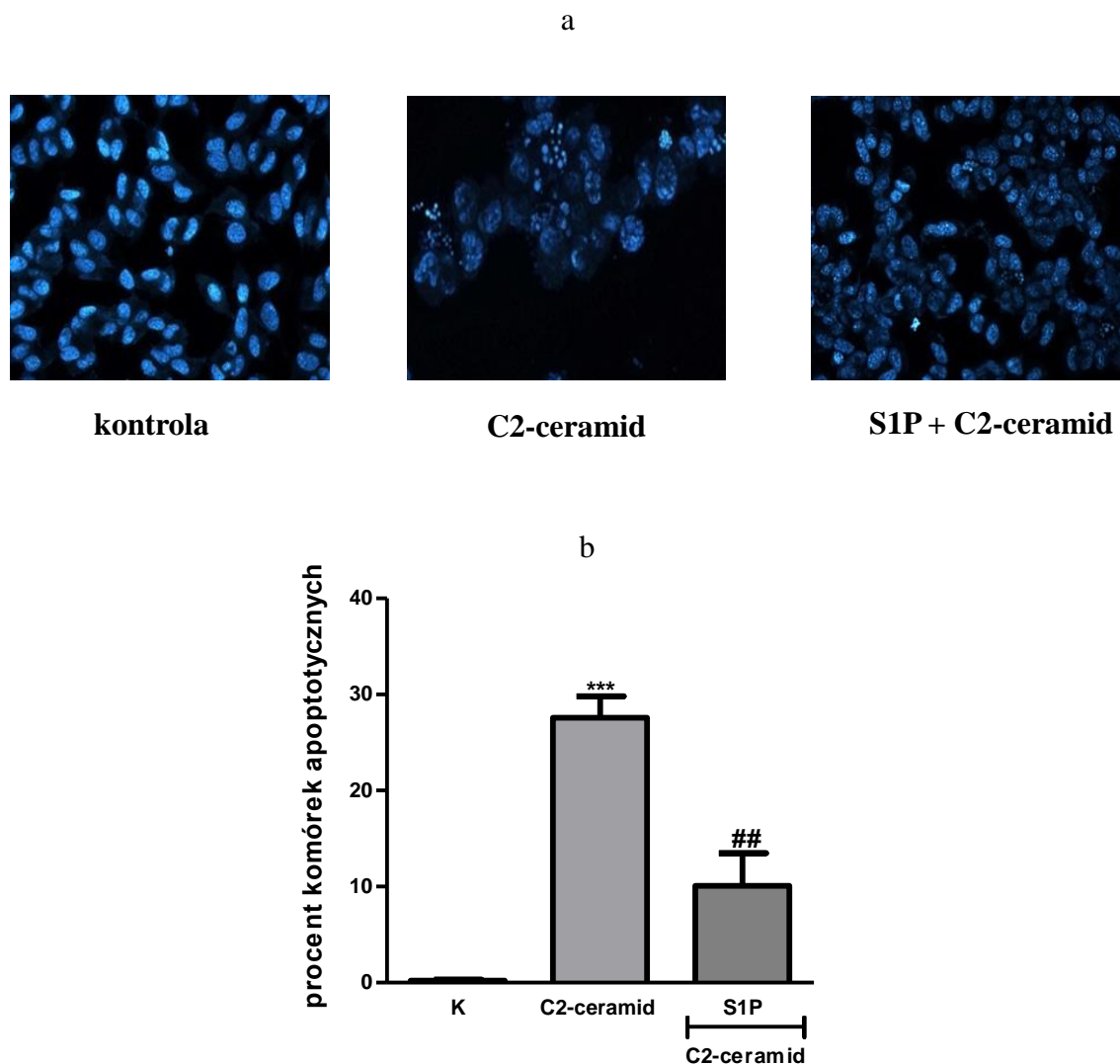
W następnej kolejności w mechanizmie protekcyjnego działania S1P stwierdzono wzrost ekspresji i immunoreaktywności anty-apoptycznego białka Bcl-2 (Rycina 28a, b).



Rycina 28. Wpływ C2-ceramidu oraz S1P na poziom mRNA (a) i immunoreaktywność białka Bcl-2 (b).
 a) Komórki SH-SY5Y inkubowane były przez 3 godz. z wyżej wymienionymi związkami. Wykresy przedstawiają poziom ekspresji genów badany metodą PCR w czasie rzeczywistym, a wynik normalizowany jest względem β -aktyny z trzech do czterech niezależnych doświadczeń w trzech powtórzeniach \pm SEM
 b) Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P 1μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Immunoreaktywność białka Bcl-2 badano metodą western blot w homogenacie komórkowym. Wykres przedstawia wynik analizy densytometrycznej normalizowanej względem GAPDH, który stanowi średnią arytmetyczną z trzech niezależnych doświadczeń \pm SEM.
 Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, # $p < 0,05$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem. Poniżej wykresu zamieszczono przykładowy wynik western blot.

Identyfikacja apoptozy w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego działaniem C2-ceramidu z zastosowaniem S1P

Badania w mikroskopie fluorescencyjnym z użyciem barwnika Hoechst 33342 wykazały, że S1P zmniejsza liczbę komórek apoptotycznych w warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem (Rycina 29a, b).



Rycina 29. Apoptoza wywołana C2-ceramidem i ochronne działanie S1P w komórkach SH-SY5Y po 24 godz. inkubacji

a) Komórki SH-SY5Y poddawane były 1 godzinnej pre-inkubacji z S1P 1 μ M, a następnie traktowane C2-ceramidem przez 24 godz. Po 24 godz. ekspozycji komórek SH-SY5Y wykonano barwienie sondą fluorescencyjną Hoechst 33342. Przykładowe zdjęcia komórek barwionych sondą fluorescencyjną Hoechst 33342.

b) Wartości zostały wyrażone w procentach komórek apoptotycznych. Przedstawione wyniki pochodzą z trzech doświadczeń w trzech powtórzeniach. Zdjęcia w mikroskopie fluorescencyjnym były wykonywane z dwóch pól widzenia, po czym policzono procent komórek apoptotycznych. Każdy wynik stanowi średnią arytmetyczną \pm SEM. Do oceny statystycznej wyników zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA, a następnie test porównań wielokrotnych Newmana-Keulsa, *** $p < 0,001$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek kontrolnych, ## $p < 0,01$ – różnica istotna statystycznie w stosunku do komórek traktowanych C2-ceramidem.

Dyskusja

W prowadzonych przeze mnie badaniach koncentrowałam się na poznaniu jakie szlaki przekazywania wewnątrzkomórkowego biorą udział w śmierci ludzkich komórek neuronalnych SH-SY5Y poddanych działaniu C2-ceramidu.

Z dostępnych badań literaturowych wiadomo, że w mechanizmie obumierania komórek w wyniku działania krótko i długołańcuchowych ceramidów ważną rolę odgrywa stres oksydacyjny (Nikolova-Karakashian i Rozenova 2010), definiowany jako stan braku równowagi między produkcją i usuwaniem wolnych rodników (Sies 1985). Wolne rodniki w tym reaktywne formy tlenu, powstają w normalnym metabolizmie komórki. Ich stężenie utrzymywane jest na niskim poziomie poprzez kompensacyjne działanie mechanizmów antyoksydacyjnych (Głód i Strosznajder 2001, Dröge 2002). Jednak w sytuacjach patologicznych równowaga pomiędzy produkcją i usuwaniem wolnych rodników zostaje zachwiana i dochodzi do stresu oksydacyjnego, który powoduje uszkodzenia makromolekuł i prowadzi do zaburzeń w funkcjonowaniu komórki (Czapski i Strosznajder 2008, Schieber i Chandel 2014). Stres oksydacyjny obserwowany jest w ostrych (np., niedokrwienie, uraz), jak i w przewlekłych schorzeniach ośrodkowego układu nerwowego (np., choroba Alzheimera, Parkinsona) (Dröge 2002, Strosznajder i wsp., 2005a, Adamczyk i wsp., 2008, Gaki i Papavassiliou 2014). Wolne rodniki powstawać mogą m.in. w reakcjach enzymatycznych katalizowanych przez syntazy tlenu azotu, oksydazę NADPH i kompleksy łańcucha oddechowego (Głód i Strosznajder 2001, Dröge 2002, Ott i wsp., 2007, Dikalov 2011). Zmiany wewnątrzkomórkowego stężenia jonów wapnia mogą również być źródłem anionorodnika ponadtlenu poprzez aktywację fosfolipazy A₂ (PLA₂), co prowadzi do konsekwencji do zwiększonego uwalniania kwasu arachidonowego, który jest substratem dla cyklooksigenaz (COXs) i lipooksygenaz (LOXs) (Phillis i wsp., 2006, Cąkała i Strosznajder 2008). W celu stwierdzenia czy w badanym modelu dochodzi do wzrostu produkcji wolnych rodników przeprowadzono eksperymenty z wykorzystaniem wskaźnika fluorescencyjnego DCF. Zaobserwowano wzrost poziomu wolnych rodników po 24 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem. W przedstawionej pracy nie stwierdzono protekcyjnego działania inhibitorów: COXs (indometacyna), LOXs (zileuton, AA-861 oraz baikaleina) ani inhibitora oksydazy NADPH (apocynina) na przeżywalność komórek SH-SY5Y w warunkach inkubacji z C2-ceramidem (dane nie prezentowane). W związku z powyższym źródłem reaktywnych form tlenu w badanym modelu mogą być mitochondria. Wynika to z danych literaturowych, które pokazują, że C2-ceramid powoduje hamowanie kompleksów łańcucha transportu

elektronów I, III i IV (Gudz i wsp., 1997, Di Paola i wsp., 2000, Kogot-Levin i Saada 2014). W systemie obrony komórek przed stresem oksydacyjnym ważną rolę odgrywają enzymy antyoksydacyjne takie jak dysmutaza ponadtlenkowa, katalaza i peroksydaza glutationowa (Valko i wsp., 2007). Wyniki pokazują, że C2-ceramid powoduje wzrost ekspresji enzymów antyoksydacyjnych: mitochondrialnej izoformy dysmutazy ponadtlenkowej (mtSOD) oraz peroksydazy wodoronadtlenków fosfolipidowych (GPx-4) w komórkach SH-SY5Y, co może świadczyć o uruchomieniu w komórce mechanizmów obronnych przed stresem oksydacyjnym. Mechanizm regulacji enzymów antyoksydacyjnych przez C2-ceramid nie jest poznany. Z dostępnych danych literaturowych wynika, że ceramidy mogą powodować wzrost ekspresji wyżej wymienionych enzymów poprzez aktywację czynników transkrypcyjnych: NF- κ B lub AP-1, jednakże hipoteza ta w badanym modelu wymaga weryfikacji (Mattson i wsp., 1997, Manna i wsp., 1998, Ayasolla i wsp., 2004, Won i Singh 2006).

Jedną z hipotez nadającą kierunek badań tej rozprawy było założenie, że w mechanizmie toksycznego działania C2-ceramidu bierze udział enzym jądrowy PARP-1. Jak powszechnie wiadomo, wzrost aktywności tego enzymu jest jednym z najwcześniejszych i najczulszych wskaźników wolnorodnikowego uszkodzenia DNA. Otrzymane w tej pracy wyniki po raz pierwszy wskazują, że na skutek stresu oksydacyjnego indukowanego przez C2-ceramid dochodzi do aktywacji PARP-1. Stwierdzono również wzrost immunoreaktywności poli(ADP-rybozy) (PAR) i spadek poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej. Wynik ten koresponduje z pracą Kim i wsp., (2007) w której zaobserwowano translokację białka AIF z mitochondrium do jądra komórkowego w warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem. W mojej pracy został przebadany także specyficzny inhibitor PARP-1 (PJ-34). Wykazano iż zastosowanie PJ-34 chroniło komórki SH-SY5Y przed obumieraniem oraz zmniejszało poziom wolnych rodników w warunkach stresu wywołanego C2-ceramidem. Wynik ten jest zgodny z innymi danymi literaturowymi, gdzie wykazano, że inhibitory PARP-1 w modelach niedokrwienia mózgu i serca zapobiegają nie tylko obniżeniu stężenia β -NAD⁺ i ATP, ale też zmniejszają wolnorodnikowe uszkodzenia lipidów i białek (Szabados i wsp., 2000, Halmosi i wsp., 2001). W badaniach własnych przeprowadzonych bez materiału biologicznego metodą redukcji rodnika DPPH mającego na celu stwierdzenie lub wykluczenie istnienia komponenty antyoksydacyjnej w działaniu PJ-34 wykazano, że stosowany związek nie wykazuje *per se* działania antyoksydacyjnego (dane niereprezentowane).

W przedstawionej pracy stwierdzono, że zahamowanie aktywności PARP-1 w znaczący sposób zapobiega spadkowi immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej. Z badań literaturowych wynika, że produkt enzymatycznej reakcji PARP-1, PAR jest bardzo ważną molekułą sygnalizacyjną, która bierze udział w przekazywaniu informacji pomiędzy jądrem komórkowym a mitochondrium (Dawson i Dawson 2004, Otera i wsp., 2005, Yu i wsp., 2006, Wang i wsp., 2009, Fatokun i wsp., 2014). PAR, poprzez zmiany przepuszczalności błony mitochondrialnej, może być odpowiedzialny za uwalnianie białka AIF, co w konsekwencji może doprowadzać do apoptozy niezależnej od kaspaz (Yu i wsp., 2006, Wang i wsp., 2009, 2011).

Jak zostało zaznaczone we wstępie pracy białko AIF wydaje się być niezbędne do prawidłowej fosforylacji oksydacyjnej. Badania Vahsen i wsp., (2004) pokazują, że obniżona fosforylacja oksydacyjna w siatkówce i mózgu myszy Harlequin (Hq) może korelować ze spadkiem ekspresji białek, które wchodzą w skład podjednostek kompleksu I łańcucha oddechowego. Myszy Hq charakteryzują się postępującą ataksją i ślepotą spowodowaną degeneracją neuronów oraz obniżonym poziomem ekspresji białka AIF do 10-20% w porównaniu ze zwierzętami kontrolnymi (Vahsen i wsp., 2004). W badaniach prowadzonych przez Klein i wsp., (2002) stwierdzono, że niska ekspresja białka AIF u myszy Hq powoduje wzrost peroksydacji lipidów, aktywności katalazy i reduktazy glutationowej w badanych regionach mózgu.

Zaobserwowano, że część komórek SH-SY5Y wykazuje zmiany morfologiczne charakterystyczne dla procesu apoptozy, takie jak kondensacja chromatyny, czy fragmentacja jądra komórkowego. Ze względu na brak ochronnego działania inhibitora pan kaspaz Z-VAD-FMK i wzrost aktywności PARP-1 można wykluczyć śmierć komórek SH-SY5Y na drodze zależnej od kaspaz. Istnieje jednak możliwość, że pozostałe komórki mogą obumierać na drodze autofagii, jak również nekrozy.

Wyniki przedstawione przeze mnie pokazują protekcyjne działanie inhibitora p53 (pifinityna- α), co sugeruje udział tego białka w śmierci komórek SHSY5Y indukowanej przez C2-ceramid. Jak wcześniej wspomniano we wstępie rozprawy doktorskiej, szereg prac pokazuje współdziałanie ceramidu i białka p53 w programowanej śmierci komórek (Heffernan-Stroud i Obeid 2011, Hage-Sleiman i wsp., 2013). Zwiększenie aktywności p53 wywołane przez stres oksydacyjny prowadzi do aktywacji procesów apoptozy w neuronach i innych typach komórek (Haupt i wsp., 2003, Wang i wsp., 2014). Uważa się, że PARP-1 jest odpowiedzialny za kontrolę poziomu białka p53 i regulację jego stabilności w komórce (Węsierska-Gądek i wsp., 1999). Białko p53 ulega poli(ADP-rybozylacji) zarówno w

warunkach *in vitro* jak i *in vivo*, co uniemożliwia wiązanie tego białka ze specyficzną sekwencją DNA i hamuje jego aktywność transkrypcyjną (Simbulan-Rosenthal i wsp., 2001, Mendoza-Alvarez i Alvarez-Gonzalez 2001).

Białko p53 może regulować proces apoptozy wpływając na ekspresję pro- i anti-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2 (Chipuk i wsp., 2004, Mihara i wsp., 2003, Chi i wsp., 2014, Wang i wsp., 2014). W niniejszej pracy zaobserwowano spadek ekspresji i immunoreaktywności anti-apoptotycznego białka Bcl-2 w warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem. Stwierdzono natomiast wzrost ekspresji pro-apoptotycznego białka Bax. Wynik ten koresponduje z wynikami pracy Kim i wsp., (2002) w której zaprezentowano, że C2-ceramid powoduje wzrost immunoreaktywności białka p53, któremu towarzyszy spadek poziomu białka Bcl-2 i wzrost poziomu pro-apoptotycznego białka Bax. Wykazano, że aktywacja ekspresji białka Bax wpływa na jego oligomeryzację, co w konsekwencji może skutkować zmianami interakcji białko-białko i zmianami fosforylacji, wpływając na translokację tego białka do mitochondriów (Czabotar i wsp., 2011, 2013). Białko Bax może wówczas tworzyć kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, co może prowadzić do uwolnienia m.in. białka AIF (Cabon i wsp., 2011). Ponadto w badaniach Siskind i wsp., (2003) stwierdzono, że C2-ceramid może tworzyć kanały w zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Wykazano, że białko Bax współdziała z ceramidem powodując wzrost przepuszczalności błony mitochondrialnej (Kim i wsp., 2001, von Haefen i wsp., 2002, Ganesan i wsp., 2010).

Reasumując wyniki w niniejszej pracy sugerują, że zaburzenie funkcji mitochondriów wywołane przez C2-ceramid, białko Bax i polimer PAR doprowadza do uwolnienia białka AIF z mitochondrium i apoptozy zależnej od PARP-1. Zwłaszcza, że podanie inhibitora megakanalu mitochondrialnego – cyklosporyny A wywołało działanie ochronne prowadzące do zwiększenia przeżywalności komórek SH-SY5Y w warunkach inkubacji z C2-ceramidem.

Ceramid może wpływać na anti-apoptotyczne białko Bcl-2 poprzez inny mechanizm. Wykazano, że aktywowana przez C2-ceramid fosfataza PP2A może defosforylować białko Bcl-2 na Ser 70, powodując utratę jego anti-apoptotycznych właściwości i zwiększając powinowactwo do białka p53 (Ruvolo i wsp., 1999, Deng i wsp., 2009). Liczne badania pokazują, że nadekspresja genu dla białka Bcl-2 w komórkach chroni przed apoptozą wywoływaną przez egzogenne ceramidy (Zhang i wsp., 1996, Kim i wsp., 2007, Deng i wsp., 2009).

Jedną z najważniejszych kinaz przyczyniającą się do przeżycia komórek jest serynowo-treoninowa kinaza Akt zwana także kinazą białkową B (PKB) . W przedstawionej

pracy zastosowanie inhibitora PI3 kinazy (LY-294002) pośredniczącej w przekazywaniu sygnału do Akt wraz z C2-ceramidem nie powodowało dalszego obumierania komórek w stosunku do komórek inkubowanych tylko z C2-ceramidem. Wynik ten wskazuje na udział PI3-K w procesie śmierci komórek SH-SY5Y. W kolejnych doświadczeniach wykazano, że C2-ceramid powoduje spadek fosforylacji kinazy Akt na Ser423, co sugeruje zahamowanie aktywności tej kinazy. Do chwili obecnej zostało zidentyfikowanych ponad 50 białek efektorowych dla kinazy Akt. Konsekwencją fosforylacji przez Akt tych białek może być ich inaktywacja, degradacja lub zmiana lokalizacji komórkowej. Stwierdzono, że zarówno pro- jak i anty-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2 są fosforylowane przez Akt. Jednym z takich białek jest Bad. Białko Bad łączy się z białkiem anty-apoptotycznym Bcl-X_L i indukuje śmierć komórki (Datta i wsp., 1997). Fosforylacja białka Bad na Ser 136 powoduje jego związanie się z białkiem adaptorowym 14-3-3 i sekwestrację w cytoplazmie. W przedstawionej pracy wykazano, że C2-ceramid powoduje spadek fosforylacji białka Bad i uruchomienie jego pro-apoptotycznego działania, co jest konsekwencją zahamowania aktywności kinazy Akt. Jednym z białek efektorowych fosforylowanych przez Akt jest kinaza syntazy glikogenu 3 (GSK3 β). Kinaza GSK3 β posiada dwa miejsca fosforylacji, które regulują jej aktywność (seryna 9 i tyrozyna 216). Fosforylacja seryny 9 GSK3 β przez Akt blokuje jej aktywność względem substratów, które wymagają wstępnej fosforylacji (Cohen i Frame 2001). Z przeprowadzonych w mojej pracy badaniach wynika, że C2-ceramid powoduje obniżenie fosforylacji GSK3 β (Ser9), przyczyniając się w ten sposób do wzrostu aktywności tego enzymu, co jest kolejnym dowodem zahamowania aktywności kinazy Akt. Wyniki te są zgodne z pracami dostępnymi w piśmiennictwie, które przedstawiają zahamowanie kinazy Akt, wzrost aktywności GSK3 β oraz spadek fosforylacji białka Bad w warunkach inkubacji komórek z C2-ceramidem (Zhou i wsp., 1998, Stoica i wsp., 2003, Kim i wsp., 2007, Lin i wsp., 2007, Arboleda i wsp., 2010).

Badania ostatnich kilku lat wykazały istotną rolę GSK3 β w śmierci komórek (Linseman i wsp., 2004, Lin i wsp., 2007). GSK3 β fosforyluje serynę 163 białka pro-apoptotycznego Bax, co skutkuje jego translokacją do mitochondrów (Linseman i wsp., 2004).

Wyniki przedstawione przeze mnie pokazują, że hamowanie aktywności PARP-1 powoduje wzrost fosforylacji kinazy Akt w komórkach SH-SY5Y poddanych działaniu C2-ceramidu. Towarzyszy temu wzrost fosforylacji białka Bad i zahamowanie jego pro-apoptotycznego działania. Wcześniejsze prace również sugerują, że zastosowanie inhibitorów PARP-1 wpływa na wzrost fosforylacji i tym samym aktywności kinazy Akt (Tapodi i wsp., 2005, Noh i wsp., 2013, Song i wsp., 2013). Z badań przeprowadzonych przez

Noh i wsp., (2013) wynika, że w warunkach hipoksji w hodowli pierwotnych neuronów korowych dochodzi do wzrostu aktywności PARP-1 i do translokacji białka AIF do jądra komórkowego. Zastosowanie aktywatora PI3-K w cytowanych badaniach skutkowało obniżeniem aktywności PARP-1 do poziomu kontrolnego i spadkiem poziomu białka AIF we frakcji cytozolowej i jądrowej. Autorzy sugerują, że może to wynikać ze wzrostu aktywności pro-życiowej kinazy Akt (Noh i wsp., 2013). Hipoteza, że Akt blokuje śmierć komórek poprzez hamowanie translokacji białka AIF z mitochondrium do jądra komórkowego znajduje potwierdzenie w innych badaniach (Kim i wsp., 2007, Yang i wsp., 2013). Kim i wsp., (2007) stwierdzili, że nadekspresja genu dla kinazy Akt przeciwdziała apoptozie i translokacji białka AIF w komórkach SH-SY5Y traktowanych C2-ceramidem. Natomiast, Yang i wsp., (2013) pokazali, że zahamowanie aktywności PARP-1 powoduje wzrost fosforylacji kinaz: Akt i GSK3 β , co przeciwdziała obniżeniu poziomu białka AIF w mitochondriach w hodowli pierwotnej neuronów hipokampa w modelu epilepsji *in vitro*. Wyniki przedstawione przeze mnie również pokazują, że zastosowanie inhibitora PJ-34 powoduje wzrost fosforylacji kinazy Akt i przeciwdziała obniżeniu poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej w komórkach SH-SY5Y traktowanych C2-ceramidem.

Istotne znaczenie w regulacji aktywności PARP-1 wydaje się odgrywać kinaza ERK1/2. Badania własne wykazały protekcyjny wpływ zahamowania aktywności ERK1/2 w komórkach SH-SY5Y. Zmiany aktywności ERK1/2 mogą w istotny sposób wpływać na poziom PAR. Badania Kauppinen i wsp., (2006) pokazały, że zastosowanie inhibitora kinazy ERK1/2 powoduje obniżenie aktywności PARP-1 i poziomu PAR, i tym samym chroni komórki astrocytów i kokulturę komórek astrocytów i neuronów przed śmiercią w warunkach stresu genotoksycznego. W badaniach *in vivo* w szczurzym modelu hipoglikemii również stwierdzono protekcyjne działanie inhibitora ERK1/2, który zmniejszał poziom polimeru PAR (Kauppinen i wsp., 2006). Z kolei Èthier i wsp., (2007) w badaniach przeprowadzonych na komórkach HeLa w stresie genotoksycznym stwierdzili, że wzrost aktywności PARP-1 i nadmierna synteza polimeru PAR powoduje obniżenie fosforylacji kinazy ERK1/2, translokację białka Bax do błony mitochondrialnej i uwolnienie cytochromu c oraz białka AIF z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium. Zastosowanie inhibitora PARP-1 chroniło komórki HeLa przed śmiercią poprzez wzrost fosforylacji kinazy ERK1/2. Natomiast inhibitor kinazy ERK1/2 niwelował ten protekcyjny efekt (Èthier i wsp., 2007). Dane literaturowe wskazują, że ceramidy mogą powodować zahamowanie lub aktywację kinazy ERK1/2 w zależności od typu badanych komórek. Badania Oh i wsp., (2006) pokazują, że C2-ceramid powoduje wzrost fosforylacji kinaz ERK1/2 oraz JNK w hodowli

pierwotnej mysich astrocytów po 24 godzinnej inkubacji. Zahamowanie aktywności tych kinaz poprzez zastosowanie odpowiednich inhibitorów miało znamienne działanie protekcyjne. Z kolei Arboleda i wsp., (2010) wskazują na spadek fosforylacji kinazy ERK1/2 oraz wzrost aktywności kinazy JNK w komórkach traktowanych C2-ceramidem. Badania Willaime i wsp., (2001) pokazują, że C2-ceramid powoduje spadek fosforylacji kinazy ERK1/2 i kinazy ją aktywującej MEK1/2 oraz wzrost fosforylacji kinazy p38 MAPK w hodowli pierwotnej mysich neuronów korowych po 24 godz. inkubacji. Wyniki Stoica i wsp., (2005) przedstawiają również spadek aktywności kinazy ERK1/2 i towarzyszący temu wzrost fosforylacji kinazy p38 MAPK w hodowli pierwotnej szczurzych neuronów korowych poddanych działaniu C2-ceramidu. Zmiany w fosforylacji obu kinaz wywołane przez C2-ceramid nie są jednak długotrwałe, po 24 godz. wracają do wartości kontrolnej. W publikacji Stoica i wsp., (2005) inkubacja neuronów korowych z C2-ceramidem powodowała zwiększenie immunoreaktywności cytochromu c, białka AIF oraz Smac/Diablo we frakcji cytozolowej. Zastosowanie w badanym modelu inhibitorów kinaz ERK1/2 i p38 MAPK przeciwdziało śmierci neuronów korowych i zapobiegało zaburzeniu funkcji mitochondriów wywołanemu przez C2-ceramid. Autorzy postulują, że C2-ceramid powoduje niecałkowite i tymczasowe zahamowanie aktywności kinazy ERK1/2 oraz utrzymuje ją na takim poziomie, który jest wystarczający do indukcji pro-apoptycznego szlaku. Na tej podstawie obserwowane jest protekcyjne działanie inhibitora kinazy ERK1/2 w warunkach inkubacji neuronów korowych z C2-ceramidem (Stoica i wsp., 2005).

Dane literaturowe pokazują również, że ważną rolę w apoptozie zależnej od ceramidów odgrywają kinazy JNK oraz p38 MAPK. Zastosowanie odpowiednich inhibitorów tych kinaz ma protekcyjne działanie w wielu badaniach przeprowadzonych na hodowlach komórkowych *in vitro* (Willaime i wsp., 2001, Willaime-Morawek i wsp., 2003, Kim i wsp., 2008). Moje badania przedstawione w niniejszej pracy wykazały korzystny wpływ inhibitora kinazy JNK (SP600125) na przeżywalność komórek SH-SY5Y poddanych działaniu C2-ceramidu. Wyniki badań Arboleda i wsp., (2010) wskazują, że zahamowanie aktywności kinaz PI3-K/Akt oraz ERK1/2 przez C2-ceramid poprzedzone jest wzrostem aktywności kinazy JNK. Levresse i wsp., (2000) pokazali, że kinaza Akt może negatywnie regulować aktywność kinazy JNK. W komórkach PC12 w warunkach zastosowania medium pozbawionego surowicy dochodzi do wzrostu aktywności kinazy JNK. Zastosowanie insulinopodobnego czynnika wzrostu (IGF-1) w tych warunkach powoduje pobudzenie szlaku PI3-K/Akt oraz zahamowanie aktywności kinazy JNK. Z kolei zastosowanie inhibitora PI3-K/Akt w warunkach obecności surowicy w medium komórkowym spowodowało wzrost

aktywności kinazy JNK. Podobny wynik otrzymano w badaniach Shimoke i wsp., (1999), gdzie zastosowanie inhibitora PI3-K/Akt indukowało apoptozę w neuronach ziarnistych mózdzku poprzez wzrost aktywności kinazy JNK. Kolejnym przykładem mogą być badania Yeste-Velasco i wsp., (2009), w których wykazano, że inhibitor JNK chronił komórki ziarniste mózdzku przed apoptozą indukowaną zastosowaniem medium pozbawionego surowicy i jonów potasowych poprzez pobudzenie szlaku PI3-K/Akt.

W moich badaniach przedstawionych w niniejszej pracy C2-ceramid powoduje wzrost ekspresji pro-apoptotycznego białka Hrk (harakiri) –zawierającego tylko domenę BH3. Białko Hrk poprzez domenę BH3 wchodzi w interakcje z białkami anty-apoptotycznymi Bcl-2 i Bcl-X_L, hamując w ten sposób ich pro-życiowe działanie (Inohara i wsp., 1997, Barrera-Vilarmau i wsp., 2011). Wykazano, że nadekspresja genów dla tych anty-apoptotycznych białek chroni hematopoetyczne komórki progenitorowe przed apoptozą zależną od Hrk w warunkach bez obecności czynników wzrostu (Sanz i wsp., 2000). Badania, w tym również te przedstawione w niniejszej pracy pokazują, że do indukcji apoptozy z udziałem białka Hrk konieczny jest wzrost ekspresji genu dla białka Bax (Harris i Johnson 2001, Ghosh i wsp., 2011). Stwierdzono, że białko Hrk odgrywa ważną rolę na etapie rozwoju embrionalnego. U myszy z podwójną homozygotyczną delecją genu dla Hrk zaobserwowano zahamowanie procesu programowanej śmierci komórek w trakcie rozwoju układu nerwowego (Ghosh i wsp., 2011).

Wyniki w niniejszej pracy korespondują z badaniami Chen i wsp., (2006), w których C2-ceramid powodował wzrost ekspresji genu dla białka Hrk w oligodendrocytach. poprzez aktywację kinazy JNK. Zaobserwowano, że w wyniku aktywacji kinazy JNK dochodzi do fosforylacji białka c-jun, który jest składnikiem czynnika transkrypcyjnego AP-1. Wykazano, że poprzez ten czynnik transkrypcyjny regulowana jest ekspresja pro-apoptotycznego białka Hrk (Chen i wsp., 2006). Moje badania po raz pierwszy wykazały, że zahamowanie aktywności PARP-1 powoduje znaczący spadek poziomu mRNA białka Hrk. Najprawdopodobniej wynika to z zahamowania aktywności kinazy JNK przez inhibitory PARP-1 (Song i wsp., 2008, Sarszegi i wsp., 2012, Radnai i wsp., 2012).

Stwierdziłam, że zahamowanie aktywności PARP-1 powoduje wzrost ekspresji i immunoreaktywności białka Bcl-2, nie ma natomiast wpływu na ekspresję białka Bax. W pracy Strosznajder i Gajkowska (2006) zaobserwowano, że zastosowanie inhibitora PARP-1 w modelu globalnego niedokrwienia/reperfuzji mózgu gerbila skutkowało wzrostem ekspresji białka Bcl-2 w rejonie CA1 hipokampa, nie miało natomiast wpływu na ekspresję białko Bax. Szereg przedstawionych prac dowodzi, że C2-ceramid powodując obniżenie fosforylacji

kinazy Akt oraz modulując aktywność kinaz MAPK decyduje o uruchomieniu pro-apoptycznego szlaku przekąźnictwa sygnałów. Uzyskane przez mnie wyniki wykazują, że zahamowanie aktywności PARP-1 wpływa na fosforylację kinazy Akt. W związku z tym można wnioskować, że zmianom ulegają aktywności kinaz ERK1/2, JNK. Świadczy o tym protekcyjne działanie inhibitorów tych kinaz oraz wpływ inhibitora PARP-1 na pro- i anty-apoptyczne białka z rodziny Bcl-2.

Kinaza sfingozyny typu 1 (Sphk1) jest głównym enzymem, którego aktywność reguluje poziom wewnątrzkomórkowego bioaktywnego sfingolipidu: sfingozyno-1-fosforanu (S1P). W warunkach stresu oksydacyjnego może dochodzić do wzrostu lub obniżenia aktywności Sphk1 (Jin i wsp., 2004, Taha i wsp., 2004, Gomez-Brouchet i wsp., 2007, Ader i wsp., 2008). W związku z tym Sphk1 odgrywa ważną rolę w utrzymaniu równowagi pomiędzy pro-apoptycznym ceramidem i anty-apoptycznym S1P. Zwiększoną aktywność Sphk1 stwierdzono w wielu typach nowotworów m. in. płuc, mózgu, okrężnicy, jajnika i piersi (Johnson i wsp., 2005, Van Brocklyn i wsp., 2005, Ader i wsp., 2008). Wykazano także, że podczas uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjnego w wyizolowanych mysich kardiomiocytach dochodzi do aktywacji kinazy Sphk1. Podczas uszkodzenia pobudzone są receptory S1PR2 i S1PR3, za pośrednictwem których S1P powoduje wzrost fosforylacji kinazy Akt (Means i wsp., 2007). Inne badania pokazują, że w linii komórkowej kardiomioblastów stres oksydacyjny wywołany serotoniną lub nadtlenkiem wodoru powoduje zahamowanie aktywności Sphk1, wzrost poziomu ceramidu i spadek S1P (Pchejetski i wsp., 2007). Spadek aktywności Sphk1 stwierdzono w warunkach stresu oksydacyjnego w komórkach SH-SY5Y traktowanych peptydem A β (25-35). Konsekwencją był wzrost poziomu ceramidu i spadek S1P (Gomez-Brouchet i wsp., 2007). Podobnie w pracy Gąssowska i wsp., (2014) w komórkach PC12 stabilnie transfekowanych ludzkim genem białka prekursorowego A β (APP) typu dzikiego (APPwt) lub z mutacją typu szwedzkiego (APPsw, K670M/N671L) wykazano spadek ekspresji/immunoreaktywności i aktywności kinazy sfingozyny 1. Wyniki własne pokazują, że C2-ceramid powoduje spadek aktywności kinazy sfingozyny typu 1 po 3 i 24 godz. inkubacji. Po 3 godz. inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem dochodzi do wzrostu poziomu mRNA kinazy sfingozyny typu 1, natomiast nie zmienia się ekspresja genu dla kinazy sfingozyny typu 2. Inkubacja komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem nie wpływa na immunoreaktywność Sphk1 po 24 godz. Spadek aktywności Sphk1 przypuszczalnie świadczy o tym, że w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego C2-ceramidem poziom endogenego S1P ulega zmniejszeniu, natomiast egzogeny S1P wywiera efekt neuroprotekcyjny poprzez aktywację szlaku przekąźnictwa zależnego od

receptora 1 i 3. Podobny efekt wykazują agoniści receptorów dla S1P. C2-ceramid powoduje spadek ekspresji receptora 1 i 3 dla S1P. Protekcyjne działanie sfingozyno-1-fosforanu w warunkach inkubacji komórek HL-60, U937 oraz Jurkat T z TNF- α i ligandem dla receptora Fas, które jak wiadomo powodują wzrost endogennej puli ceramidów oraz z C2-ceramidem pokazały po raz pierwszy badania Cuvillier i wsp., (1996). Egzogennie dodany S1P (1 μ M) działał protekcyjnie poprzez stymulację aktywności kinazy ERK1/2 i zahamowanie kinazy JNK. W moich badaniach w wyniku pobudzenia przez S1P, pFTY720 i SEW2871 receptorów 1 i 3 dochodzi do wzrostu fosforylacji kinazy Akt. Wynik ten koresponduje z danymi opublikowanymi przez Nakahara i wsp., (2012), którzy w ludzkich komórkach ziarnistych w warunkach stresu oksydacyjnego obserwowali wzrost aktywności kinazy Akt pod wpływem S1P i w wyniku pobudzenia receptorów 1 i 3. Zastosowanie antagonistów receptorów 1 i 3 oraz inhibitora PI3 kinazy, podobnie jak w niniejszej pracy, znosiło protekcyjny efekt S1P. W przedstawionej pracy w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego C2-ceramidem zastosowano agonistów receptorów dla S1P, których protekcyjne działania obserwowane są w badaniach *in vitro* i *in vivo* (Rolland i wsp., 2011, Asle-Rousta i wsp., 2013, Doi i wsp., 2013). Potteck i wsp., (2010) stwierdzili, że pFTY720 w ludzkich komórkach fibroblastów poddanych działaniu TNF- α i actinomycyny powoduje poprzez pobudzenie szlaku związanego z receptorem 3 znaczący wzrost fosforylacji białka Bcl-2. Zaobserwowano również czasową indukcję fosforylacji kinaz ERK1/2 oraz Akt. Neuroprotekcyjne działanie pFTY720 w mysiej hodowli pierwotnej neuronów korowych traktowanej oligomerami peptydu A β związane jest ze wzrostem ekspresji genu i immunoreaktywności dla czynnika neurotroficznego pochodzenia mózgowego (BDNF) (Doi i wsp., 2013). W wynikach Doi i wsp., (2013) stwierdzono zależną od receptorów dla S1P aktywację kinazy ERK1/2. Zastosowanie inhibitora kinazy ERK1/2 całkowicie znosiło protekcyjne działanie pFTY720.

Protekcyjne działanie S1P w badaniach własnych omawianych w niniejszej rozprawie związane jest z wpływem tego związku na ekspresję/immunoreaktywność białek pro- i anti-apoptotycznych z rodziny Bcl-2. S1P powoduje znaczne obniżenie ekspresji genu dla białka Hrk, nie ma natomiast wpływu na poziom mRNA dla białka Bax. Poprzez pobudzenie szlaku związanego z receptorami dla S1P następuje także wzrost fosforylacji białka Bad. S1P przyczynia się do wzrostu ekspresji/immunoreaktywności anti-apoptotycznego białka Bcl-2. W literaturze występują prace, które pokazują protekcyjne działanie S1P związane z modulacją białek pro- i anti-apoptotycznych z rodziny Bcl-2. Sauer i wsp., (2005) wykazali, że S1P zwiększa poziom białka Bcl-2, nie ma natomiast wpływu na ekspresję genu dla białka Bax. Kolejna praca Betito i Cuvillier (2006) stwierdza, że S1P

działa protekcyjnie poprzez aktywację szlaku kinaz MEK/ERK/Rsk-1, co przyczynia się do fosforylacji białka Bad (Ser112) w komórkach Jurkat T poddanych działaniu liganda dla receptora Fas. S1P blokuje również translokację białka Bax z cytoplazmy do błony mitochondrialnej oraz uwalnianie cytochromu c i białka SMAC/Diablo (Cuvillier i Levade 2001, Betito i Cuvillier 2006). W pracy Pyszko i Strosznajder (2014) wykazano, podobnie jak w badaniach własnych, że egzogeny S1P zmniejsza ekspresję genu dla pro-apoptotycznego białka Hrk i zwiększa poziom mRNA dla białka Bcl-2 w komórkach SH-SY5Y w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego MPP⁺. Inaczej niż w badaniach własnych S1P zmniejszał ekspresję genu dla białka Bax (Pyszko i Strosznajder 2014). Dane literaturowe wskazują również, że nadekspresja genu dla kinazy sfingozyny 1 poprzez aktywację szlaku PI3-K/Akt/Foxo3a powoduje zwiększenie ekspresji genu dla białka Bcl-2 i zmniejszenie dla białka Bim (Bektas i wsp., 2005, Limaye i wsp., 2005, Guan i wsp., 2011). Podobnie Bonhoure i wsp., (2008) wykazali, że nadekspresja genu dla Sphk1 hamuje uwalnianie cytochromu c i białka SMAC/Diablo z przestrzeni międzybłonowej mitochondrium poprzez wpływ na białko pro-apoptotyczne Bim i anty-apoptotyczne Bcl-X_L.

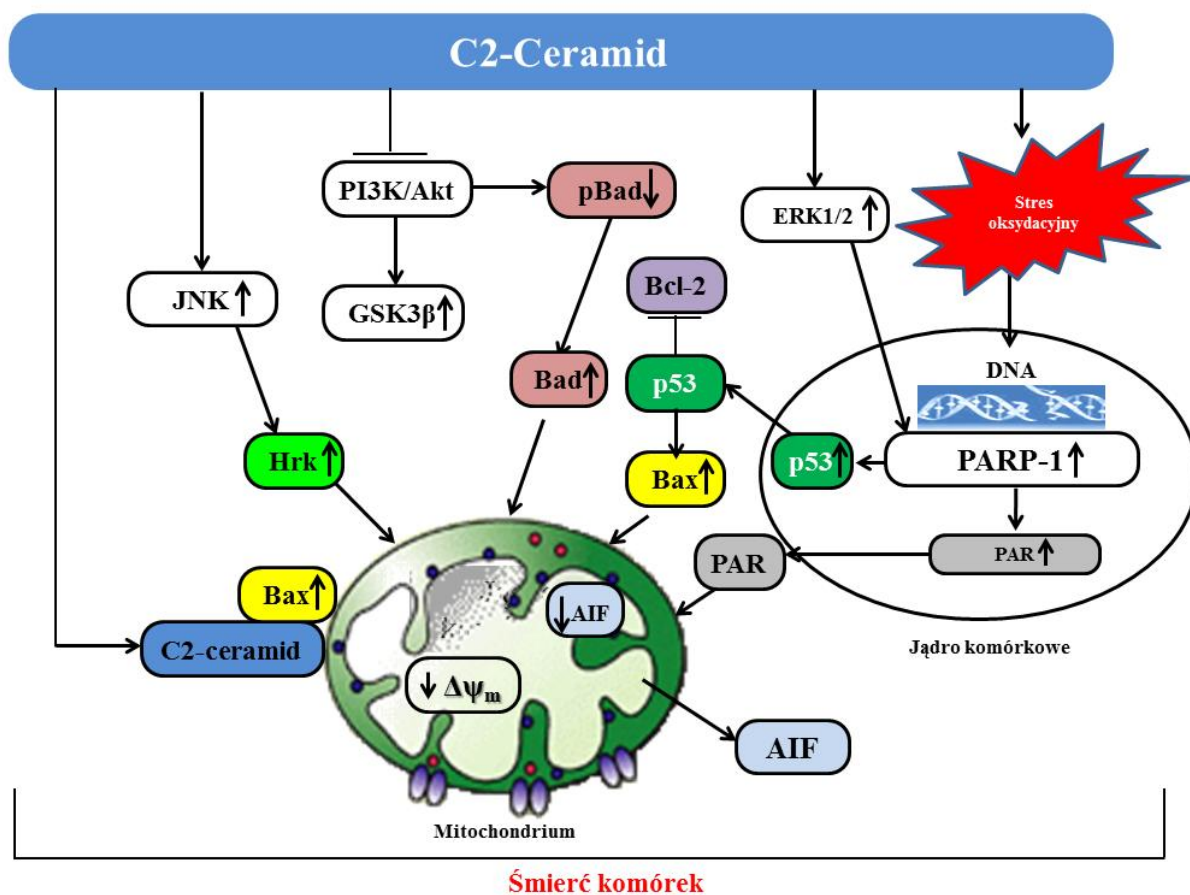
Podsumowując, uzyskane wyniki badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmu śmierci komórek w warunkach zwiększonego stężenia ceramidów, które obserwowane jest w wielu stanach patologicznych. Dodatkowo zastosowanie inhibitora PARP-1, poprzez zapobieganie uwalniania AIF z mitochondriów i hamowanie syntezy PAR oraz modulację pro- i anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2, w znaczący sposób zwiększa przeżycie komórek neuronalnych poddanych działaniu C2-ceramidu. W niniejszej pracy wskazano również jakie szlaki wewnątrzkomórkowe mogą być aktywowane na skutek pobudzenia receptorów dla S1P w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez ceramidę. Stwierdzono, że protekcyjne działanie S1P i agonistów receptorów dla S1P związane jest z aktywacją szlaku PI3-K/Akt oraz z wpływem na ekspresję/immunoreaktywność pro- i anty-apoptotycznych białek z rodziny Bcl-2.

Podsumowanie

1. Ceramid (C2) powoduje zależny od stężenia wzrost poziomu wolnych rodników i spadek przeżywalności komórek SH-SY5Y. Wyniki doświadczeń z zastosowaniem inhibitora kaspaz wskazują, że śmierć komórek SH-SY5Y zachodzi na drodze niezależnej od ich aktywacji.
2. Ceramid zwiększa aktywność PARP-1 i poziom PAR oraz doprowadza do obniżenia immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej. Inhibitor PARP-1 zapobiega uwalnianiu białka AIF, śmierci komórek SH-SY5Y oraz obniża poziom wolnych rodników.
3. W mechanizm śmierci komórek SH-SY5Y na drodze zależnej od PARP-1 zaangażowane są również kinazy białkowe ERK1/2, JNK oraz białko p53.
4. W molekularnym mechanizmie cytotoksyczności ceramidu ważną rolę odgrywa szlak przekąźnictwa sygnału zależnego od PI3-K/Akt. Ceramid powoduje spadek fosforylacji kinazy Akt oraz obniżenie fosforylacji kinazy GSK-3 β i pro-apoptycznego białka Bad.
5. W warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z ceramidem dochodzi do zmian ekspresji/immunoreaktywności białek z rodziny Bcl-2. Ceramid powoduje zwiększenie ekspresji pro-apoptycznych białek: Bax i Hrk oraz obniżenie ekspresji/immunoreaktywności anty-apoptycznego białka Bcl-2. Cyklosporyna A, inhibitor megakanalu mitochondrialnego w istotny sposób zapobiega cytotoksyczności ceramidu.
6. Zastosowanie inhibitora PARP-1 (PJ-34) powoduje wzrost fosforylacji kinazy Akt i białka Bad. Badania pokazują, że PJ-34 zmniejsza podwyższoną przez ceramid ekspresję pro-apoptycznego białka Hrk. PJ-34 powoduje również wzrost ekspresji/immunoreaktywności anty-apoptycznego białka Bcl-2.
7. Wyniki wskazują, że egzogeny S1P powoduje aktywację szlaku przekąźnictwa sygnału zależnego od PI3-K/Akt w warunkach działania ceramidu. Podobny efekt do S1P wywierają agoniści receptorów dla S1P (S1PR1 i S1PR3).

8. S1P zwiększa ekspresję/immunoreaktywność anty-apoptotycznego białka Bcl-2. Ponadto, S1P zmniejsza podwyższoną przez ceramid ekspresję pro-apoptotycznego białka Hrk.

Poniższy schemat obrazuje molekularne szlaki śmierci komórek SH-SY5Y poddanych działaniu ceramidu – na podstawie wyników własnych.



Schemat 8. Mechanizmy toksycznego działania C2-ceramidu wg danych uzyskanych w niniejszej pracy. Objaśnienia: ↑ - aktywacja, ↓ - hamowanie, $\Delta\psi_m$ - potencjał mitochondrialny, Bax, Hrk, Bad – pro-apoptotyczne białka z rodziny Bcl-2, Bcl-2 – anty-apoptotyczne białko z rodziny Bcl-2, AIF – czynnik indukujący apoptozę, PAR – poli(ADP-ryboza), PARP-1 – polimeraza poli(ADP-rybozy), ERK – kinaza regulowana sygnałem zewnątrzkomórkowym, JNK – kinaza N-końcowa c-JUN, GSK3 β – kinaza 3 syntazy glikogenu, PI3-K – kinaza 3-fosfatydyloinozytolu, Akt – kinaza białkowa B, pBad – ufosforylowane białko Bad.

Wnioski

- Uzyskane wyniki po raz pierwszy pokazują, że w kaskadzie zjawisk molekularnych prowadzących do obumierania komórek SH-SY5Y w warunkach działania ceramidu istotne znacznie odgrywa:
 - pobudzenie ścieżki sygnałowej zależnej od PARP-1/PAR/AIF oraz zaburzenie ekspresji białek z rodziny Bcl-2 co może w istotny sposób wpływać na funkcję mitochondriów.
 - hamowanie szlaku pro-życiowego zależnego od PI3-K/Akt, co może powodować translokację białka Bad do mitochondriów i zaburzenie ich funkcji.
- W mechanizmie ochronnego działania inhibitora PARP-1 istotne znaczenie ma udział szlaku PI3-K/Akt oraz białek z rodziny Bcl-2.
- S1P oraz modulatory receptorów dla S1P odgrywają ważną rolę neuroprotekcijną poprzez szlaki przekaźnictwa zależne od receptorów S1PR1 i S1PR3. W wyniku pobudzenia tych receptorów dochodzi do aktywacji szlaku PI3-K/Akt oraz zmian ekspresji/immunoreaktywności białek Bcl-2 i białka Hrk, co w konsekwencji może chronić mitochondria przed cytotoksycznym działaniem ceramidu.
- Uzyskane wyniki mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmu śmierci komórek w warunkach zwiększonego stężenia ceramidów. Ponadto wskazują możliwe punkty uchwytu dla skutecznego działania neuroprotekcijnego.

Streszczenie

Do grupy lipidów, które stały się przedmiotem zainteresowań badaczy w ciągu ostatnich dwóch dekad zalicza się sfingolipidy. Ścieżka sygnalizacyjna z udziałem bioaktywnych sfingolipidów do których należą m. in.: ceramidy, sfingozyna i sfingozyno-1-fosforan (S1P) pełni ważną funkcję regulatorową w procesach przeżycia i śmierci komórki. Ceramidy są sfingolipidami, których trzon stanowi długołańcuchowy nienasycony aminoalkohol sfingozyna połączony z resztą nasyconego lub nienasyconego kwasu tłuszczowego o długości łańcucha głównie 14–32 atomów węgla. Ceramidy biorą udział w regulacji takich procesów komórkowych jak: proliferacja i różnicowanie, wzrost, starzenie się oraz śmierć komórki. Zwiększenie poziomu endogennych ceramidów w komórce może być wynikiem: syntezy *de novo*, aktywacji syntaz ceramidu katalizujących ich powstawanie ze sfingozyny lub hydrolizy sfingomieliny. Natomiast, rozpad ceramidów odbywa się za pośrednictwem ceramidaz. Powstająca w wyniku tego rozpadu sfingozyna ulega fosforylacji przez kinazy sfingozyny typu 1 i 2 (Sphk1 oraz Sphk2) do sfingozyno-1-fosforanu (S1P). Ścieżka sygnalizacji S1P jest jednym z kluczowych regulatorów przeżycia, proliferacji i różnicowania komórek. S1P może działać jako przekaźnik pierwszego rzędu za pośrednictwem błonowych receptorów (GPCR) sprzężonych z białkami G oznaczonych S1PR1 do S1PR5 oraz jako wewnątrzkomórkowy przekaźnik drugiego rzędu. W związku z powyższym kinazy sfingozyny uważane są za kluczowe enzymy biorące udział w utrzymaniu równowagi pomiędzy bioaktywnymi sfingolipidami: ceramidem/S1P.

Należy zwrócić uwagę, że w ostatnim dziesięcioleciu dokonał się ogromny postęp w zrozumieniu funkcji bioaktywnych sfingolipidów takich jak: ceramid i S1P oraz enzymów biorących udział w ich metabolizmie, w regulacji wielu procesów komórkowych.

Stwierdzono, że nadmierny wzrost poziomu endogennych ceramidów i w konsekwencji zaburzenie biostatu ceramid/S1P obserwowane jest w wielu procesach patologicznych m.in. w niedotlenieniu/niedokrwieniu mózgu, w chorobach neurodegeneracyjnych oraz w procesie nowotworzenia. Mimo intensywnych badań w tym zakresie wiele zagadnień pozostaje nadal nie wyjaśnionych. W związku z powyższym celem pracy było zbadanie jakie procesy molekularne oraz szlaki przekaźnictwa wewnątrzkomórkowego biorą udział w śmierci ludzkich komórek neuronalnych SH-SY5Y wywołanej działaniem C2-ceramidu, z uwzględnieniem udziału enzymu jądrowego polimerazy poli(ADP-rybozy) (PARP-1). W licznych stanach patologicznych dochodzi do stresu oksydacyjnego i do nadmiernej aktywacji PARP-1, zużycia βNAD^+ i w konsekwencji ATP. Ponadto produkt PARP-1,

poli(ADP-ryboza) (PAR) jest cząstką sygnalizacyjną, której związanie się z błoną mitochondrialną może prowadzić do wypływu czynnika indukującego apoptozę (AIF) z mitochondriów i jego translokacji do jądra. W konsekwencji prowadzi to do śmierci komórki na drodze apoptozy niezależnej od aktywacji kaspaz.

Komórki SH-SY5Y traktowano C2-ceramidem (N-acetylo-D-erytro-sfingozyna), sfingolipidem mającym właściwości przechodzenia przez błony komórkowe, w przeciwieństwie do długołańcuchowych ceramidów. Obecność C2-ceramidu w niskich stężeniach stwierdzono w mózgu myszy oraz w ludzkiej korze czołowej w badaniach *postmortem*.

W przedstawionej przeze mnie pracy po raz pierwszy stwierdzono, że w stresie oksydacyjnym indukowanym przez C2-ceramid w komórkach SH-SY5Y dochodzi do wzrostu aktywności PARP-1 i immunoreaktywności PAR. Ponadto zaobserwowano spadek immunoreaktywności białka AIF we frakcji mitochondrialnej. W warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego ceramidem inhibitor PARP-1 (PJ-34) zwiększał przeżywalność komórek SH-SY5Y oraz obniżał poziom wolnych rodników. Następnie wykazano, że zastosowanie inhibitora PARP-1 zapobiega obniżeniu poziomu białka AIF we frakcji mitochondrialnej w komórkach SH-SY5Y.

Uzyskane przeze mnie wyniki wskazują, że C2-ceramid powoduje zahamowanie ważnego pro-życiowego szlaku PI3-K/Akt. W konsekwencji stwierdzono spadek fosforylacji białek efektorowych kinazy Akt: kinazy syntazy glikogenu 3 (GSK3 β) oraz pro-apoptycznego białka Bad. Wyniki pokazały ważną rolę kinazy Akt w cytoprotekcyjnym działaniu inhibitora PJ-34. Zastosowanie inhibitora PJ-34 skutkowało wzrostem fosforylacji kinazy Akt i białka Bad.

W mechanizmie śmierci komórek SH-SY5Y indukowanej C2-ceramidem stwierdzono udział kinaz białkowych ERK1/2 i JNK oraz białka p53. Dane literaturowe wskazują, że w śmierć komórek na drodze zależnej od PARP-1 mogą być zaangażowane kinazy białkowe, które tak jak ERK1/2 i JNK bezpośrednio wpływają na fosforylację PARP-1 powodując tym samym wzrost aktywności tego enzymu. Uważa się, że PARP-1 jest odpowiedzialny za kontrolę poziomu białka p53 i regulację jego stabilności w komórce.

Wyniki pokazały, że egzogeny S1P ma działanie protekcyjne w wyniku pobudzenia receptorów S1PR1 i S1PR3. Stwierdzono, że S1P powoduje wzrost fosforylacji kinazy Akt i białka Bad w warunkach inkubacji komórek SH-SY5Y z C2-ceramidem. Efekt taki wykazano również dla agonistów receptorów S1P.

W kolejnym etapie badań stwierdzono, że C2-ceramid powoduje spadek ekspresji/immunoreaktywności anty-apoptotycznego białka Bcl-2 oraz wzrost poziomu mRNA białek pro-apoptotycznych: Bax i Hrk. Uzyskane dane pokazują, że S1P oraz inhibitor PARP-1 działały protekcyjnie poprzez modulację ekspresji białek z rodziny Bcl-2.

Podsumowując, uzyskane wyniki badań mogą być pomocne w lepszym zrozumieniu mechanizmu śmierci komórek w warunkach zwiększonego stężenia ceramidów, które obserwowane jest w wielu stanach patologicznych. W poszukiwaniu nowych związków neuroprotektyjnych stwierdzono, że S1P oraz modulatory receptorów dla S1P odgrywają ważną rolę neuroprotektyjną w warunkach stresu oksydacyjnego wywołanego przez ceramid. Dodatkowo zastosowanie inhibitora PARP-1 w znaczący sposób zwiększa przeżycie komórek neuronalnych poddanych działaniu C2-ceramidu.

Summary

Ceramides are a class of sphingolipids that are abundant in cell membranes and play an important role in regulation of the fluidity and structure of the lipid bilayer. During the last decade, ceramides have been recognised as very important second messengers for multiple extracellular stimuli mediating many cellular processes, mainly those associated with the regulation of cell proliferation, differentiation, growth arrest and apoptosis. Ceramides are composed of a sphingoid base linked to a fatty acid of varying chain length (14–32 carbons) via an amide bond. Cell-permeable short chain ceramide, C2-ceramide and C6-ceramide have been used in many studies to mimic ceramide-mediated cell death pathways. It was shown that C2-ceramides were present naturally in the brain at low levels. Treatment of neuronal cells with ceramides at low concentration promotes cell differentiation, survival and neurite outgrowth, while at higher concentration it induces apoptosis.

Ceramides have been indicated as key player in neuronal cell death, however, their role is not yet well understood. We investigated the molecular mechanism of neuronal cell death evoked by ceramide in the human *neuroblastoma* cell line (SH-SY5Y). The response of pro-apoptotic and anti-apoptotic gene expression was analysed. Moreover, the neuroprotective effect of sphingosine-1-phosphate (S1P) was evaluated. We demonstrated that C2-ceramide, through inhibition of PI3K/Akt kinases, influenced the phosphorylation state of GSK3 β and pro-apoptotic Bad. We observed that C2-ceramide induced production of reactive oxygen species in a concentration-dependent manner. It is known that DNA damage caused by oxidative stress may activate poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1), a key nuclear enzyme involved in DNA repair. Our results showed PARP-1 activation and PAR formation after C2-ceramide treatment. Upon activation, PARP-1 transforms nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) into long PAR polymers and transfers them to a variety of nuclear proteins, e.g. histones, DNA polymerases and PARP-1 itself. The basal levels of PAR are very low, however, excessive activation of PARP-1 leads to a 10- to 500-fold increase in PAR polymer formation. The PAR participates directly in cell death signalling. PAR is responsible for mitochondrial apoptosis inducing factor (AIF) release and caspase-independent apoptosis. The proper AIF level in mitochondria is very important for the integration of proteins of electron transport complexes. AIF is proposed to regulate the respiratory chain indirectly, through assembly and/or stabilisation of complexes I and III. The reduction in assembled complex I associated with AIF deficiency is anticipated to have a profound effect on mitochondrial function in neurons. However, we ought to keep in mind that AIF after

translocation to nucleus exerted endonuclease activity and is responsible for the DNA degradation. Our data indicated that C2-ceramide caused the AIF release from mitochondria. Our study showed that PARP-1 inhibition significantly protected SH-SY5Y cells against ceramide-induced cell death by reducing the level of reactive oxygen species production, thus preventing the AIF release from the mitochondria and increasing the mRNA level of anti-apoptotic Bcl-2. Moreover, we observed enhancement of Bad phosphorylation and down-regulation of pro-apoptotic Hrk gene expression.

We demonstrated that in the mechanism of cell death induced by C2-ceramide the kinases: ERK1 / 2 and JNK and p53 protein were involved.

The results showed that exogenous sphingosine-1-phosphate has protective effects as a result of receptors S1PR1 and S1PR3 stimulation. It was found that S1P increases the activity of Akt kinase and Bad phosphorylation. This effect was also demonstrated for the S1P receptor agonists. In the next stage of the study, it was found that C2-ceramide causes a decrease in expression / immunoreactivity of anti-apoptotic Bcl-2 protein and an increase in pro-apoptotic proteins: Bax and Hrk mRNA levels. S1P acts by modulating the expression/immunoreactivity of Bcl-2 proteins family.

Summarizing, our data present that PARP-1 inhibitor and sphingosine-1-phosphate (S1P) through modulation of anti-apoptotic proteins protect mitochondria and neuronal cells against death evoked by ceramide. As a conclusive remark, we suggest that the modulators of sphingosine-1-phosphate receptor(s) and PARP-1 inhibitor(s) should be considered in the therapy of neurodegenerative disorders.

Literatura

- Adamczyk A, Kaźmierczak A, Strosznajder JB. Znaczenie stresu oksydacyjnego w toksyczności peptydów amyloidu beta i alfa synukleiny. *Mózg a stres*. Kraków 2008.
- Ader I, Brizuela L, Bouquerel P, Malavaud B, Cuvillier O. Sphingosine kinase 1: a new modulator of hypoxia inducible factor 1alpha during hypoxia in human cancer cells. *Cancer Res*. 2008;68:8635-42.
- Alano CC, Garnier P, Ying W, Higashi Y, Kauppinen TM, Swanson RA. NAD⁺ depletion is necessary and sufficient for poly(ADP-ribose) polymerase-1-mediated neuronal death. *J Neurosci*. 2010;30:2967-78.
- Altmeyer M, Messner S, Hassa PO, Fey M, Hottiger MO. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosylation) by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites. *Nucleic Acids Res*. 2009;37:3723-38.
- Andrabi SA, Kim NS, Yu SW, Wang H, Koh DW, Sasaki M, Klaus JA, Otsuka T, Zhang Z, Koehler RC, Hurn PD, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:18308-13.
- Arana L, Gangoiti P, Ouro A, Rivera IG, Ordoñez M, Trueba M, Lankalapalli RS, Bittman R, Gomez-Muñoz A. Generation of reactive oxygen species (ROS) is a key factor for stimulation of macrophage proliferation by ceramide 1-phosphate. *Exp Cell Res*. 2012;318:350-60.
- Arboleda G, Cárdenas Y, Rodríguez Y, Morales LC, Matheus L, Arboleda H. Differential regulation of AKT, MAPK and GSK3 β during C2-ceramide-induced neuronal death. *Neurotoxicology*. 2010;31:687-93.
- Ardail D, Popa I, Alcantara K, Pons A, Zanetta JP, Louisot P, Thomas L, Portoukalian J. Occurrence of ceramides and neutral glycolipids with unusual long-chain base composition in purified rat liver mitochondria. *FEBS Lett*. 2001;488:160-4.
- Ardestani S, Deskins DL, Young PP. Membrane TNF-alpha-activated programmed necrosis is mediated by Ceramide-induced reactive oxygen species. *J Mol Signal*. 2013;8:12.
- Arora AS, Jones BJ, Patel TC, Bronk SF, Gores GJ. Ceramide induces hepatocyte cell death through disruption of mitochondrial function in the rat. *Hepatology*. 1997;25:958-63.
- Asle-Rousta M, Kolahdooz Z, Oryan S, Ahmadiani A, Dargahi L. FTY720 (fingolimod) attenuates beta-amyloid peptide (A β 42)-induced impairment of spatial learning and memory in rats. *J Mol Neurosci*. 2013;50:524-32.
- Ayasolla K, Khan M, Singh AK, Singh I. Inflammatory mediator and beta-amyloid (25-35)-induced ceramide generation and iNOS expression are inhibited by vitamin E. *Free Radic Biol Med*. 2004;37:325-38.

- Banerjee P, Sahoo A, Anand S, Ganguly A, Righi G, Bovicelli P, Saso L, Chakrabarti S. Multiple Mechanisms of Iron-Induced Amyloid Beta-Peptide Accumulation in SHSY5Y Cells: Protective Action of Negletein. *Neuromolecular Med.* 2014;16:787-98.
- Barrera-Vilarmau S, Obregón P, de Alba E. Intrinsic order and disorder in the bcl-2 member harakiri: insights into its proapoptotic activity. *PLoS One.* 2011;6:e21413.
- Barth BM, Cabot MC, Kester M. Ceramide-based therapeutics for the treatment of cancer. *Anticancer Agents Med Chem.* 2011;11:911-9.
- Becker KP, Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Bielawski J, Hannun YA. Selective inhibition of juxtannuclear translocation of protein kinase C betaII by a negative feedback mechanism involving ceramide formed from the salvage pathway. *J Biol Chem.* 2005;280:2606-12.
- Bektas M, Jolly PS, Müller C, Eberle J, Spiegel S, Geilen CC. Sphingosine kinase activity counteracts ceramide-mediated cell death in human melanoma cells: role of Bcl-2 expression. *Oncogene.* 2005;24:178-87.
- Berg JM, Stryer L, Tymoczko JL. *Biochemia Wydanie 4, 2011, Wydawnictwo PWN.*
- Betito S, Cuvillier O. Regulation by sphingosine 1-phosphate of Bax and Bad activities during apoptosis in a MEK-dependent manner. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;340:1273-7.
- Beutner G, Rück A, Riede B, Brdiczka D. Complexes between porin, hexokinase, mitochondrial creatine kinase and adenylate translocator display properties of the permeability transition pore. Implication for regulation of permeability transition by the kinases. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1368:7-18.
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 1973;33:2643-52.
- Billich A, Ettmayer P. Fluorescence-based assay of sphingosine kinases. *Anal Biochem.* 2004;326:114-9.
- Bionda C, Portoukalian J, Schmitt D, Rodriguez-Lafrasse C, Ardail D. Subcellular compartmentalization of ceramide metabolism: MAM (mitochondria-associated membrane) and/or mitochondria? *Biochem J.* 2004;382:527-33.
- Bir A, Sen O, Anand S, Khemka VK, Banerjee P, Cappai R, Sahoo A, Chakrabarti S. α -synuclein-induced mitochondrial dysfunction in isolated preparation and intact cells: Implications in the pathogenesis of Parkinson's disease. *J Neurochem.* 2014;131:868-77.
- Birbes H, El Bawab S, Hannun YA, Obeid LM. Selective hydrolysis of a mitochondrial pool of sphingomyelin induces apoptosis. *FASEB J.* 2001;15:2669-79.
- Blaho VA, Hla T. An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors. *J Lipid Res.* 2014;55:1596-1608.

- Bourbon NA, Sandirasegarane L, Kester M. Ceramide-induced inhibition of Akt is mediated through protein kinase C ζ : implications for growth arrest. *J Biol Chem.* 2002;277:3286-92.
- Bourbon NA, Yun J, Kester M. Ceramide directly activates protein kinase C zeta to regulate a stress-activated protein kinase signaling complex. *J Biol Chem.* 2000;275:35617-23.
- Brann AB, Scott R, Neuberger Y, Abulafia D, Boldin S, Fainzilber M, Futerma AH. Ceramide signaling downstream of the p75 neurotrophin receptor mediates the effects of nerve growth factor on outgrowth of cultured hippocampal neurons. *J Neurosci.* 1999;19:8199-206.
- Brann AB, Tcherpakov M, Williams IM, Futerma AH, Fainzilber M. Nerve growth factor-induced p75-mediated death of cultured hippocampal neurons is age-dependent and transduced through ceramide generated by neutral sphingomyelinase. *J Biol Chem.* 2002;277:9812-8.
- Bratton SB, Salvesen GS. Regulation of the Apaf-1-caspase-9 apoptosome. *J Cell Sci.* 2010;123:3209-14.
- Brenner B, Ferlinz K, Grassmé H, Weller M, Koppenhoefer U, Dichgans J, Sandhoff K, Lang F, Gulbins E. Fas/CD95/Apo-I activates the acidic sphingomyelinase via caspases. *Cell Death Differ.* 1998;5:29-37.
- Brunelle JK, Letai A. Control of mitochondrial apoptosis by the Bcl-2 family. *J Cell Sci.* 2009;122:437-41.
- Bürkle A, Virág L. Poly(ADP-ribose): PARadigms and PARadoxes. *Mol Aspects Med.* 2013;34:1046-65.
- Cabon L, Galán-Malo P, Bouharrou A, Delavallée L, Brunelle-Navas MN, Lorenzo HK, Gross A, Susin SA. BID regulates AIF-mediated caspase-independent necroptosis by promoting BAX activation. *Cell Death Differ.* 2012;19:245-56.
- Car H, Zendzian-Piotrowska M, Prokopiuk S, Fiedorowicz A, Sadowska A, Kurek K, Sawicka D. Ceramide profiles in the brain of rats with diabetes induced by streptozotocin. *FEBS J.* 2012;279:1943-52.
- Çakała M, Strosznajder JB. Cyklooksigenazy i lipooksigenazy w stresie oksydacyjnym w chorobie Alzheimera i w towarzyszącym mu stanie zapalnym. *Mózg a stres.* Kraków 2008.
- Ceccom J, Loukh N, Lauwers-Cances V, Touriol C, Nicaise Y, Gentil C, Uro-Coste E, Pitson S, Maurage CA, Duyckaerts C, Cuvillier O, Delisle MB. Reduced sphingosine kinase-1 and enhanced sphingosine 1-phosphate lyase expression demonstrate deregulated sphingosine 1-phosphate signaling in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:12.

- Chalfant CE, Spiegel S. Sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate: expanding roles in cell signaling. *J Cell Sci.* 2005;118:4605-12.
- Chandra D, Choy G, Daniel PT, Tang DG. Bax-dependent regulation of Bak by voltage-dependent anion channel 2. *J Biol Chem.* 2005;280:19051-61.
- Chatelut M, Leruth M, Harzer K, Dagan A, Marchesini S, Gatt S, Salvayre R, Courtoy P, Levade T. Natural ceramide is unable to escape the lysosome, in contrast to a fluorescent analogue. *FEBS Lett.* 1998;426:102-6.
- Chen S, Lee JM, Zeng C, Chen H, Hsu CY, Xu J. Amyloid beta peptide increases DP5 expression via activation of neutral sphingomyelinase and JNK in oligodendrocytes. *J Neurochem.* 2006;97:631-40.
- Chi SW. Structural insights into the transcription-independent apoptotic pathway of p53. *BMB Rep.* 2014;47:167-72.
- Chipuk JE, Bouchier-Hayes L, Kuwana T, Newmeyer DD, Green DR. PUMA couples the nuclear and cytoplasmic proapoptotic function of p53. *Science.* 2005;309:1732-5.
- Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, Droin NM, Newmeyer DD, Schuler M, Green DR. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science.* 2004;303:1010-4.
- Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res.* 1989;49:219-25.
- Cifone MG, De Maria R, Roncaioli P, Rippo MR, Azuma M, Lanier LL, Santoni A, Testi R. Apoptotic signaling through CD95 (Fas/Apo-1) activates an acidic sphingomyelinase. *J Exp Med.* 1994;180:1547-52.
- Cilenti L, Lee Y, Hess S, Srinivasula S, Park KM, Junqueira D, Davis H, Bonventre JV, Alnemri ES, Zervos AS. Characterization of a novel and specific inhibitor for the pro-apoptotic protease Omi/HtrA2. *J Biol Chem.* 2003;278:11489-94.
- Clarke CJ, Cloessner EA, Roddy PL, Hannun YA. Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2) is the primary neutral sphingomyelinase isoform activated by tumour necrosis factor- α in MCF-7 cells. *Biochem J.* 2011;435:381-90.
- Cohen P, Frame S. The renaissance of GSK3. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:769-76.
Cohen-Armon M. PARP-1 activation in the ERK signaling pathway. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:556-60.
- Colombini M. Ceramide channels and their role in mitochondria-mediated apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1797:1239-44.
- Couttas TA, Kain N, Daniels B, Lim XY, Shepherd C, Kril J, Pickford R, Li H, Garner B, Don AS. Loss of the neuroprotective factor Sphingosine 1-phosphate early in Alzheimer's disease pathogenesis. *Acta Neuropathol Commun.* 2014;2:9.

- Cregan SP, Dawson VL, Slack RS. Role of AIF in caspase-dependent and caspase-independent cell death. *Oncogene*. 2004;23:2785-96.
- Cutler RG, Kelly J, Storie K, Pedersen WA, Tammara A, Hatanpaa K, Troncoso JC, Mattson MP. Involvement of oxidative stress-induced abnormalities in ceramide and cholesterol metabolism in brain aging and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:2070-5.
- Cuvillier O, Levade T. Sphingosine 1-phosphate antagonizes apoptosis of human leukemia cells by inhibiting release of cytochrome c and Smac/DIABLO from mitochondria. *Blood*. 2001;98:2828-36.
- Cuvillier O, Pirianov G, Kleuser B, Vanek PG, Coso OA, Gutkind S, Spiegel S. Suppression of ceramide-mediated programmed cell death by sphingosine-1-phosphate. *Nature*. 1996;381:800-3.
- Czabotar PE, Lee EF, Thompson GV, Wardak AZ, Fairlie WD, Colman PM. Mutation to Bax beyond the BH3 domain disrupts interactions with pro-survival proteins and promotes apoptosis. *J Biol Chem*. 2011;286:7123-31.
- Czabotar PE, Westphal D, Dewson G, Ma S, Hockings C, Fairlie WD, Lee EF, Yao S, Robin AY, Smith BJ, Huang DC, Kluck RM, Adams JM, Colman PM. Bax crystal structures reveal how BH3 domains activate Bax and nucleate its oligomerization to induce apoptosis. *Cell*. 2013;152:519-31.
- Czapski GA, Strosznajder JB. Białka a stres oksydacyjny. Mózg a stres. Kraków 2008.
- D'Amours D, Desnoyers S, D'Silva I, Poirier GG. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions. *Biochem J*. 1999;342:249-68.
- D'Amours D, Sallmann FR, Dixit VM, Poirier GG. Gain-of-function of poly(ADP-ribose) polymerase-1 upon cleavage by apoptotic proteases: implications for apoptosis. *J Cell Sci*. 2001;114:3771-8.
- Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell*. 2004;116:205-19.
- Darios F, Lambeng N, Troadec JD, Michel PP, Ruberg M. Ceramide increases mitochondrial free calcium levels via caspase 8 and Bid: role in initiation of cell death. *J Neurochem*. 2003;84:643-54.
- Datta SR, Dudek H, Tao X, Masters S, Fu H, Gotoh Y, Greenberg ME. Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery. *Cell*. 1997;91:231-41.
- Daugas E, Nochy D, Ravagnan L, Loeffler M, Susin SA, Zamzami N, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor (AIF): a ubiquitous mitochondrial oxidoreductase involved in apoptosis. *FEBS Lett*. 2000;476:118-23.
- Davies L, Fassbender K, Walter S. Sphingolipids in neuroinflammation. *Handb Exp Pharmacol*. 2013;(216):421-30.

Dawson VL, Dawson TM. Deadly conversations: nuclear-mitochondrial cross-talk. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36:287-94.

de Murcia G, Ménissier de Murcia J. Poly(ADP-ribose) polymerase: a molecular nick-sensor. *Trends Biochem Sci.* 1994;19:172-6.

Deng X, Gao F, May WS. Protein phosphatase 2A inactivates Bcl2's antiapoptotic function by dephosphorylation and up-regulation of Bcl2-p53 binding. *Blood.* 2009;113:422-8.

Desmarais Y, Ménard L, Lagueux J, Poirier GG. Enzymological properties of poly(ADP-ribose)polymerase: characterization of automodification sites and NADase activity. *Biochim Biophys Acta.* 1991;1078:179-86.

Dewson G, Kratina T, Sim HW, Puthalakath H, Adams JM, Colman PM, Kluck RM. To trigger apoptosis, Bak exposes its BH3 domain and homodimerizes via BH3:groove interactions. *Mol Cell.* 2008;30:369-80.

Dewson G, Ma S, Frederick P, Hockings C, Tan I, Kratina T, Kluck RM. Bax dimerizes via a symmetric BH3:groove interface during apoptosis. *Cell Death Differ.* 2012;19:661-70.

Di Paola M, Cocco T, Lorusso M. Ceramide interaction with the respiratory chain of heart mitochondria. *Biochemistry.* 2000;39:6660-8.

Di Paola M, Zaccagnino P, Montedoro G, Cocco T, Lorusso M. Ceramide induces release of pro-apoptotic proteins from mitochondria by either a Ca²⁺-dependent or a Ca²⁺-independent mechanism. *J Bioenerg Biomembr.* 2004;36:165-70.

Dikalov S. Cross talk between mitochondria and NADPH oxidases. *Free Radic Biol Med.* 2011;51:1289-301.

Ding G, Sonoda H, Yu H, Kajimoto T, Goparaju SK, Jahangeer S, Okada T, Nakamura S. Protein kinase D-mediated phosphorylation and nuclear export of sphingosine kinase 2. *J Biol Chem.* 2007;282:27493-502.

Dobrowsky RT, Kamibayashi C, Mumby MC, Hannun YA. Ceramide activates heterotrimeric protein phosphatase 2A. *J Biol Chem.* 1993;268:15523-30.

Doi Y, Takeuchi H, Horiuchi H, Hanyu T, Kawanokuchi J, Jin S, Parajuli B, Sonobe Y, Mizuno T, Suzumura A. Fingolimod phosphate attenuates oligomeric amyloid β -induced neurotoxicity via increased brain-derived neurotrophic factor expression in neurons. *PLoS One.* 2013;8:e61988.

Dröge W. Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev.* 2002;82:47-95.

Du C, Fang M, Li Y, Li L, Wang X. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell.* 2000;102:33-42.

- El Bawab S, Bielawska A, Hannun YA. Purification and characterization of a membrane-bound nonlysosomal ceramidase from rat brain. *J Biol Chem.* 1999;274:27948-55.
- El Bawab S, Roddy P, Qian T, Bielawska A, Lemasters JJ, Hannun YA. Molecular cloning and characterization of a human mitochondrial ceramidase. *J Biol Chem.* 2000;275:21508-13.
- Ethier C, Labelle Y, Poirier GG. PARP-1-induced cell death through inhibition of the MEK/ERK pathway in MNNG-treated HeLa cells. *Apoptosis.* 2007;12:2037-49.
- Fatokun AA, Dawson VL, Dawson TM. Parthanatos: mitochondrial-linked mechanisms and therapeutic opportunities. *Br J Pharmacol.* 2014;171:2000-16.
- Ferlinz K, Kopal G, Bernardo K, Linke T, Bar J, Breiden B, Neumann U, Lang F, Schuchman EH, Sandhoff K. Human acid ceramidase: processing, glycosylation, and lysosomal targeting. *J Biol Chem.* 2001;276:35352-60.
- Filippov V, Song MA, Zhang K, Vinters HV, Tung S, Kirsch WM, Yang J, Duerksen-Hughes PJ. Increased ceramide in brains with Alzheimer's and other neurodegenerative diseases. *J Alzheimers Dis.* 2012;29:537-47.
- Fox TE, Houck KL, O'Neill SM, Nagarajan M, Stover TC, Pomianowski PT, Unal O, Yun JK, Naides SJ, Kester M. Ceramide recruits and activates protein kinase C zeta (PKC zeta) within structured membrane microdomains. *J Biol Chem.* 2007;282:12450-7.
- France-Lanord V, Brugg B, Michel PP, Agid Y, Ruberg M. Mitochondrial free radical signal in ceramide-dependent apoptosis: a putative mechanism for neuronal death in Parkinson's disease. *J Neurochem.* 1997;69:1612-21.
- Fyrst H, Saba JD. An update on sphingosine-1-phosphate and other sphingolipid mediators. *Nat Chem Biol.* 2010;6:489-97.
- Gaki GS, Papavassiliou AG. Oxidative stress-induced signaling pathways implicated in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Neuromolecular Med.* 2014;16:217-30.
- Ganesan V, Perera MN, Colombini D, Datskovskiy D, Chadha K, Colombini M. Ceramide and activated Bax act synergistically to permeabilize the mitochondrial outer membrane. *Apoptosis.* 2010;15:553-62.
- Gangoiti P, Granado MH, Wang SW, Kong JY, Steinbrecher UP, Gómez-Muñoz A. Ceramide 1-phosphate stimulates macrophage proliferation through activation of the PI3-kinase/PKB, JNK and ERK1/2 pathways. *Cell Signal.* 2008;20:726-36.
- García-Ruiz C, Colell A, Marí M, Morales A, Fernández-Checa JC. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J Biol Chem.* 1997;272:11369-77.
- Gassowska M, Cieslik M, Wilkaniec A, Strosznajder JB. Sphingosine kinases/sphingosine-1-phosphate and death Signalling in APP-transfected cells. *Neurochem Res.* 2014;39:645-52.

Geekiyana H, Upadhye A, Chan C. Inhibition of serine palmitoyltransferase reduces A β and tau hyperphosphorylation in a murine model: a safe therapeutic strategy for Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2013;34:2037-51.

Ghafourifar P, Klein SD, Schucht O, Schenk U, Pruschy M, Rocha S, Richter C. Ceramide induces cytochrome c release from isolated mitochondria. Importance of mitochondrial redox state. *J Biol Chem*. 1999;274:6080-4.

Ghosh AP, Cape JD, Klocke BJ, Roth KA. Deficiency of pro-apoptotic Hrk attenuates programmed cell death in the developing murine nervous system but does not affect Bcl-x deficiency-induced neuron apoptosis. *J Histochem Cytochem*. 2011;59:976-83.

Gillies LA, Kuwana T. Apoptosis regulation at the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biochem*. 2014;115:632-40.

Giussani P, Bassi R, Anelli V, Brioschi L, De Zen F, Riccitelli E, Caroli M, Campanella R, Gaini SM, Viani P, Riboni L. Glucosylceramide synthase protects glioblastoma cells against autophagic and apoptotic death induced by temozolomide and Paclitaxel. *Cancer Invest*. 2012;30:27-37.

Głóg BK, Strosznajder JB. Wolne rodniki w starzeniu się mózgu i innych procesach biologicznych. *Mózga a starzenie*. Warszawa 2001.

Gomez-Brouchet A, Pchejetski D, Brizuela L, Garcia V, Altié MF, Maddelein ML, Delisle MB, Cuvillier O. Critical role for sphingosine kinase-1 in regulating survival of neuroblastoma cells exposed to amyloid-beta peptide. *Mol Pharmacol*. 2007;72:341-9.

Gong T, Wang Q, Lin Z, Chen ML, Sun GZ. Endoplasmic reticulum (ER) stress inhibitor salubrinal protects against ceramide-induced SH-SY5Y cell death. *Biochem Biophys Res Commun*. 2012;427:461-5.

Gouaze-Andersson V, Cabot MC. Glycosphingolipids and drug resistance. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:2096-103.

Gómez-Muñoz A, Kong JY, Parhar K, Wang SW, Gangoiti P, González M, Eivemark S, Salh B, Duronio V, Steinbrecher UP. Ceramide-1-phosphate promotes cell survival through activation of the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *FEBS Lett*. 2005;579:3744-50.

Grassmé H, Gulbins E, Brenner B, Ferlinz K, Sandhoff K, Harzer K, Lang F, Meyer TF. Acidic sphingomyelinase mediates entry of *N. gonorrhoeae* into nonphagocytic cells. *Cell*. 1997;91:605-15.

Grösch S, Schiffmann S, Geisslinger G. Chain length-specific properties of ceramides. *Prog Lipid Res*. 2012;51:50-62.

Guan H, Song L, Cai J, Huang Y, Wu J, Yuan J, Li J, Li M. Sphingosine kinase 1 regulates the Akt/FOXO3a/Bim pathway and contributes to apoptosis resistance in glioma cells. *PLoS One*. 2011;6(5):e19946.

- Gudz TI, Tserng KY, Hoppel CL. Direct inhibition of mitochondrial respiratory chain complex III by cell-permeable ceramide. *J Biol Chem.* 1997;272:24154-8.
- Gulbins E, Bissonnette R, Mahboubi A, Martin S, Nishioka W, Brunner T, Baier G, Baier-Bitterlich G, Byrd C, Lang F i wsp.,. FAS-induced apoptosis is mediated via a ceramide-initiated RAS signaling pathway. *Immunity.* 1995;2:341-51.
- Hage-Sleiman R, Esmerian MO, Kobeissy H, Dbaibo G. p53 and Ceramide as Collaborators in the Stress Response. *Int J Mol Sci.* 2013;14:4982-5012.
- Hait NC, Bellamy A, Milstien S, Kordula T, Spiegel S. Sphingosine kinase type 2 activation by ERK-mediated phosphorylation. *J Biol Chem.* 2007;282:12058-65.
- Hait NC, Oskeritzian CA, Paugh SW, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine kinases, sphingosine 1-phosphate, apoptosis and diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1758:2016-26.
- Hait NC, Sarkar S, Le Stunff H, Mikami A, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Role of sphingosine kinase 2 in cell migration toward epidermal growth factor. *J Biol Chem.* 2005;280:29462-9.
- Halmosi R, Berente Z, Osz E, Toth K, Literati-Nagy P, Sumegi B. Effect of poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors on the ischemia-reperfusion-induced oxidative cell damage and mitochondrial metabolism in Langendorff heart perfusion system. *Mol Pharmacol.* 2001;59:1497-505.
- Hanada K, Kumagai K, Tomishige N, Kawano M. CERT and intracellular trafficking of ceramide. *Biochim Biophys Acta.* 2007;1771:644-53.
- Hannun YA, Obeid LM. Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2008;9:139-50.
- Happo L, Strasser A, Cory S. BH3-only proteins in apoptosis at a glance. *J Cell Sci.* 2012;125:1081-7.
- Harris CA, Johnson EM Jr. BH3-only Bcl-2 family members are coordinately regulated by the JNK pathway and require Bax to induce apoptosis in neurons. *J Biol Chem.* 2001;276:37754-60.
- Haughey NJ, Bandaru VV, Bae M, Mattson MP. Roles for dysfunctional sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease neuropathogenesis. *Biochim Biophys Acta.* 2010;1801:878-86.
- Haupt S, Berger M, Goldberg Z, Haupt Y. Apoptosis - the p53 network. *J Cell Sci.* 2003;116:4077-85.
- He X, Huang Y, Li B, Gong CX, Schuchman EH. Deregulation of sphingolipid metabolism in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging.* 2010;31:398-408.
- Heeres JT, Hergenrother PJ. Poly(ADP-ribose) makes a date with death. *Curr Opin Chem Biol.* 2007;11:644-53.

- Heffernan-Stroud LA, Obeid LM. p53 and regulation of bioactive sphingolipids. *Adv Enzyme Regul.* 2011;51:219-28.
- Hisano Y, Kobayashi N, Yamaguchi A, Nishi T. Mouse SPNS2 functions as a sphingosine-1-phosphate transporter in vascular endothelial cells. *PLoS One.* 2012;7(6):e38941.
- Hla T, Brinkmann V. Sphingosine 1-phosphate (S1P): Physiology and the effects of S1P receptor modulation. *Neurology.* 2011;76(8 Suppl 3):S3-8.
- Hoffman WH, Biade S, Zilfou JT, Chen J, Murphy M. Transcriptional repression of the anti-apoptotic survivin gene by wild type p53. *J Biol Chem.* 2002;277:3247-57.
- Hokin LE, Hokin MR. The incorporation of ^{32}P into the nucleotides of ribonucleic acid in pigeon pancreas slices. *Biochim Biophys Acta.* 1953 a;11:591-2.
- Hokin MR, Hokin LE. Enzyme secretion and the incorporation of ^{32}P into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem.* 1953 b;203:967-77.
- Horres CR, Hannun YA. The roles of neutral sphingomyelinases in neurological pathologies. *Neurochem Res.* 2012;37:1137-49.
- Inohara N, Ding L, Chen S, Núñez G. harakiri, a novel regulator of cell death, encodes a protein that activates apoptosis and interacts selectively with survival-promoting proteins Bcl-2 and Bcl-X(L). *EMBO J.* 1997;16:1686-94.
- Ito A, Uehara T, Tokumitsu A, Okuma Y, Nomura Y. Possible involvement of cytochrome c release and sequential activation of caspases in ceramide-induced apoptosis in SK-N-MC cells. *Biochim Biophys Acta.* 1999;1452:263-74.
- Jaffrézou JP, Levade T, Bettaïeb A, Andrieu N, Bezombes C, Maestre N, Vermeersch S, Rousse A, Laurent G. Daunorubicin-induced apoptosis: triggering of ceramide generation through sphingomyelin hydrolysis. *EMBO J.* 1996;15:2417-24.
- Jana A, Hogan EL, Pahan K. Ceramide and neurodegeneration: susceptibility of neurons and oligodendrocytes to cell damage and death. *J Neurol Sci.* 2009;278:5-15.
- Jana A, Pahan K. Sphingolipids in multiple sclerosis. *Neuromolecular Med.* 2010;12:351-61.
- Jarman KE, Moretti PA, Zebol JR, Pitson SM. Translocation of sphingosine kinase 1 to the plasma membrane is mediated by calcium- and integrin-binding protein 1. *J Biol Chem.* 2010;285:483-92.
- Jenkins RW, Canals D, Hannun YA. Roles and regulation of secretory and lysosomal acid sphingomyelinase. *Cell Signal.* 2009;21:836-46.
- Jiang W, Ogretmen B. Autophagy paradox and ceramide. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841:783-92.

- Jin ZQ, Goetzl EJ, Karliner JS. Sphingosine kinase activation mediates ischemic preconditioning in murine heart. *Circulation*. 2004;110:1980-9.
- Johnson KR, Johnson KY, Crellin HG, Ogretmen B, Boylan AM, Harley RA, Obeid LM. Immunohistochemical distribution of sphingosine kinase 1 in normal and tumor lung tissue. *J Histochem Cytochem*. 2005;53:1159-66.
- Joshi A, Bondada V, Geddes JW. Mitochondrial micro-calpain is not involved in the processing of apoptosis-inducing factor. *Exp Neurol*. 2009;218:221-7.
- Kajimoto T, Okada T, Yu H, Goparaju SK, Jahangeer S, Nakamura S. Involvement of sphingosine-1-phosphate in glutamate secretion in hippocampal neurons. *Mol Cell Biol*. 2007;27:3429-40.
- Kameshita I, Matsuda Z, Taniguchi T, Shizuta Y. Poly (ADP-Ribose) synthetase. Separation and identification of three proteolytic fragments as the substrate-binding domain, the DNA-binding domain, and the automodification domain. *J Biol Chem*. 1984;259:4770-6.
- Katsel P, Li C, Haroutunian V. Gene expression alterations in the sphingolipid metabolism pathways during progression of dementia and Alzheimer's disease: a shift toward ceramide accumulation at the earliest recognizable stages of Alzheimer's disease? *Neurochem Res*. 2007;32:845-56.
- Kauppinen TM, Chan WY, Suh SW, Wiggins AK, Huang EJ, Swanson RA. Direct phosphorylation and regulation of poly(ADP-ribose) polymerase-1 by extracellular signal-regulated kinases 1/2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:7136-41.
- Kauppinen TM. Multiple roles for poly(ADP-ribose)polymerase-1 in neurological disease. *Neurochem Int*. 2007;50:954-8.
- Kim HJ, Mun JY, Chun YJ, Choi KH, Kim MY. Bax-dependent apoptosis induced by ceramide in HL-60 cells. *FEBS Lett*. 2001;505:264-8.
- Kim HJ, Oh JE, Kim SW, Chun YJ, Kim MY. Ceramide induces p38 MAPK-dependent apoptosis and Bax translocation via inhibition of Akt in HL-60 cells. *Cancer Lett*. 2008;260:88-95.
- Kim NH, Kim K, Park WS, Son HS, Bae Y. PKB/Akt inhibits ceramide-induced apoptosis in neuroblastoma cells by blocking apoptosis-inducing factor (AIF) translocation. *J Cell Biochem*. 2007;102:1160-70.
- Kim SS, Chae HS, Bach JH, Lee MW, Kim KY, Lee WB, Jung YM, Bonventre JV, Suh YH. P53 mediates ceramide-induced apoptosis in SKN-SH cells. *Oncogene*. 2002;21:2020-8.
- Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Bielawski J, Taha TA, Jenkins RW, Senkal CE, Ogretmen B, Obeid LM, Hannun YA. Protein kinase C-induced activation of a ceramide/protein phosphatase 1 pathway leading to dephosphorylation of p38 MAPK. *J Biol Chem*. 2006;281:36793-802.

- Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. *Cell Signal*. 2008;20:1010-8.
- Klein JA, Longo-Guess CM, Rossmann MP, Seburn KL, Hurd RE, Frankel WN, Bronson RT, Ackerman SL. The harlequin mouse mutation downregulates apoptosis-inducing factor. *Nature*. 2002;419:367-74.
- Klimaszewska A, Stenzel A, Nowak JM, Grzanka A. Rho proteins - the key regulators of cytoskeleton in the progression of mitosis and cytokinesis. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2011;65:704-13.
- Kogot-Levin A, Saada A. Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie*. 2014;100:88-94.
- Kolettas E, Skoufos I, Kontargiris E, Markopoulou S, Tzavaras T, Gonos ES. Bcl-2 but not clusterin/apolipoprotein protected human diploid fibroblasts and immortalized keratinocytes from ceramide-induced apoptosis: role of p53 in the ceramide response. *Arch Biochem Biophys*. 2006;445:184-95.
- Kong JY, Klassen SS, Rabkin SW. Ceramide activates a mitochondrial p38 mitogen-activated protein kinase: a potential mechanism for loss of mitochondrial transmembrane potential and apoptosis. *Mol Cell Biochem*. 2005;278:39-51.
- Koul HK, Pal M, Koul S. Role of p38 MAP Kinase Signal Transduction in Solid Tumors. *Genes Cancer*. 2013;4:342-359.
- Kraus WL. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation. *Curr Opin Cell Biol*. 2008;20:294-302.
- Krishnakumar R, Kraus WL. The PARP side of the nucleus: molecular actions, physiological outcomes, and clinical targets. *Mol Cell*. 2010;39:8-24.
- Kumagai K, Yasuda S, Okemoto K, Nishijima M, Kobayashi S, Hanada K. CERT mediates intermembrane transfer of various molecular species of ceramides. *J Biol Chem*. 2005;280:6488-95.
- Kumagai K1, Kawano M, Shinkai-Ouchi F, Nishijima M, Hanada K. Interorganelle trafficking of ceramide is regulated by phosphorylation-dependent cooperativity between the PH and START domains of CERT. *J Biol Chem*. 2007;282:17758-66.
- Kunkel GT, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. Targeting the sphingosine-1-phosphate axis in cancer, inflammation and beyond. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:688-702.
- Kuwana T1, Newmeyer DD. Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr Opin Cell Biol*. 2003;15:691-9.
- Larsen PJ, Tennagels N. On ceramides, other sphingolipids and impaired glucose homeostasis. *Mol Metab*. 2014;3:252-260.

- Law BN, Ling AP, Koh RY, Chye SM, Wong YP. Neuroprotective effects of orientin on hydrogen peroxide-induced apoptosis in SH-SY5Y cells. *Mol Med Rep.* 2014;9:947-54.
- Lee JT, Xu J, Lee JM, Ku G, Han X, Yang DI, Chen S, Hsu CY. Amyloid-beta peptide induces oligodendrocyte death by activating the neutral sphingomyelinase-ceramide pathway. *J Cell Biol.* 2004;164:123-31.
- Levresse V, Butterfield L, Zentrich E, Heasley LE. Akt negatively regulates the cJun N-terminal kinase pathway in PC12 cells. *J Neurosci Res.* 2000;62:799-808.
- Limaye V, Li X, Hahn C, Xia P, Berndt MC, Vadas MA, Gamble JR. Sphingosine kinase-1 enhances endothelial cell survival through a PECAM-1-dependent activation of PI-3K/Akt and regulation of Bcl-2 family members. *Blood.* 2005;105:3169-77.
- Lin CF, Chen CL, Chiang CW, Jan MS, Huang WC, Lin YS. GSK-3beta acts downstream of PP2A and the PI 3-kinase-Akt pathway, and upstream of caspase-2 in ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J Cell Sci.* 2007;120:2935-43.
- Linseman DA, Butts BD, Precht TA, Phelps RA, Le SS, Laessig TA, Bouchard RJ, Florez-McClure ML, Heidenreich KA. Glycogen synthase kinase-3beta phosphorylates Bax and promotes its mitochondrial localization during neuronal apoptosis. *J Neurosci.* 2004;24:9993-10002.
- Liu YY, Han TY, Giuliano AE, Cabot MC. Ceramide glycosylation potentiates cellular multidrug resistance. *FASEB J.* 2001;15:719-30.
- Lovell JF, Billen LP, Bindner S, Shamas-Din A, Fradin C, Leber B, Andrews DW. Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell.* 2008;135:1074-84.
- Lowry Oh, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951;193:265-75.
- Luo X, Kraus WL. On PAR with PARP: cellular stress signaling through poly(ADP-ribose) and PARP-1. *Genes Dev.* 2012;26:417-32.
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. Sphingosine-1-phosphate signaling and its role in disease. *Trends Cell Biol.* 2012;22:50-60.
- Malaplate-Armand C, Florent-Bécharde S, Youssef I, Koziel V, Sponne I, Kriem B, Leininger-Muller B, Olivier JL, Oster T, Pillot T. Soluble oligomers of amyloid-beta peptide induce neuronal apoptosis by activating a cPLA2-dependent sphingomyelinase-ceramide pathway. *Neurobiol Dis.* 2006;23:178-89.
- Malladi S, Challa-Malladi M, Fearnhead HO, Bratton SB. The Apaf-1*procaspase-9 apoptosome complex functions as a proteolytic-based molecular timer. *EMBO J.* 2009;28:1916-25.

- Manna SK, Zhang HJ, Yan T, Oberley LW, Aggarwal BB. Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem.* 1998;273:13245-54.
- Mao C, Obeid LM. Ceramidases: regulators of cellular responses mediated by ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate. *Biochim Biophys Acta.* 2008;1781:424-34.
- Mao C, Xu R, Szulc ZM, Bielawska A, Galadari SH, Obeid LM. Cloning and characterization of a novel human alkaline ceramidase. A mammalian enzyme that hydrolyzes phytoceramide. *J Biol Chem.* 2001;276:26577-88.
- Marchesini N, Hannun YA. Acid and neutral sphingomyelinases: roles and mechanisms of regulation. *Biochem Cell Biol.* 2004;82:27-44.
- Martins LM, Iaccarino I, Tenev T, Gschmeissner S, Totty NF, Lemoine NR, Savopoulos J, Gray CW, Creasy CL, Dingwall C, Downward J. The serine protease Omi/HtrA2 regulates apoptosis by binding XIAP through a reaper-like motif. *J Biol Chem.* 2002;277:439-44.
- Mastrandrea LD, Sessanna SM, Laychock SG. Sphingosine kinase activity and sphingosine-1 phosphate production in rat pancreatic islets and INS-1 cells: response to cytokines. *Diabetes.* 2005;54:1429-36.
- Mathias S, Younes A, Kan CC, Orlow I, Joseph C, Kolesnick RN. Activation of the sphingomyelin signaling pathway in intact EL4 cells and in a cell-free system by IL-1 beta. *Science.* 1993;259:519-22.
- Mattson MP, Goodman Y, Luo H, Fu W, Furukawa K. Activation of NF-kappaB protects hippocampal neurons against oxidative stress-induced apoptosis: evidence for induction of manganese superoxide dismutase and suppression of peroxynitrite production and protein tyrosine nitration. *J Neurosci Res.* 1997;49:681-97.
- Mazière C, Conte MA, Mazière JC. Activation of the JAK/STAT pathway by ceramide in cultured human fibroblasts. *FEBS Lett.* 2001;507:163-8.
- Means CK, Xiao CY, Li Z, Zhang T, Omens JH, Ishii I, Chun J, Brown JH. Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007;292:H2944-51.
- Mehling M, Kappos L, Derfuss T. Fingolimod for multiple sclerosis: mechanism of action, clinical outcomes, and future directions. *Curr Neurol Neurosci Rep.* 2011;11:492-7.
- Mencarelli C, Martinez-Martinez P. Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70:181-203.

- Mendoza-Alvarez H, Alvarez-Gonzalez R. Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosyl)ation. *J Biol Chem.* 2001;276:36425-30.
- Michell RH. Inositol phospholipids and cell surface receptor function. *Biochim Biophys Acta.* 1975;415:81-47.
- Mihara M, Erster S, Zaika A, Petrenko O, Chittenden T, Pancoska P, Moll UM. p53 has a direct apoptogenic role at the mitochondria. *Mol Cell.* 2003;11:577-90.
- Miron VE, Darlington PJ, Ludwin SK i wsp., The immunomodulator fingolimod (FTY720) increases myelin production following demyelination of organotypic cerebellar slices. Abstract S47.003. Presented at: 6 1st Annual Meeting of the American Academy of Neurology, Seattle, WA, April 25–May 2 2009 (S47.003). *Neurology* 2009;72 (11 suppl 3); A421.
- Miron VE, Schubart A, Antel JP. Central nervous system-directed effects of FTY720 (fingolimod). *J Neurol Sci.* 2008;274:13-7.
- Miyashita T, Krajewski S, Krajewska M, Wang HG, Lin HK, Liebermann DA, Hoffman B, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a regulator of bcl-2 and bax gene expression in vitro and in vivo. *Oncogene.* 1994;9:1799-805.
- Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell.* 1995;80:293-9.
- Modjtahedi N, Giordanetto F, Madeo F, Kroemer G. Apoptosis-inducing factor: vital and lethal. *Trends Cell Biol.* 2006;16:264-72.
- Momoi T, Ben-Yoseph Y, Nadler HL. Substrate-specificities of acid and alkaline ceramidases in fibroblasts from patients with Farber disease and controls. *Biochem J.* 1982;205:419-25.
- Morales A1, Lee H, Goñi FM, Kolesnick R, Fernandez-Checa JC. Sphingolipids and cell death. *Apoptosis.* 2007;12:923-39.
- Morales J, Li L, Fattah FJ, Dong Y, Bey EA, Patel M, Gao J, Boothman DA. Review of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) mechanisms of action and rationale for targeting in cancer and other diseases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2014;24:15-28.
- Moubarak RS, Yuste VJ, Artus C, Bouharrou A, Greer PA, Menissier-de Murcia J, Susin SA. Sequential activation of poly(ADP-ribose) polymerase 1, calpains, and Bax is essential in apoptosis-inducing factor-mediated programmed necrosis. *Mol Cell Biol.* 2007;27:4844-62.
- Movsesyan VA, Yakovlev AG, Dabaghyan EA, Stoica BA, Faden AI. Ceramide induces neuronal apoptosis through the caspase-9/caspase-3 pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;299:201-7.
- Mullen TD, Hannun YA, Obeid LM. Ceramide synthases at the centre of sphingolipid metabolism and biology. *Biochem J.* 2012;441:789-802.

- Muriel MP, Lambeng N, Darios F, Michel PP, Hirsch EC, Agid Y, Ruberg M. Mitochondrial free calcium levels (Rhod-2 fluorescence) and ultrastructural alterations in neuronally differentiated PC12 cells during ceramide-dependent cell death. *J Comp Neurol.* 2000;426:297-315.
- Nagahashi M, Kim EY, Yamada A, Ramachandran S, Allegood JC, Hait NC, Maceyka M, Milstien S, Takabe K, Spiegel S. Spns2, a transporter of phosphorylated sphingoid bases, regulates their blood and lymph levels, and the lymphatic network. *FASEB J.* 2013;27:1001-11.
- Nakahara T1, Iwase A, Nakamura T, Kondo M, Bayasula, Kobayashi H, Takikawa S, Manabe S, Goto M, Kotani T, Kikkawa F. Sphingosine-1-phosphate inhibits H₂O₂-induced granulosa cell apoptosis via the PI3K/Akt signaling pathway. *Fertil Steril.* 2012;98:1001-8.e1.
- Neubauer HA, Pitson SM. Roles, regulation and inhibitors of sphingosine kinase 2. *FEBS J.* 2013;280:5317-36.
- Nikolova-Karakashian MN, Rozenova KA. Ceramide in stress response. *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:86-108.
- Noh MY, Kim YS, Lee KY, Lee YJ, Kim SH, Yu HJ, Koh SH. The early activation of PI3K strongly enhances the resistance of cortical neurons to hypoxic injury via the activation of downstream targets of the PI3K pathway and the normalization of the levels of PARP activity, ATP, and NAD⁺. *Mol Neurobiol.* 2013;47:757-69.
- Nowak JM, Grzanka A, Zuryń A, Stepień A. The Rho protein family and its role in the cellular cytoskeleton. *Postepy Hig Med Dosw (Online).* 2008;62:110-7.
- Obinata H, Hla T. Sphingosine 1-phosphate in coagulation and inflammation. *Semin Immunopathol.* 2012;34:73-91.
- Ogretmen B, Hannun YA. Biologically active sphingolipids in cancer pathogenesis and treatment. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:604-16.
- Oh HL, Seok JY, Kwon CH, Kang SK, Kim YK. Role of MAPK in ceramide-induced cell death in primary cultured astrocytes from mouse embryonic brain. *Neurotoxicology.* 2006;27:31-8.
- Okada T, Kajimoto T, Jahangeer S, Nakamura S. Sphingosine kinase/sphingosine 1-phosphate signalling in central nervous system. *Cell Signal.* 2009;21:7-13.
- Olivera A, Urtz N, Mizugishi K, Yamashita Y, Gilfillan AM, Furumoto Y, Gu H, Proia RL, Baumruker T, Rivera J. IgE-dependent activation of sphingosine kinases 1 and 2 and secretion of sphingosine 1-phosphate requires Fyn kinase and contributes to mast cell responses. *J Biol Chem.* 2006;281:2515-25.
- Osborne N, Brand-Arzamendi K, Ober EA, Jin SW, Verkade H, Holtzman NG, Yelon D, Stainier DY. The spinster homolog, two of hearts, is required for sphingosine 1-phosphate signaling in zebrafish. *Curr Biol.* 2008;18:1882-8.

Oskouian B, Saba JD. Cancer treatment strategies targeting sphingolipid metabolism. *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:185-205.

Otera H, Ohsakaya S, Nagaura Z, Ishihara N, Mihara K. Export of mitochondrial AIF in response to proapoptotic stimuli depends on processing at the intermembrane space. *EMBO J.* 2005;24:1375-86.

Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis.* 2007;12:913-22.

Ouro A, Arana L, Gangoiti P, Gomez-Muñoz A. Role of Ceramide 1-Phosphate in the Regulation of Cell Survival and Inflammation. www.intechopen.com.

Owczarek TB, Suchanski J, Pula B, Kmiecik AM, Chadalski M, Jethon A, Dziegiel P, Ugorski M. Galactosylceramide affects tumorigenic and metastatic properties of breast cancer cells as an anti-apoptotic molecule. *PLoS One.* 2013;8:e84191.

Oyarce AM, Fleming PJ. Multiple forms of human dopamine beta-hydroxylase in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Arch Biochem Biophys.* 1991;290:503-10.

Panjarian S, Kozhaya L, Arayssi S, Yehia M, Bielawski J, Bielawska A, Usta J, Hannun YA, Obeid LM, Dbaibo GS. De novo N-palmitoylsphingosine synthesis is the major biochemical mechanism of ceramide accumulation following p53 up-regulation. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2008;86:41-8.

Park JW, Park WJ, Futerman AH. Ceramide synthases as potential targets for therapeutic intervention in human diseases. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841:671-81.

Pchejetski D, Kunduzova O, Dayon A, Calise D, Seguelas MH, Leducq N, Seif I, Parini A, Cuveillier O. Oxidative stress-dependent sphingosine kinase-1 inhibition mediates monoamine oxidase A-associated cardiac cell apoptosis. *Circ Res.* 2007 ;100:41-9.

Perera MN, Lin SH, Peterson YK, Bielawska A, Szulc ZM, Bittman R, Colombini M. Bax and Bcl-xL exert their regulation on different sites of the ceramide channel. *Biochem J.* 2012;445:81-91.

Perry RJ, Ridgway ND. Molecular mechanisms and regulation of ceramide transport. *Biochim Biophys Acta.* 2005;1734:220-34.

Petroni D, Tsai J, Mondal D, George W. Attenuation of low dose methylmercury and glutamate induced-cytotoxicity and tau phosphorylation by an N-methyl-D-aspartate antagonist in human neuroblastoma (SHSY5Y) cells. *Environ Toxicol.* 2013;28:700-6.

Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res Rev.* 2006;52:201-43.

Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene.* 2008;27:6507-21.

- Pike LJ. Lipid rafts: bringing order to chaos. *J Lipid Res.* 2003;44:655-67.
- Pinschewer DD, Brinkmann V, Merkler D. Impact of sphingosine 1-phosphate modulation on immune outcomes. *Neurology.* 2011;76(8 Suppl 3):S15-9.
- Pinton P, Ferrari D, Rapizzi E, Di Virgilio F, Pozzan T, Rizzuto R. The Ca²⁺ concentration of the endoplasmic reticulum is a key determinant of ceramide-induced apoptosis: significance for the molecular mechanism of Bcl-2 action. *EMBO J.* 2001;20:2690-701.
- Pitson SM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Xia P, Vadas MA, Wattenberg BW. Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation. *EMBO J.* 2003;22:5491-500.
- Pitson SM, Xia P, Leclercq TM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Wattenberg BW, Vadas MA. Phosphorylation-dependent translocation of sphingosine kinase to the plasma membrane drives its oncogenic signalling. *J Exp Med.* 2005;201:49-54.
- Pitson SM. Regulation of sphingosine kinase and sphingolipid signaling. *Trends Biochem Sci.* 2011;36:97-107.
- Podbielska M, Krotkiewski H, Hogan EL. Signaling and regulatory functions of bioactive sphingolipids as therapeutic targets in multiple sclerosis. *Neurochem Res.* 2012;37:1154-69.
- Polivka J Jr, Janku F. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther.* 2014;142:164-75.
- Ponnusamy S, Meyers-Needham M, Senkal CE, Saddoughi SA, Sentelle D, Selvam SP, Salas A, Ogretmen B. Sphingolipids and cancer: ceramide and sphingosine-1-phosphate in the regulation of cell death and drug resistance. *Future Oncol.* 2010;6:1603-24.
- Potteck H, Nieuwenhuis B, Lüth A, van der Giet M, Kleuser B. Phosphorylation of the immunomodulator FTY720 inhibits programmed cell death of fibroblasts via the S1P3 receptor subtype and Bcl-2 activation. *Cell Physiol Biochem.* 2010;26:67-78.
- Powell DJ, Hajduch E, Kular G, Hundal HS. Ceramide disables 3-phosphoinositide binding to the pleckstrin homology domain of protein kinase B (PKB)/Akt by a PKCzeta-dependent mechanism. *Mol Cell Biol.* 2003;23:7794-808.
- Pyne NJ, Pyne S. Sphingosine 1-phosphate and cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10:489-503.
- Pyne S, Pyne NJ. Sphingosine 1-phosphate signalling and termination at lipid phosphate receptors. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582:121-31.
- Pyne S, Pyne NJ. Translational aspects of sphingosine 1-phosphate biology. *Trends Mol Med.* 2011;17:463-72.

- Pyszko J, Strosznajder JB. Sphingosine Kinase 1 and Sphingosine-1-Phosphate in Oxidative Stress Evoked by 1-Methyl-4-Phenylpyridinium (MPP+) in Human Dopaminergic Neuronal Cells. *Mol Neurobiol.* 2014;50:38-48.
- Quillet-Mary A, Jaffrézou JP, Mansat V, Bordier C, Naval J, Laurent G. Implication of mitochondrial hydrogen peroxide generation in ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem.* 1997;272:21388-95.
- Radnai B, Antus C, Racz B, Engelmann P, Priber JK, Tucsek Z, Veres B, Turi Z, Lorand T, Sumegi B, Gallyas F Jr. Protective effect of the poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor PJ34 on mitochondrial depolarization-mediated cell death in hepatocellular carcinoma cells involves attenuation of c-Jun N-terminal kinase-2 and protein kinase B/Akt activation. *Mol Cancer.* 2012;11:34.
- Reubold TF, Wohlgemuth S, Eschenburg S. A new model for the transition of APAF-1 from inactive monomer to caspase-activating apoptosome. *J Biol Chem.* 2009;284:32717-24.
- Rhein V, Baysang G, Rao S, Meier F, Bonert A, Müller-Spahn F, Eckert A. Amyloid-beta leads to impaired cellular respiration, energy production and mitochondrial electron chain complex activities in human neuroblastoma cells. *Cell Mol Neurobiol.* 2009;29(6-7):1063-71.
- Riboni L, Prinetti A, Bassi R, Viani P, Tettamanti G. The effects of exogenous sphingosine on Neuro2a cells are strictly related to the overall capacity of cells to metabolize sphingosine. *J Biochem.* 1998;124:900-4.
- Rolland WB 2nd, Manaenko A, Lekic T, Hasegawa Y, Ostrowski R, Tang J, Zhang JH. FTY720 is neuroprotective and improves functional outcomes after intracerebral hemorrhage in mice. *Acta Neurochir Suppl.* 2011;111:213-7.
- Roy MJ, Vom A, Czabotar PE, Lessene G. Cell death and the mitochondria: therapeutic targeting of the BCL-2 family-driven pathway. *Br J Pharmacol.* 2014;171:1973-87.
- Royall JA, Ischiropoulos H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. *Arch Biochem Biophys.* 1993;302:348-55.
- Ruvolo PP, Deng X, Ito T, Carr BK, May WS. Ceramide induces Bcl2 dephosphorylation via a mechanism involving mitochondrial PP2A. *J Biol Chem.* 1999;274:20296-300.
- Sanchez T, Hla T. Structural and functional characteristics of S1P receptors. *J Cell Biochem.* 2004;92:913-22.
- Sanz C, Benito A, Inohara N, Ekhterae D, Nunez G, Fernandez-Luna JL. Specific and rapid induction of the proapoptotic protein Hrk after growth factor withdrawal in hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2000;95:2742-7.

Sarszegi Z, Bogнар E, Gaszner B, Kónyi A, Gallyas F Jr, Sumegi B, Berente Z. BGP-15, a PARP-inhibitor, prevents imatinib-induced cardiotoxicity by activating Akt and suppressing JNK and p38 MAP kinases. *Mol Cell Biochem.* 2012;365:129-37.

Satoi H, Tomimoto H, Ohtani R, Kitano T, Kondo T, Watanabe M, Oka N, Akiguchi I, Furuya S, Hirabayashi Y, Okazaki T. Astroglial expression of ceramide in Alzheimer's disease brains: a role during neuronal apoptosis. *Neuroscience.* 2005;130:657-66.

Sauer B, Gonska H, Manggau M, Kim DS, Schraut C, Schäfer-Korting M, Kleuser B. Sphingosine 1-phosphate is involved in cytoprotective actions of calcitriol in human fibroblasts and enhances the intracellular Bcl-2/Bax rheostat. *Pharmazie.* 2005;60:298-304.

Schieber M, Chandel NS. ROS Function in Redox Signaling and Oxidative Stress. *Curr Biol.* 2014;24:R453-R462.

Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G. Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006;7:517-28.

Schütze S, Potthoff K, Machleidt T, Berkovic D, Wiegmann K, Krönke M. TNF activates NF-kappa B by phosphatidylcholine-specific phospholipase C-induced "acidic" sphingomyelin breakdown. *Cell.* 1992;71:765-76.

Shamas-Din A, Brahmhatt H, Leber B, Andrews DW. BH3-only proteins: Orchestrators of apoptosis. *Biochim Biophys Acta.* 2011;1813:508-20.

Shi Y. Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell.* 2002;9:459-70.

Shimeno H, Soeda S, Sakamoto M, Kouchi T, Kowakame T, Kihara T. Partial purification and characterization of sphingosine N-acyltransferase (ceramide synthase) from bovine liver mitochondrion-rich fraction. *Lipids.* 1998;33:601-5.

Shimoke K, Yamagishi S, Yamada M, Ikeuchi T, Hatanaka H. Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase activity elevates c-Jun N-terminal kinase activity in apoptosis of cultured cerebellar granule neurons. *Brain Res Dev Brain Res.* 1999;112:245-53.

Shoshan-Barmatz V, Gincel D. The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem Biophys.* 2003;39:279-92.

Sies H. Oxidative Stress: Introductory Remarks. W: Sies, H. (red.), *Oxidative Stress.* Academic Press, USA, 1985, 1-7.

Simbulan-Rosenthal CM, Rosenthal DS, Luo RB, Samara R, Jung M, Dritschilo A, Spoonde A, Smulson ME. Poly(ADP-ribosyl)ation of p53 in vitro and in vivo modulates binding to its DNA consensus sequence. *Neoplasia.* 2001;3:179-88.

- Siskind LJ, Colombini M. The lipids C2- and C16-ceramide form large stable channels. Implications for apoptosis. *J Biol Chem.* 2000;275:38640-4.
- Siskind LJ, Davoody A, Lewin N, Marshall S, Colombini M. Enlargement and contracture of C2-ceramide channels. *Biophys J.* 2003;85:1560-75.
- Siskind LJ, Feinstein L, Yu T, Davis JS, Jones D, Choi J, Zuckerman JE, Tan W, Hill RB, Hardwick JM, Colombini M. Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins Disassemble Ceramide Channels. *J Biol Chem.* 2008;283:6622-30.
- Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J Biol Chem.* 2002;277:26796-803.
- Siskind LJ, Kolesnick RN, Colombini M. Ceramide forms channels in mitochondrial outer membranes at physiologically relevant concentrations. *Mitochondrion.* 2006;6:118-25.
- Song ZF, Chen DY, DU B, Ji XP. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor reduces heart ischaemia/reperfusion injury via inflammation and Akt signalling in rats. *Chin Med J (Engl).* 2013;126:1913-7.
- Song ZF, Ji XP, Li XX, Wang SJ, Wang SH, Zhang Y. Inhibition of the activity of poly (ADP-ribose) polymerase reduces heart ischaemia/reperfusion injury via suppressing JNK-mediated AIF translocation. *J Cell Mol Med.* 2008;12:1220-8.
- Spiegel S, Milstien S. Sphingosine-1-phosphate: an enigmatic signalling lipid. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2003;4:397-407.
- Stiban J, Caputo L, Colombini M. Ceramide synthesis in the endoplasmic reticulum can permeabilize mitochondria to proapoptotic proteins. *J Lipid Res.* 2007;49:625-34.
- Stiban J, Tidhar R, Futerman AH. Ceramide synthases: roles in cell physiology and signaling. *Adv Exp Med Biol.* 2010;688:60-71.
- Stoica BA, Movsesyan VA, Knoblach SM, Faden AI. Ceramide induces neuronal apoptosis through mitogen-activated protein kinases and causes release of multiple mitochondrial proteins. *Mol Cell Neurosci.* 2005;29:355-71.
- Stoica BA, Movsesyan VA, Lea PM 4th, Faden AI. Ceramide-induced neuronal apoptosis is associated with dephosphorylation of Akt, BAD, FKHR, GSK-3beta, and induction of the mitochondrial-dependent intrinsic caspase pathway. *Mol Cell Neurosci.* 2003;22:365-82.
- Strosznajder JB, Cieslik M, Cakala M, Jesko H, Eckert A, Strosznajder RP. Lipoxygenases and poly(ADP-ribose) polymerase in amyloid beta cytotoxicity. *Neurochem Res.* 2011;36:839-48.
- Strosznajder JB, Czapski GA, Adamczyk A, Strosznajder RP. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 in amyloid beta toxicity and Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol.* 2012;46:78-84.

- Strosznajder RP, Czubowicz K, Jesko H, Strosznajder JB. Poly(ADP-ribose) metabolism in brain and its role in ischemia pathology. *Mol Neurobiol*. 2010;41:187-96.
- Strosznajder RP, Gadamski R, Czapski GA, Jesko H, Strosznajder JB. Poly(ADP-ribose) polymerase during reperfusion after transient forebrain ischemia: its role in brain edema and cell death. *J Mol Neurosci*. 2003;20:61-72.
- Strosznajder RP, Gajkowska B. Effect of 3-aminobenzamide on Bcl-2, Bax and AIF localization in hippocampal neurons altered by ischemia-reperfusion injury. the immunocytochemical study. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 2006;66:15-22.
- Strosznajder RP, Jesko H, Adamczyk A. Effect of aging and oxidative/genotoxic stress on poly(ADP-ribose) polymerase-1 activity in rat brain. *Acta Biochim Pol*. 2005a;52:909-14.
- Strosznajder RP, Jesko H, Zambrzycka A. Poly(ADP-ribose) polymerase: the nuclear target in signal transduction and its role in brain ischemia-reperfusion injury. *Mol Neurobiol*. 2005b;31:149-67.
- Strub GM, Maceyka M, Hait NC, Milstien S, Spiegel S. Extracellular and intracellular actions of sphingosine-1-phosphate. *Adv Exp Med Biol*. 2010;688:141-55.
- Suh SW, Aoyama K, Chen Y, Garnier P, Matsumori Y, Gum E, Liu J, Swanson RA. Hypoglycemic neuronal death and cognitive impairment are prevented by poly(ADP-ribose) polymerase inhibitors administered after hypoglycemia. *J Neurosci*. 2003;23:10681-90.
- Sun W, Xu R, Hu W, Jin J, Crellin HA, Bielawski J, Szulc ZM, Thiers BH, Obeid LM, Mao C. Upregulation of the human alkaline ceramidase 1 and acid ceramidase mediates calcium-induced differentiation of epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol*. 2008;128:389-97.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, Mangion J, Jacotot E, Costantini P, Loeffler M, Larochette N, Goodlett DR, Aebersold R, Siderovski DP, Penninger JM, Kroemer G. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature*. 1999;397:441-6.
- Szabados E, Literati-Nagy P, Farkas B, Sumegi B. BGP-15, a nicotinic amidoxime derivate protecting heart from ischemia reperfusion injury through modulation of poly(ADP-ribose) polymerase. *Biochem Pharmacol*. 2000;59:937-45.
- Tada E, Toyomura K, Nakamura H, Sasaki H, Saito T, Kaneko M, Okuma Y, Murayama T. Activation of ceramidase and ceramide kinase by vanadate via a tyrosine kinase-mediated pathway. *J Pharmacol Sci*. 2010;114:420-32.
- Taha TA, Mullen TD, Obeid LM. A house divided: ceramide, sphingosine, and sphingosine-1-phosphate in programmed cell death. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1758:2027-36.
- Taha TA, Osta W, Kozhaya L, Bielawski J, Johnson KR, Gillanders WE, Dbaibo GS, Hannun YA, Obeid LM. Down-regulation of sphingosine kinase-1 by DNA damage: dependence on proteases and p53. *J Biol Chem*. 2004;279:20546-54.

Takabe K, Spiegel S. Export of Sphingosine-1-Phosphate and Cancer Progression. *J Lipid Res.* 2014;55:1839-46.

Takasugi N, Sasaki T, Suzuki K, Osawa S, Isshiki H, Hori Y, Shimada N, Higo T, Yokoshima S, Fukuyama T, Lee VM, Trojanowski JQ, Tomita T, Iwatsubo T. BACE1 activity is modulated by cell-associated sphingosine-1-phosphate. *J Neurosci.* 2011;31:6850-7.

Taniguchi M, Okazaki T. The role of sphingomyelin and sphingomyelin synthases in cell death, proliferation and migration-from cell and animal models to human disorders. *Biochim Biophys Acta.* 2014;1841:692-703.

Tapodi A, Debrececi B, Hanto K, Bogнар Z, Wittmann I, Gallyas F Jr, Varbiro G, Sumegi B. Pivotal role of Akt activation in mitochondrial protection and cell survival by poly(ADP-ribose)polymerase-1 inhibition in oxidative stress. *J Biol Chem.* 2005;280:35767-75.

Tavarini S, Colombaioni L, Garcia-Gil M. Sphingomyelinase metabolites control survival and apoptotic death in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neurosci Lett.* 2000;285:185-8.

Tian HP, Qiu TZ, Zhao J, Li LX, Guo J. Sphingomyelinase-induced ceramide production stimulate calcium-independent JNK and PP2A activation following cerebral ischemia. *Brain Inj.* 2009;23(13-14):1073-80.

Tieu K, Zuo DM, Yu PH. Differential effects of staurosporine and retinoic acid on the vulnerability of the SH-SY5Y neuroblastoma cells: involvement of bcl-2 and p53 proteins. *J Neurosci Res.* 1999;58:426-35.

Toman RE, Movsesyan V, Murthy SK, Milstien S, Spiegel S, Faden AI. Ceramide-induced cell death in primary neuronal cultures: upregulation of ceramide levels during neuronal apoptosis. *J Neurosci Res.* 2002;68:323-30.

Tournier C. The 2 Faces of JNK Signaling in Cancer. *Genes Cancer.* 2013;4:397-400.

Tsuruta F, Sunayama J, Mori Y, Hattori S, Shimizu S, Tsujimoto Y, Yoshioka K, Masuyama N, Gotoh Y. JNK promotes Bax translocation to mitochondria through phosphorylation of 14-3-3 proteins. *EMBO J.* 2004;23:1889-99.

Vadas M, Xia P, McCaughan G, Gamble J. The role of sphingosine kinase 1 in cancer: oncogene or non-oncogene addiction? *Biochim Biophys Acta.* 2008;1781:442-7.

Vahsen N, Candé C, Brière JJ, Bénéit P, Joza N, Larochette N, Mastroberardino PG, Pequignot MO, Casares N, Lazar V, Feraud O, Debili N, Wissing S, Engelhardt S, Madeo F, Piacentini M, Penninger JM, Schägger H, Rustin P, Kroemer G. AIF deficiency compromises oxidative phosphorylation. *EMBO J.* 2004;23:4679-89.

Vahsen N, Candé C, Dupaigne P, Giordanetto F, Kroemer RT, Herker E, Scholz S, Modjtahedi N, Madeo F, Le Cam E, Kroemer G. Physical interaction of apoptosis-inducing factor with DNA and RNA. *Oncogene.* 2006;25:1763-74.

- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39:44-84.
- Van Brocklyn JR, Jackson CA, Pearl DK, Kotur MS, Snyder PJ, Prior TW. Sphingosine kinase-1 expression correlates with poor survival of patients with glioblastoma multiforme: roles of sphingosine kinase isoforms in growth of glioblastoma cell lines. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2005;64:695-705.
- Van Brocklyn JR, Williams JB. The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: oxidative stress and the seesaw of cell survival and death. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 2012;163:26-36.
- van Doorn R1, Nijland PG, Dekker N, Witte ME, Lopes-Pinheiro MA, van het Hof B, Kooij G, Reijerkerk A, Dijkstra C, van van der Valk P, van Horssen J, de Vries HE. Fingolimod attenuates ceramide-induced blood-brain barrier dysfunction in multiple sclerosis by targeting reactive astrocytes. *Acta Neuropathol.* 2012;124:397-410.
- van Meer G, Lisman Q. Sphingolipid transport: rafts and translocators. *J Biol Chem.* 2002;277:25855-8.
- Van Overloop H, Denizot Y, Baes M, Van Veldhoven PP. On the presence of C2-ceramide in mammalian tissues: possible relationship to etherphospholipids and phosphorylation by ceramide kinase. *Biol Chem.* 2007;388:315-24.
- Van Overloop H, Gijssbers S, Van Veldhoven PP. Further characterization of mammalian ceramide kinase: substrate delivery and (stereo)specificity, tissue distribution, and subcellular localization studies. *J Lipid Res.* 2006;47:268-83.
- Verhagen AM, Ekert PG, Pakusch M, Silke J, Connolly LM, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ, Vaux DL. Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell.* 2000;102:43-53.
- Virág L, Robaszkiewicz A, Rodriguez-Vargas JM, Oliver FJ. Poly(ADP-ribose) signaling in cell death. *Mol Aspects Med.* 2013;34:1153-67.
- von Haefen C, Wieder T, Gillissen B, Stärck L, Graupner V, Dörken B, Daniel PT. Ceramide induces mitochondrial activation and apoptosis via a Bax-dependent pathway in human carcinoma cells. *Oncogene.* 2002;21:4009-19.
- Vosler PS, Sun D, Wang S, Gao Y, Kintner DB, Signore AP, Cao G, Chen J. Calcium dysregulation induces apoptosis-inducing factor release: cross-talk between PARP-1- and calpain-signaling pathways. *Exp Neurol.* 2009;218:213-20.
- Vyssokikh MY, Brdiczka D. The function of complexes between the outer mitochondrial membrane pore (VDAC) and the adenine nucleotide translocase in regulation of energy metabolism and apoptosis. *Acta Biochim Pol.* 2003;50:389-404.
- Walker CL, Liu NK, Xu XM. PTEN/PI3K and MAPK signaling in protection and pathology following CNS injuries. *Front Biol (Beijing).* 2013;8(4).

- Wang DB, Kinoshita C, Kinoshita Y, Morrison RS. p53 and mitochondrial function in neurons. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1842:1186-97.
- Wang H, Yu SW, Koh DW, Lew J, Coombs C, Bowers W, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor substitutes for caspase executioners in NMDA-triggered excitotoxic neuronal death. *J Neurosci*. 2004;24:10963-10973.
- Wang Y, Kim NS, Haince JF, Kang HC, David KK, Andrabi SA, Poirier GG, Dawson VL, Dawson TM. Poly(ADP-ribose) (PAR) binding to apoptosis-inducing factor is critical for PAR polymerase-1-dependent cell death (parthanatos). *Sci Signal*. 2011;4:ra20.
- Wang Y, Kim NS, Li X, Greer PA, Koehler RC, Dawson VL, Dawson TM. Calpain activation is not required for AIF translocation in PARP-1-dependent cell death (parthanatos). *J Neurochem*. 2009;110:687-96.
- Wattenberg BW. Role of sphingosine kinase localization in sphingolipid signaling. *World J Biol Chem*. 2010;1:362-8.
- Weaver AN, Yang ES. Beyond DNA Repair: Additional Functions of PARP-1 in Cancer. *Front Oncol*. 2013;3:290.
- Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ. Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*. 2001;292:727-30.
- Wesierska-Gadek J, Wang ZQ, Schmid G. Reduced stability of regularly spliced but not alternatively spliced p53 protein in PARP-deficient mouse fibroblasts. *Cancer Res*. 1999;59:28-34.
- Wiegmann K, Schütze S, Machleidt T, Witte D, Krönke M. Functional dichotomy of neutral and acidic sphingomyelinases in tumor necrosis factor signaling. *Cell*. 1994;78:1005-15.
- Wijesinghe DS, Massiello A, Subramanian P, Szulc Z, Bielawska A, Chalfant CE. Substrate specificity of human ceramide kinase. *J Lipid Res*. 2005;46:2706-16.
- Willaime S, Vanhoutte P, Caboche J, Lemaigre-Dubreuil Y, Mariani J, Brugg B. Ceramide-induced apoptosis in cortical neurons is mediated by an increase in p38 phosphorylation and not by the decrease in ERK phosphorylation. *Eur J Neurosci*. 2001;13:2037-46.
- Willaime-Morawek S, Bami-Cherrier K, Mariani J, Caboche J, Brugg B. C-Jun N-terminal kinases/c-Jun and p38 pathways cooperate in ceramide-induced neuronal apoptosis. *Neuroscience*. 2003;119:387-97.
- Won JS, Singh I. Sphingolipid signaling and redox regulation. *Free Radic Biol Med*. 2006;40:1875-88.
- Wong J, Higgins M, Halliday G, Garner B. Amyloid beta selectively modulates neuronal TrkB alternative transcript expression with implications for Alzheimer's disease. *Neuroscience*. 2012;210:363-74.

- Wu BX, Clarke CJ, Hannun YA. Mammalian neutral sphingomyelinases: regulation and roles in cell signaling responses. *Neuromolecular Med.* 2010;12:320-30.
- Wu BX, Clarke CJ, Matmati N, Montefusco D, Bartke N, Hannun YA. Identification of novel anionic phospholipid binding domains in neutral sphingomyelinase 2 with selective binding preference. *J Biol Chem.* 2011;286:22362-71.
- Wu BX, Rajagopalan V, Roddy PL, Clarke CJ, Hannun YA. Identification and characterization of murine mitochondria-associated neutral sphingomyelinase (MANSMase), the mammalian sphingomyelin phosphodiesterase 5. *J Biol Chem.* 2010;285:17993-8002.
- Xie HR, Hu LS, Li GY. SH-SY5Y human neuroblastoma cell line: in vitro cell model of dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Chin Med J (Engl).* 2010;123:1086-92.
- Xin M, Deng X. Protein phosphatase 2A enhances the proapoptotic function of Bax through dephosphorylation. *J Biol Chem.* 2006;281:18859-67.
- Xu R, Jin J, Hu W, Sun W, Bielawski J, Szulc Z, Taha T, Obeid LM, Mao C. Golgi alkaline ceramidase regulates cell proliferation and survival by controlling levels of sphingosine and S1P. *FASEB J.* 2006;20:1813-25.
- Yang J, Duerksen-Hughes PJ. Activation of a p53-independent, sphingolipid-mediated cytolytic pathway in p53-negative mouse fibroblast cells treated with N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine. *J Biol Chem.* 2001;276:27129-35.
- Yang X, Wang S, Lin Y, Han Y, Qiu X, Zhao X, Cao L, Wang X, Chi Z. Poly(ADP-ribose) polymerase inhibition protects epileptic hippocampal neurons from apoptosis via suppressing Akt-mediated apoptosis-inducing factor translocation in vitro. *Neuroscience.* 2013;231:353-62.
- Ye H, Cande C, Stephanou NC, Jiang S, Gurbuxani S, Larochette N, Daugas E, Garrido C, Kroemer G, Wu H. DNA binding is required for the apoptogenic action of apoptosis inducing factor. *Nat Struct Biol.* 2002;9:680-4.
- Yeste-Velasco M, Folch J, Casadesús G, Smith MA, Pallàs M, Camins A. Neuroprotection by c-Jun NH2-terminal kinase inhibitor SP600125 against potassium deprivation-induced apoptosis involves the Akt pathway and inhibition of cell cycle reentry. *Neuroscience.* 2009;159:1135-47.
- Yu J, Novgorodov SA, Chudakova D, Zhu H, Bielawska A, Bielawski J, Obeid LM, Kindy MS, Gudz TI. JNK3 signaling pathway activates ceramide synthase leading to mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem.* 2007;282:25940-9.
- Yu SW, Andrabi SA, Wang H, Kim NS, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Apoptosis-inducing factor mediates poly(ADP-ribose) (PAR) polymer-induced cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:18314-9.
- Yu SW, Wang H, Dawson TM, Dawson VL. Poly(ADP-ribose) polymerase-1 and apoptosis inducing factor in neurotoxicity. *Neurobiol Dis.* 2003;14:303-17.

Yu SW, Wang H, Poitras MF, Coombs C, Bowers WJ, Federoff HJ, Poirier GG, Dawson TM, Dawson VL. Mediation of poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cell death by apoptosis-inducing factor. *Science*. 2002;297:259-63.

Yu SW, Wang Y, Frydenlund DS, Ottersen OP, Dawson VL, Dawson TM. Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro*. 2009;1(5). pii: e00021. doi: 10.1042/AN20090046.

Yuan S, Akey CW. Apoptosome structure, assembly, and procaspase activation. *Structure*. 2013;21:501-15.

Zeidan YH, Hannun YA. The acid sphingomyelinase/ceramide pathway: biomedical significance and mechanisms of regulation. *Curr Mol Med*. 2010;10:454-66.

Zeng C, Lee JT, Chen H, Chen S, Hsu CY, Xu J. Amyloid-beta peptide enhances tumor necrosis factor-alpha-induced iNOS through neutral sphingomyelinase/ceramide pathway in oligodendrocytes. *J Neurochem*. 2005;94:703-12.

Zhang J, Alter N, Reed JC, Borner C, Obeid LM, Hannun YA. Bcl-2 interrupts the ceramide-mediated pathway of cell death. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996;93:5325-8.

Zhang Y, Li X, Becker KA, Gulbins E. Ceramide-enriched membrane domains--structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2009;1788:178-83.

Zhou H, Summers SA, Birnbaum MJ, Pittman RN. Inhibition of Akt kinase by cell-permeable ceramide and its implications for ceramide-induced apoptosis. *J Biol Chem*. 1998;273:16568-75.