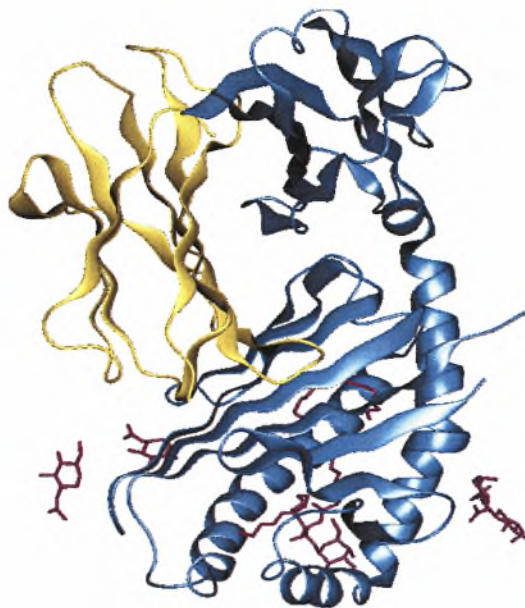




Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας  
Σχολή Επιστημών Υγείας  
Τμήμα Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας

Ο Ρόλος του Κεραμιδίου στο Μονοπάτι του  
Κυτταρικού Θανάτου του Γλοιώματος που Επάγεται  
από Εκκρινόμενους από Μικρογλοιακά Κύτταρα  
Παράγοντες



*Διπλωματική Εργασία*

ΙΩΑΝΝΑ ΚΑΡΑΜΙΧΑΛΗ

ΛΑΡΙΣΑ 2007



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 5802/1  
Ημερ. Εισ.: 31-03-2009  
Δωρεά: Π.Θ.  
Ταξιδετικός Κωδικός: ΠΤ - ΒΒ  
2007  
ΚΑΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000087323

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο τμήμα της καρκινικής ιολογίας του ATV, το οποίο ανήκει στο ερευνητικό κέντρο DKFZ, στη Heidelberg της Γερμανίας.

Μέλη της τριμελούς επιτροπής:

κ. Ζίφα Αιμιλία, Λέκτορα Βιολογίας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,

κ. Σταθόπουλος Κωνσταντίνος, Επίκουρος Καθηγητής Βιοχημείας, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Τμήμα Βιοχημείας & Βιοτεχνολογίας,

Dr. Anne Regnier-Vigouroux, DKFZ, Heidelberg, Γερμανία.

#### Ευχαριστίες:

Στους διδάσκοντες του τμήματος Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας, του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας,

κ. Σταθόπουλο Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Βιοχημείας με έμφαση τη μεταβολική ρύθμιση,

κ. Ζίφα Αιμιλία, Λέκτορα Βιολογίας (νευροβιολογίας),

κ. Ματθιόπουλο Κωνσταντίνο, Επίκουρο Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας.

Στους εργαζόμενους του ερευνητικού κέντρου της Γερμανίας, για τον καρκίνο (DKFZ),

Prof. Dr. Jean Rommelaere

Dr. Anne Regnier-Vigouroux

κ. Mora Rodrigo

κ. Glasgow Désirée

κ. Kees Tim

καθώς και όλους τους εργαζόμενους του εργαστηρίου 2.212 και 2.210, του τμήματος της καρκινικής ιολογίας του ATV.

<u>Περιεχόμενα</u>	Σελ.
<b>Περίληψη/Abstract</b> .....	4
<b>Εισαγωγή:</b>	
Το Γλοίωμα και τα Γλοιακά Κύτταρα.....	5
Η Δράση του Υπερκείμενου των Διεγερμένων Μικρογλοιακών Κυττάρων και η Αυτοφαγία.....	6-7
Το κεραμίδιο και ο Ρόλος του στο Μονοπάτι Κυτταρικού Θανάτου.....	8
Ο Σχεδιασμός της Μελάτης.....	9
Τα Μονοπάτια Παραγωγής του Κεραμιδίου.....	9-10
Το Θεωρητικό Μοντέλο του Μηχανισμού του Κυτταρικού Θανάτου.....	10
<b>Υλικά</b> .....	12
<b>Μέθοδοι:</b>	
Καλλιέργεια Κυττάρων.....	13
Διέγερση Μικρογλοιακών Κυττάρων.....	13-14
Κυτταρομετρία Ροής (Flow Cytometry).....	14-15
FACs (Fluorescence Activated Cell sorter).....	15-18
Διερεύνηση της Τοξικότητας του Κεραμιδίου και των SNLI.....	18
Καταστολή της Αυτοφαγίας και της Παραγωγής της Καθεψίνης D.....	18-19
Προσδιορισμός των Επιπέδων του Κεραμιδίου στο Κύτταρο.....	19-22
Καταστολή της Παραγωγής του Κεραμιδίου.....	22-23
Amplex Red SMase Assay Kit.....	24
<b>Αποτελέσματα:</b>	
Διερεύνηση της Τοξικότητας του Κεραμιδίου.....	25-28
Σχέση με την Αυτοφαγία και την Καθεψίνη D.....	28-30
Προσδιορισμός των Επιπέδων του Κεραμιδίου, με την Θεραπεία με SN... Το Μονοπάτι: <i>de novo</i> Σύνθεση: Fumosin B1, Myriocin.....	30-34
Σύνθεση από τη ASMase: Desipramine.....	35-36
Σύνθεση από τη NSMase: GW4869, 3-0 methylsphingomyelin και NAC....	37-38
Προσδιορισμός της Ενεργής Σφιγγομυελινάσης.....	38-41
Προσδιορισμός της Ενεργής Σφιγγομυελινάσης.....	42-43
<b>Συζήτηση-Συμπεράσματα:</b>	
Το Νέο Μοντέλο του Μηχανισμού του Κυτταρικού Θανάτου.....	44-46
<b>Βιβλιογραφία</b> .....	47-51

### Περίληψη:

Το κεραμίδιο, είναι ένα σφινγγολιπίδιο, το οποίο χαρακτηρίζεται από την ρυθμιστική του ικανότητα, κατά την αύξηση, την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση, αλλά και τον κυτταρικό θάνατο. Η ταυτότητά του ως ρυθμιστής του κυτταρικού θανάτου και συγκεκριμένα της αυτοφαγίας, βοήθησε στην ανάπτυξη της θεωρίας, ότι το κεραμίδιο αναμειγνύεται στο μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου που επάγεται από εκκρινόμενους από διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα, παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί προκαλούν εξειδικευμένα τον θάνατο των καρκινικών αστροκυττάρων (γλοιωματικά κύτταρα), αλλά όχι και των υγιών. Η μελέτη της θεωρίας αυτής οδήγησε στο συμπέρασμα, ότι όντως τα επίπεδα του κεραμιδίου, αυξάνονται κατά τη θεραπεία των γλοιωματικών κυττάρων με το υπερκείμενο των διεγερμένων μικρογλοιακών κυττάρων (SN). Επιπροσθέτως αποδείχτηκε ότι η αύξηση αυτή προκαλείται, μέσω του μονοπατιού παραγωγής του κεραμιδίου από τη σφινγγομυελίνη, με τη βοήθεια των ενζύμων nSMase και aSMase. Η γνώση αυτή ανοίγει τον δρόμο για την επέκταση της έρευνας στη ταυτοποίηση των παραγόντων που εκκρίνονται από τα μικρογλοιακά κύτταρα, οι οποίοι έχουν την ικανότητα να προάγουν τον κυτταρικό θάνατο στα καρκινικά κύτταρα.

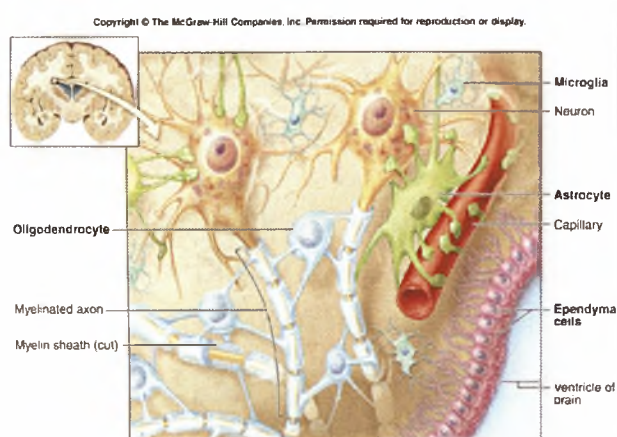
### Abstract:

Ceramide is a sphingosine based molecule, which is known as a common regulator for many biological processes, like cellular differentiation, proliferation and cell death. Between these processes is also autophagy, a process that is proved to be involved in the glioma cell death pathway, which is caused from the super neatened (SN) from stimulated microglia. This fact lead to the theory that maybe ceramide participates in the pathway of microglia induced cell death. The study of this theory proved that indeed, the levels of ceramide are increased, during the treatment with the SN. This increase is the result of the activity of two enzymes, nSMase and aSMase. This knowledge can lead to the identification of the factors, which induce glioma cell death, after they are secreted by stimulated microglia.

## Εισαγωγή:

Το γλοίωμα είναι ένας από τους πιο συνηθεις και επικίνδυνους καρκίνους του εγκεφάλου. Με τον όρο γλοίωμα συνήθως αναφερόμαστε στο αστροκύττωμα (καρκινικά αστροκύτταρα), το οποίο είναι πιο γνωστό και αποτελεί την πιο συχνή μορφή καρκίνου του εγκεφάλου. Το γλοίωμα χαρακτηρίζεται από υψηλή διεισδυτικότητα, επιθετικότητα, αλλά και νευρολογική καταστροφή [11,12].

Τα αστροκύτταρα, τα ολιγοδενδροκύτταρα, καθώς και τα μικρογλοιακά κύτταρα, ανήκουν στη κατηγορία των γλοιακών κυττάρων και συναντώνται στο εγκέφαλο, μαζί με τα νευρικά κύτταρα. (Εικόνα 1)



*Εικόνα 1. Τα γλοιακά κύτταρα (αστροκύττα, μικρογλοιακά κύτταρα, ολιγοδενδροκύτταρα): Στην εικόνα φαίνεται η θέση και η μορφολογία τους.*

Το γλοιακά κύτταρα χαρακτηρίζονται από τις δομικές και λειτουργικές τους ικανότητες, πιο συγκεκριμένα:

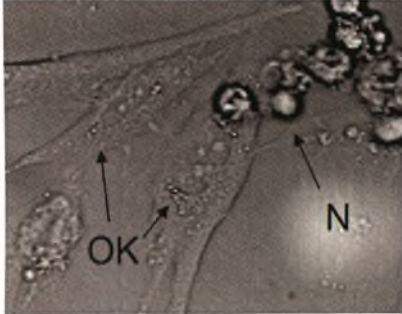
1. Αστροκύτταρα: Ο κύριος ρόλος των αστροκυττάρων οφείλεται στη θέση πολλών από αυτά στον αιματο-εγκεφαλικό φραγμό, όπου έρχονται σε επαφή με αντιγόνα που κυκλοφορούν στον οργανισμό και ενεργοποιούν την ανοσολογική απόκριση στον εγκέφαλο, δράντας ως αντιγίνο-παρουσιαστικά κύτταρα. Τα αστροκύτταρα επίσης, ευθύνονται για την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών ουσιών, νευροτροφικών παραγόντων, αλλά και διαφόρων κυτοκινών, κατά την ανοσολογική απόκριση [1, 2].
2. Ολιγοδενδροκύτταρα: Ο ρόλος των ολιγοδενδροκυττάρων, περιορίζεται στη προστασία των νευροαξόνων, τους οποίους περιβάλλουν, εφόσον στον εγκέφαλο δεν υπάρχουν κύτταρα schwann. Τα ολιγοδενδροκύτταρα, προστατεύουν τους άξονες των νευρικών κυττάρων παράγοντας ένα στρώμα μυελίνης, γύρο από αυτά.

3. Μικρογλοιακά κύτταρα: Τα μικρογλοιακά κύτταρα είναι γνωστά και ως τα φαγοκύτταρα του εγκεφάλου, εφόσον έχουν την ικανότητα να φαγοκυτταρώνουν και να παρουσιάζουν αντιγόνα στην κυτταρική τους μεμβράνη. Η δράση τους είναι νευροτοξική, αλλά και νευροτροφική. Οι νευροτοξικές τους λειτουργίες σχετίζονται με την έναρξη της φλεγμονώδους αντίδρασης και την καταστροφή των νευρώνων κατά την διάρκεια της. Οι νευροτροφικές λειτουργίες τους, από την άλλη, έχουν να κάνουν με την παραγωγή κυτοκινών με μιτογόνο δράση (ιντερλευκίνες: IL1, 6, 10), ανοσοκατασταλτικών ουσιών, αγγειογενετικών ουσιών, αλλά και αυξητικών παραγόντων, όπως βFGF (Fibroblast Growth Factors β), TGF-β (Transforming Growth Factors-β), αλλά και TNFα (Tumor Necrosis Factor-α). Η δράση τους ως φαγοκύτταρα ενεργοποιείται σε περίπτωση μόλυνσης ή και καρκινογένεσης, και καταστέλλεται από την παραγωγή ανοσοκατασταλτικών ουσιών από τα ίδια τα μικρογλοιακά κύτταρα ή και από τα αστροκύτταρα [4].

Τα μικρογλοιακά κύτταρα, έχει παρατηρηθεί ότι συγκεντρώνονται γύρω από το γλοιώμα και πολλές φορές οδηγούν στην απόρριψη του όγκου. Το ποσοστό αυτής τους της συγκέντρωσης, εξαρτάται από το πόσο επιθετικός είναι ο καρκίνος, τον οποίο αντιμετωπίζουν [4, 9, 10]. Στα γλοιώματα που προέρχονται από αστροκύτταρα (τα οποία στο εξής θα τα αποκαλούμε απλώς γλοιώματα) όμως, παρατηρήθηκε ότι τα μικρογλοιακά κύτταρα, αν και ήταν συγκεντρωμένα σε μεγάλους αριθμούς γύρω από το γλοιώμα, ήταν σε καταστολή και δεν ενεργοποιούσαν την ανοσολογική απάντηση. Η περαιτέρω έρευνα του φαινομένου αυτού απέδειξε ότι, κυτοκίνες που παράγονται από το γλοιώμα απενεργοποιούν τα μικρογλοιακά κύτταρα και επιπροσθέτως προάγουν την νευροτροφική τους λειτουργία. Η δράση αυτή των μικρογλοιακών κυττάρων, λειτουργεί προς όφελος της καρκινικής ανάπτυξης [4, 9, 10]. Ο μηχανισμός αυτού του φαινομένου παραμένει ακόμα αδιευκρίνιστος, αλλά οι μελέτες, έχουν επεκταθεί και στη διερεύνηση μεθόδων ενεργοποίησης των κατασταλμένων μικρογλοιακών κυττάρων.

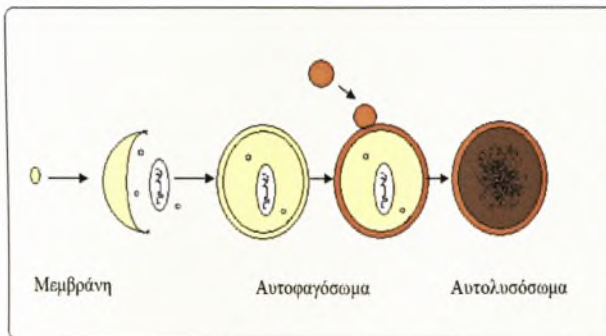
Προηγούμενες μελέτες έδειξαν ότι η θεραπεία των μικρογλοιακών κυττάρων με LPS (λιποπολυσακχαρίτες) και IFN-γ (ιντερφερόνη-γ), τα διεγείρει με αποτέλεσμα την παραγωγή ουσιών που προκαλούν εξειδικευμένα των θάνατο των γλοιωματικών κυττάρων. Οι ουσίες αυτές εντοπίζονται στο υπερκείμενο των διεγερμένων μικρογλοιακών κυττάρων (SN), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα για την θεραπεία σε καρκινικά, αλλά και φυσιολογικά αστροκύτταρα.

Ο θάνατος των καρκινικών αστροκυττάρων, ο οποίος παρατηρήθηκε φαίνεται να οφείλεται στην αυτοφαγία, εφόσον σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες, δεν εξαρτάται από τις κασπάσες και η παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο παραπέμπει σε αυτή, λόγω των οξικών κυστιδίων που παρατηρούνται (Εικόνα 2).



**Εικόνα 2.** Καρκινικά αστροκύτταρα (MT) μετά από την τρίτη ημέρα θεραπείας με SNLI: Παρατηρούμε με N, νεκρά κύτταρα και με OK, τα οξικά κυστιδία στο εσωτερικό των κυττάρων, τα οποία αποδίδονται στην αυτοφαγία.

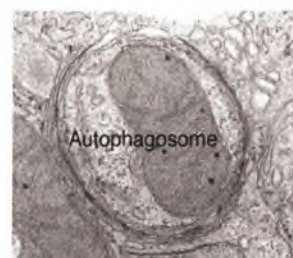
Συνήθως, η αυτοφαγία εξυπηρετεί την αποικοδόμηση πρωτεϊνών με μεγάλο χρόνο ημιζωής, ή και την ανακύκλωση ολόκληρων ενδοκυττάρων οργανιδίων, όταν αυτά έχουν υποστεί ζημιές, ή για την αποφυγή του θανάτου των κυττάρων εξαιτίας έλλειψης θρεπτικών συστατικών [20,21]. Κατά την αυτοφαγία σχηματίζονται κυστιδία με διπλή μεμβράνη, τα οποία εμπεριέχουν τις πρωτεΐνες, ή τα οργανίδια που πρόκειται να αποικοδομηθούν [18]. Τα κυστιδία αυτά ονομάζονται αυτοφαγοσώματα και στη συνέχεια συντήκονται με τα λυσοσώματα του κυττάρου. Τα πρωτεολυτικά ένζυμα των λυσοσωμάτων διαχέονται ανάμεσα στις δύο μεμβράνες του αυτοφαγοσώματος, σχηματίζοντας το αυτολυσόσωμα και σύντομα αποικοδομούν την εσωτερική μεμβράνη με όλα της τα περιεχόμενα (Εικόνα 3, 4).



**Εικόνα 3.** Η αυτοφαγία:

Κυστιδία με διπλή μεμβράνη, (αυτοφαγοσώματα), συντήκονται με τα λυσοσώματα του κυττάρου, σχηματίζοντας το αυτολυσόσωμα [18].

**Εικόνα 4.** Το Αυτοφαγόσωμα: Παρατηρούμε τη διπλή μεμβράνη και το μιτοχόνδριο που εσωκλείεται και προορίζεται για αποικοδόμηση.



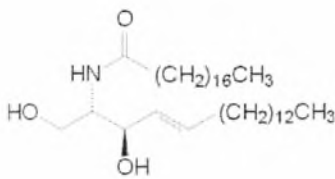


Η αυτοφαγία, όμως μπορεί να οδηγήσει και στο θάνατο του κυττάρου, συνήθως κατά την μαζική καταστροφή κυττάρων, ή όταν η απόπτωση δεν είναι δυνατή εξαιτίας της καταστολής των κασπασών, οι οποίες είναι απαραίτητες για την ενεργοποίηση της [18,20,21,22].

Συμπερασματικά λοιπόν, τα διεγερμένα από LPS και IFN- $\gamma$ , μικρογλοιακά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες, οι οποίοι προκαλούν αυτοφαγία εξειδικευμένα στα γλοιωματικά κύτταρα. Το συμπέρασμα αυτό οδήγησε στην ανάπτυξη ποικίλων ερωτημάτων, εκ των οποίων τα πιο σημαντικά είναι:

Ποιοι είναι αυτοί οι παράγοντες;

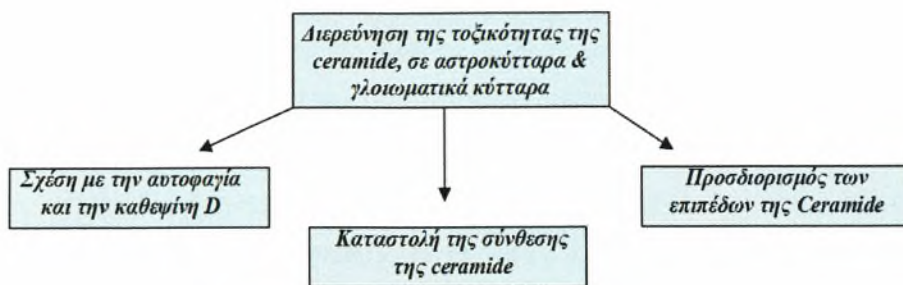
Ποιο ή ποια είναι τα μονοπάτια που συμμετέχουν;



**Εικόνα 5.** Η μοριακή δομή του κεραμιδίου: Πρόκειται για ένα σφιγγολιπίδιο με δομικές και ρυθμιστικές ιδιότητες, κατά τη διαφοροποίηση, την ανάπτυξη και τον κυτταρικό θάνατο. [24, 25, 27, 29]

Η θεωρία στην οποία στηρίχτηκε αυτή η μελέτη έχει σχέση με ένα απλό σφιγγολιπίδιο, που ονομάζεται κεραμίδιο (ceramide). Το κεραμίδιο (Εικόνα 5) αν και παλιότερα θεωρούταν ένα απλό δομικό συστατικό της κυτταρικής μεμβράνης, την τελευταία δεκαετία έχει αποδειχθεί ότι έχει ρυθμιστικές ιδιότητες σε πολλές βιολογικές διαδικασίες, όπως είναι η διαφοροποίηση, ο πολλαπλασιασμός και ο κυτταρικός θάνατος [23, 24, 25, 26, 27, 28, 29]. Πολλές βιβλιογραφικές αναφορές του κεραμιδίου, το παρουσιάζουν σαν βασικό μόριο ρύθμισης της αυτοφαγίας. Επιπροσθέτως υπάρχουν αναφορές, οι οποίες υποστηρίζουν ότι η συγκέντρωσή του κεραμιδίου, αυξάνεται κατά την χημειοθεραπεία διαφόρων ειδών καρκίνου, αλλά και ότι διαταραχές στον μηχανισμό παραγωγής του, προσδίδουν ανθεκτικότητα στα καρκινικά κύτταρα κατά την αντικαρκινική θεραπεία [19, 21]. Όλες αυτές οι πληροφορίες οδήγησαν στην ανάπτυξη της θεωρίας, ότι το κεραμίδιο παίζει κάποιο ρόλο σε αυτό το μονοπάτι κυτταρικού θανάτου.

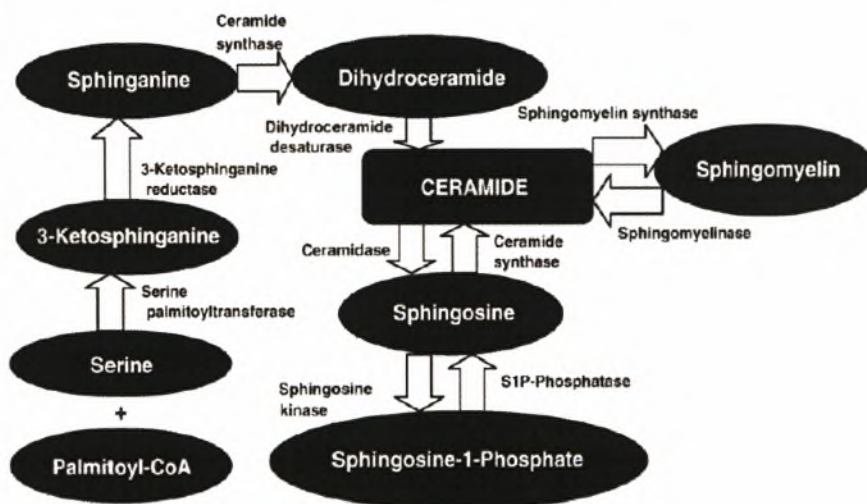
Ο σκοπός αυτής της μελέτης, λοιπόν είναι, η διερεύνηση του ρόλου του κεραμιδίου στο μονοπάτι πρόκλησης του κυτταρικού θανάτου των γλοιωματικών κυττάρων, μέσω της αυτοφαγίας, το οποίο ενεργοποιείται από εκκρινόμενους από τα διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα, παράγοντες. Η μελέτη αυτή χωρίζεται σε τέσσερα κύρια μέρη (Εικόνα 6).



Εικόνα 6. Τα βασικά μέρη της μελέτης.

Αρχικά ερευνήθηκε η τοξικότητα του κεραμιδίου στα γλοιοματικά κύτταρα και στα αστροκύτταρα, καθώς και η σχέση του με την αυτοφαγία και τη δράση της καθεψίνης D. Στη συνέχεια μελετήθηκαν τα επίπεδα του κεραμιδίου κατά τη διάρκεια της θεραπείας των γλοιοματικών κυττάρων με SN, αλλά και το μονοπάτι, που ευθύνεται για τα επίπεδα αυτά.

Σε αυτό το σημείο, θα πρέπει να αναφερθεί ότι το κεραμίδιο συντίθεται μέσω δύο μονοπατιών (Εικόνα 7), της *de novo* σύνθεσης και της σύνθεσης από την σφιγγομυελίνη, με την βοήθεια των σφιγγομυελινασών (SMases).



Εικόνα 7. Τα μεταβολικά μονοπάτια παραγωγής του κεραμιδίου: Η *de novo* σύνθεση, και το μονοπάτι που χρησιμοποιεί την σφιγγομυελίνη, ως πρώτη ύλη για την παραγωγή του κεραμιδίου, με την βοήθεια σφιγγομυελινασών (*nSMase* και *aSMase*). [24, 25, 29]

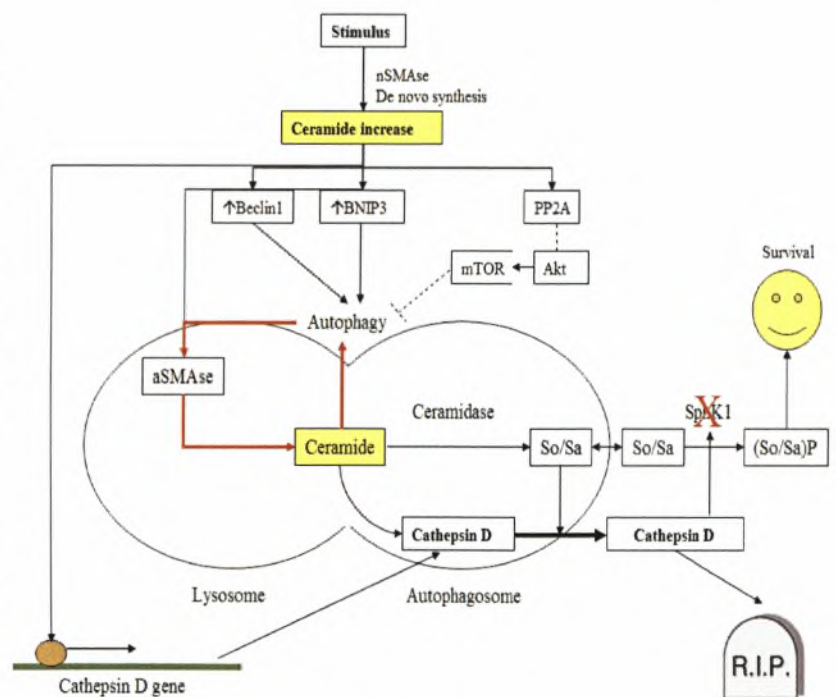
Η *de novo* σύνθεση, χρησιμοποιεί ως πρώτη ύλη τα σφιγγολιπίδια (Sa, So) [29], για την παραγωγή του κεραμιδίου. Τα ένζυμα που παίρνουν μέρος στη *de novo*

σύνθεση, είναι η παλμιτοΐλο-τρανσφεράση (palmitoyltransferase) της σερίνης, η οποία καταλύει την παραγωγή 3-κετοσφιγγανίνης από την σερίνη και το παλμιτοΐλο-CoA (palmitoyl-CoA). Η 3-κετοσφιγγανίνη μετατρέπεται σε σφιγγανίνη (Sa), η οποία με τη βοήθεια της συνθάσης του κεραμιδίου, μετατρέπεται σε δι-ύδρο-κεραμίδιο και μετά σε κεραμίδιο. Από την άλλη η SoP (Sphingosine-1-phosphate), μετατρέπεται σε σφιγγοσίνη (So), από την φωσφατάση S1P. Η σφιγγοσίνη οδηγεί στη παραγωγή του κεραμιδίου, από το ένζυμο συνθάση του κεραμιδίου (Εικόνα 7).

Η σύνθεση από τη σφιγγομυελίνη περιλαμβάνει τη δράση δύο σφιγγομυελινασών (SMases), οι οποίες εντοπίζονται σε διαφορετικά διαμερίσματα του κυττάρου και διακρίνονται από διαφορετικά γνωρίσματα. Τα ένζυμα αυτά είναι η όξινη (aSMase) και η ουδέτερη (nSMase) σφιγγομυελινάση. Η aSMase, εντοπίζεται στο εσωτερικό των λυσοσωμάτων και όπως είναι λογικό, είναι λειτουργική σε χαμηλό pH. Η nSMase λειτουργεί σε ουδέτερο pH και η λειτουργία της εξαρτάται από το  $Mg^{+2}$ . Η λειτουργία, αυτών των ενζύμων αυξάνεται κατά τη διάρκεια θεραπείας με αντικαρκινικά φάρμακα, μετά την ενεργοποίηση του υποδοχέα TNF (Tumor Necrosis Factor). αλλά και σε συνθήκες που προκαλούν οξειδωτικό stress [29].

Η συσχέτιση του κεραμιδίου με την αυτοφαγία [24,26,28,29] που παρατηρείται κατά τη θεραπεία με το SN εξαπλώθηκε και πείρε τη μορφή του θεωρητικού μοντέλου της εικόνας 8.

**Εικόνα 8.** Θεωρητικό μοντέλο λειτουργίας του μονοπατιού που διεγείρει το SN: Το σήμα διεγείρει την αύξηση του κεραμιδίου, η οποία προκαλεί την αύξηση παραγόντων της αυτοφαγίας. Το κεραμίδιο σε αυξημένα επίπεδα, διεγείρει την έκφραση της καθεψίνης D και την ενεργοποιεί, υποβοηθώντας στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου. [24, 26, 28, 29] (Ευγενική προσφορά του κ. Mora Rodrigo)



Πιο αναλυτικά θεωρείται ότι, τα διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα εκκρίνουν παράγοντες, οι οποίοι αλληλεπιδρούν με τα γλοιωματικά κύτταρα, πιθανώς μέσω κάποιου υποδοχέα. Με αυτό τον τρόπο μεταδίδεται ένα σήμα, το οποίο οδηγεί στην αύξηση της συγκέντρωσης του κεραμιδίου, μέσω της *de novo* σύνθεσης, ή του ενζύμου nSMase. Η αύξηση αυτή μπορεί να προκαλέσει την υπερέκφραση των Beclin 1 και BNIP3 [29], οι οποίοι και είναι γνωστοί θετικοί ρυθμιστές της αυτοφαγίας. Την ίδια στιγμή, η αυξημένη συγκέντρωση του κεραμιδίου, ενεργοποιεί τον καταστολέα της αντι-αποπτωτικής πρωτεΐνης Akt, μέσω της PP2A. Η καταστολή της Akt, δεν επιτρέπει την ενεργοποίηση του ενζύμου mTOR, το οποίο φυσιολογικά καταστέλλει την αυτοφαγία. Κατά την αυτοφαγία το λυσόσωμα συντήκεται με το αυτοφαγόσωμα και έτσι η παραγωγή του κεραμιδίου, αυξάνεται περισσότερο με την βοήθεια του ενζύμου aSMase, το οποίο εντοπίζεται φυσιολογικά στο λυσόσωμα, και κατά την σύντηξη αποκτά περισσότερο υπόστρωμα.

Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι το κεραμίδιο σε αυξημένα επίπεδα, διεγείρει την έκφραση της καθεψίνης D, η οποία υποβοηθά στη διαδικασία του κυτταρικού θανάτου, εφόσον καταστέλλει την πρωτεϊνική κινάση SphK1, που όταν βρίσκεται σε φυσιολογικά επίπεδα, φωσφορυλιώνει τα εξερχόμενα από το αυτοφαγόσωμα, σφιγγολιπίδια Sa και So, παρεμποδίζοντας έτσι τον κυτταρικό θάνατο (Τα σφιγγολιπίδια αυτά, έχει παρατηρηθεί ότι πολλές φορές δρουν επάγοντας τον σχηματισμό οξικών κυστιδίων) [29]. Επιπλέον το κεραμίδιο, προκαλεί την υπερέκφραση της καθεψίνης D, αλλά αλληλεπιδρά και απευθείας με αυτή, προάγοντας την ωρίμανση της και έτσι την ενεργοποίησή της.

### Υλικά και μέθοδοι:

Υλικά: Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 1.

Υλικά	Εταιρίες προμήθειας
Κύτταρα SMA 560 MT 539 από VM/Dk ποντίκια	Φιλική προσφορά
DMEM (medium)	Sigma
FCS (fetal calf serum)	Invitrogen
Τρυψίνη-EDTA	Invitrogen
LPS , IFN $\gamma$	Sigma
Acridine Orange (AO), TO-PRO	CALBIOCHEM
FITC	SIGMA
Lysotracker Red	Προσφορά του A. Marchini
Beads	BD
DMSO	SIGMA
Ανάλογο C2 του Κεραμιδίου (N-Ακετυλ-D-σφιγγοσίνη)	SIGMA
3-Μεθυλαδεσίνη (3MA)	SIGMA
Pepstatine A	CALBIOCHEM
Αντι-ceramide αντισώματα MID 15B4	ALEXIS
PD-10 στήλη	SIGMA
Ειδικών στήλες zeba desalt spin 89893	SIGMA
PBS Saponin 0,1%	SIGMA
Φυσιολογικός ορός ποντικού (NMS)	SIGMA
PBS-BSA Saponin 0,1%	SIGMA
Myriocin, Fumonisin FB1, Desipramine, και N-Acetyl-L-cysteine (NAC)	SIGMA
GW4869	CALBIOCHEM
3-O-Methylsphingomyelin (MEM)	BIOMOL
Amplex Red SMase Assay Kit	Invitrogen

Πίνακας 1

## Μέθοδοι:

### 1. Καλλιέργεια κυττάρων.

Τα καρκινικά γλοιακά κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν αναπτύσσονται αυθόρμητα σε VM/Dk ποντίκια και ανήκουν στη σειρά SMA 560 (Spontaneous Murine Astrocytoma), επίσης χρησιμοποιήθηκαν και κύτταρα MT 539 (Mouse glioma cells), τα οποία παρασκευάζονται τεχνικά [7,8]. Εξαιτίας της φυσικής καταγωγής τους, τα SMA κύτταρα πολλαπλασιάζονται με αυξημένους ρυθμούς, με αποτέλεσμα ο χρόνος αντίδρασης τους στις θεραπείες, να είναι μικρότερος από αυτόν που χαρακτηρίζει τα MT κύτταρα, τα οποία φαίνονται πιο ανθεκτικά. Για αυτό το λόγο, οι θεραπείες των MT κυττάρων έχουν, συνήθως, μεγαλύτερους χρόνους επώασης.

Τα αστροκύτταρα και τα μικρογλοιακά κύτταρα απομονώθηκαν από τους εγκεφάλους BALB/c ποντικών, δύο ημέρες μετά την γέννηση τους [1,2,3]. Τα αστροκύτταρα διαχωρίζονται από τα μικρογλοιακά κύτταρα μετά από καλλιέργεια 12 ημερών σε τριβλία των 12cm (Sarsterdt, Γερμανία), έτσι ώστε τα μικρογλοιακά κύτταρα να προσκολληθούν στο τριβλίο, ενώ τα αστροκύτταρα παραμένουν ελεύθερα στο θρεπτικό υλικό και στη συνέχεια μεταφέρονται σε διαφορετικά τριβλία. Η καθαρότητα της καλλιέργειας διαπιστώνεται μέσω Western blot ανάλυσης [3] και φτάνει το 90-95 %. Γενικά τα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν 2 εβδομάδες μετά τον διαχωρισμό τους.

Όλα τα κύτταρα διατηρούνται σε καλλιέργεια με cDMEM, το οποίο αποτελείται από DMEM (Pen- Strep. 1% ή Gentamycin 50μg/ml, Glutamine 1% 2mM) και 10% FCS (fetal calf serum). Για την διαχείριση των κυττάρων επίσης χρησιμοποιήθηκε το διάλυμα Τρυψίνη-EDTA, το οποίο αποτελείται από 0,05% ή 0,25% τρυψίνη και 0.02% ή 0.04% EDTA, αντίστοιχα. Οι καλλιέργειες των κυττάρων κατά την διάρκεια των πειραμάτων πραγματοποιήθηκαν σε plates των 6, 12 και 96 πηγαδιών.

### 2. Διέγερση μικρογλοιακών κυττάρων.

Τα μικρογλοιακά κύτταρα διεγείρονται με την εναλλαγή τριών διαλυμάτων, του διαλύματος LPS 0,1μg/ml, του διαλύματος IFN $\gamma$  33 ng/ml (και τα δύο σε serum free DMEM) και τέλος του διαλύματος serum free DMEM. Μετά από 48 ώρες επώαση, φυγοκεντρούμε και παίρνουμε το υπερκείμενο (SNLI). Στα πειράματα επίσης χρησιμοποιήθηκαν τα υπερκείμενα, SN $_0$  και SNL τα οποία παράγονται όμοια με

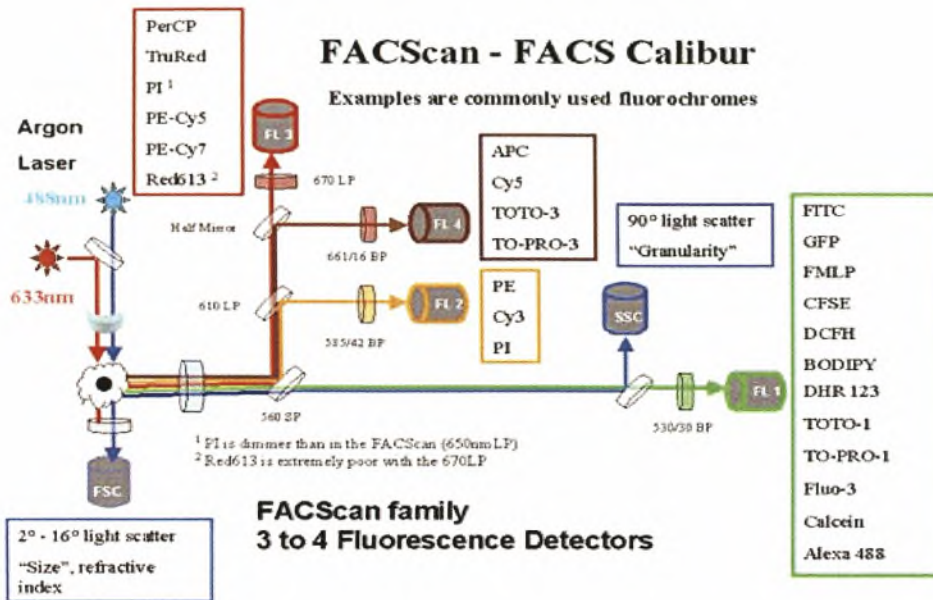
το SNLI, με μόνη διαφορά την έλλειψη διέγερσης από LPS και IFN $\gamma$  στο πρώτο και την έλλειψη διέγερσης από IFN $\gamma$  στο δεύτερο, όπως άλλωστε δηλώνει και το όνομά τους. Τα διαλύματα αυτά μπορούν να διατηρηθούν άψογα στους  $-20^{\circ}\text{C}$ . Αξιοσημείωτη είναι η παρατήρηση προηγούμενων ερευνών, ότι το SNLI παρουσιάζει μεγαλύτερη τοξικότητα, από το SNL και για αυτό το λόγο το SNL, χρησιμοποιείται σε συμπυκνωμένη κατά 4 φορές, μορφή (SNL4x), ενώ όταν κρίνεται απαραίτητο προστίθεται και ποσότητα IFN $\gamma$  (0,011ng/ml), για την περαιτέρω ενίσχυση της τοξικότητας (SNL4x + I).

### 3. Κυτταρομετρία ροής (Flow Cytometry).

Κυτταρομετρία ροής ονομάζεται η τεχνική, η οποία χρησιμοποιείται για την καταμέτρηση, εξέταση και ταξινόμηση, μικροσκοπικών σωματιδίων, διαλυμένων σε ένα υγρό, που ρέει. Η τεχνική αυτή επιτρέπει την πολύ-παραμετρική ανάλυση των φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών κάθε κυττάρου, μέσα σε υγρό που ρέει ανάμεσα από laser και οπτικούς ή ηλεκτρονικούς ανιχνευτές. Η κυτταρομετρία ροής, είναι η βασική μέθοδος που χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα. Με την χρήση των χρωστικών, Acridine Orange (AO) (για DNA και Οξικά Κυστίδια), Lysotracker Red (για λυσοσώματα), TO-PRO (για DNA κυττάρων με ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης) και FITC (προσδεμένο σε αντίσωμα για το κεραμίδιο), χρωματίστηκαν και καταμετρήθηκαν, διάφορα υπο-κυτταρικά σωματίδια και μόρια σε ζωντανά και νεκρά κύτταρα.

Η αρχή της μεθόδου βασίζεται στη στόχευση μιας εστιασμένης, υδροδυναμικής ροής ενός υγρού, με μία μονοχρωματική ακτίνα φωτός (laser), η οποία στη συνέχεια προσλαμβάνεται και αναλύεται από έναν αριθμός από ανιχνευτές. Ένας από τους ανιχνευτές βρίσκεται απέναντι από τη πηγή του laser (Forward Scatter ή FSC), ενώ οι υπόλοιποι βρίσκονται κάθετα σε αυτή [Side Scatter (SSC) και ένας ή περισσότεροι ανιχνευτές φθορισμού (FL)]. Κάθε σωματίδιο που διέρχεται από το laser αντανακλά την ακτινοβολία με διαφορετικό τρόπο, ενώ την ίδια στιγμή ειδικές χρωστικές παράγουν φθορισμό, ο οποίος ανιχνεύεται σε χαμηλότερη συχνότητα. Ο συνδυασμός την ανακλώμενης ακτινοβολίας και αυτής του φθορισμού, προσλαμβάνεται από τους ανιχνευτές και αναλύεται, δίνοντας πληροφορίες για την χημεία και την φύση του κάθε σωματιδίου, που αποτελεί το δείγμα. Ο FSC δίνει πληροφορίες για την συγκέντρωση και το μέγεθος των κυττάρων και ο SSC για την ενδοκυττάρια πολυπλοκότητα, ενώ οι

ανιχνευτές φθορισμού (FL1-6), εντοπίζουν τα σωματίδια που έχουν σημανθεί με χρωστικές, οι οποίες φθορίζουν (Εικόνα 9).



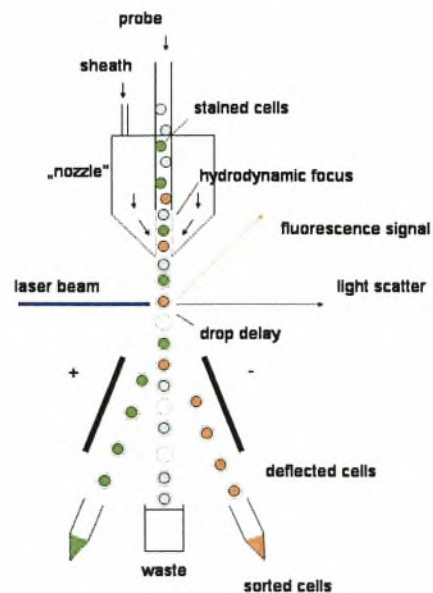
Εικόνα 9. Η βάση της λειτουργίας της κυτταρομετρίας ροής FACs: Κάθε κύτταρο του δείγματος, συναντά την ακτίνα laser, η ακτινοβολία διαπερνά το κύτταρο και προσλαμβάνεται από τους ανιχνευτές FCS, SSD και FL1-4, δίνοντας πληροφορίες για την συγκέντρωση, το μέγεθος και την ενδοκυττάρια πολυπλοκότητα των κυττάρων. Στους πίνακες παρουσιάζονται πολλές χρωστικές, που μπορούν να καταμετρηθούν από κάθε ανιχνευτή.

FACs (Fluorescence Activated Cell sorter).

Η τεχνική FACs είναι ένα είδος της κυτταρομετρίας ροής, η οποία μπορεί να προσφέρει επιπλέον και την δυνατότητα διαχωρισμού διαφορετικών ειδών κυττάρων μέσα στο δείγμα, με την βοήθεια της εφαρμογής τάσης. Η ηλεκτρική τάση διαχωρίζει τα κύτταρα ανάλογα με το διαφορετικό φορτίο τους και στη συνέχεια τα κύτταρα αυτά τοποθετούνται σε διαφορετικά δοχεία (Εικόνα 10).



**Εικόνα 10.** Η βάση της λειτουργίας της τεχνικής FACs: Μετά από την ανάλυση τα κύτταρα διέρχονται ανάμεσα από εφαρμοσμένη τάση, με αποτέλεσμα την εκτροπή των διαφορετικών κυττάρων από την πορεία τους και την κατάληξη τους σε διαφορετικά δοχεία, ανάλογα με το φορτίο του κάθε κυττάρου.

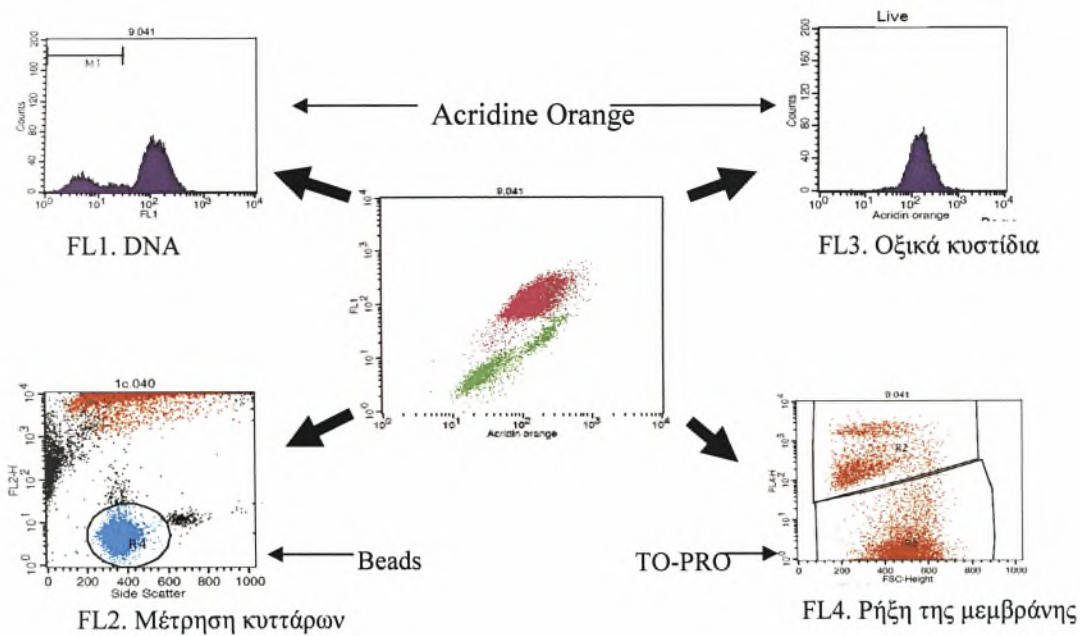


Στα πειράματα χρησιμοποιήθηκε η τεχνική FACs με διπλή χρώση, δηλαδή η ανάλυση έγινε μετά από την χρήση δύο χρωστικών. Η προετοιμασία των δειγμάτων γίνεται αρχικά με την προσθήκη 0.5 ή 1μl Acridine Orange (ή Lysotracker Red) (5μM και 0.5μM) μέσα στη καλλιέργεια, ακολουθεί επώαση μίας ώρας στους 37°C. Στη συνέχεια λαμβάνουμε τα κύτταρα με την χρήση τρυψίνης και φυγοκεντρούμε στους 1200rpm για 5 λεπτά, έτσι ώστε να απομακρύνουμε την τρυψίνη μαζί με το υπερκείμενο. Στο ίζημα προσθέτεται 50μl beads stock, το οποίο παρασκευάζεται με την ανάμειξη 2 σταγόνων beads με 3 ml 1x PBS (140 mM NaCl, 10 mM Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-phosphate, pH 7,4). Τα bead είναι μικρές σφαίρες σιλικόνης, που καταμετρούνται κατά την ανάλυση FACs. Ο υπολογισμός του λόγου των ζωντανών κυττάρων προς τον αριθμό των beads, μας επιτρέπει την καλύτερη απεικόνιση των διαβαθμίσεων στον αριθμό των ζωντανών κυττάρων, αλλά και τη σύγκριση τους με το θετικό και αρνητικό control. Το ίζημα επαναδιαλύεται σε 1ml PBS και φιλτράρεται, μέσα σε ειδικούς για ανάλυσης FACs, σωλήνες falcon. Τα δείγματα παραμένουν στον πάγο και πριν την ανάλυση προστίθενται 0,5μl χρώσης TO-PRO (1μM).

Η χρώση Acridine Orange, βάφει τα οξικά κυστίδια και το DNA το οποίο βρίσκεται στο εξωτερικό, αλλά και στο εσωτερικό του κυττάρου, εφόσον μπορεί να διαπεράσει την κυτταρική μεμβράνη. Η TO-PRO στοχεύει επίσης το DNA, με τη διαφορά ότι η διαπερατότητα της είναι πολύ μικρότερη. Η χρώση TO-PRO δεν επωάζεται για πολύ, έτσι ώστε να βάψει μόνο το DNA κυττάρων με ρήξη της κυτταρικής μεμβράνης, με αποτέλεσμα τον διαχωρισμό τους από τα ζωντανά κύτταρα. Τα δείγματα είναι απαραίτητο να φιλτράρονται και να παραμένουν σε πάγο, για να αποφευχθούν τα συσσωματώματα των κυττάρων, εφόσον η

ανάλυση με την τεχνική FACs απαιτεί την προσέλευση του δείγματος από την βελόνα του αναλυτή FACs, αλλά και τον διαχωρισμό του σε πολύ μικρά σταγονίδια. Τα συσσωματώματα είναι πιθανών να μπλοκάρουν τη βελόνα, αλλά και να επηρεάσουν τις μετρήσεις, εφόσον η μέτρηση γίνεται για κάθε κύτταρο ξεχωριστά. Όλες οι μετρήσεις σταμάτησαν στα 10000 γεγονότα (ζωντανά κύτταρα), με εξαίρεση τα δείγματα που περιείχαν λιγότερα από 10000 ζωντανά κύτταρα.

Συμπερασματικά με την τεχνική FACs μετράται το συνολικό ποσοστό του DNA και τα οξικά κυστίδια, με την χρώση Acridine Orange, εξάγοντας έτσι συμπεράσματα για το στάδιο του κυτταρικού θανάτου που βρίσκεται το κάθε κύτταρο. Επιπροσθέτως είναι δυνατή η καταμέτρηση των νεκρών κυττάρων με την βοήθεια της χρωστικής TO-PRO, αλλά και η σύγκριση της περιεκτικότητας σε ζωντανά και μη κύτταρα, με τον υπολογισμό του λόγου των ζωντανών κυττάρων προς τα beads σε κάθε δείγμα. Οι παραπάνω παράμετροι καταμετρώνται, από τους ανιχνευτές φθορισμού FL1-4, όπως φαίνεται στην εικόνα 11, αλλά την ίδια στιγμή προσδιορίζεται και το μέγεθος του κάθε κυττάρου, από τον ανιχνευτή FSD, καθώς και η ενδοκυτταρική πολυπλοκότητα τους, από τον SSD.



**Εικόνα 11.** Απεικόνιση παραμέτρων ανάλυσης κατά τη διάρκεια της τεχνικής FACs: Στον ανιχνευτή FL1 φαίνεται η περιεκτικότητα σε DNA και στον FL3 τα οξικά κυστίδια, με τη χρώση AO. Ο ανιχνευτής FL4 ξεχωρίζει τα νεκρά από τα ζωντανά κύτταρα, με τη χρώση TO-PRO. Στον FL2, φαίνεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων, με την βοήθεια beads. (Ευγενής προσφορά του κ. Mora Rodrigo)

Το παραπάνω πρωτόκολλο, χρησιμοποιήθηκε τις περισσότερες φορές, με εξαίρεση το πείραμα προσδιορισμού των επιπέδων παραγωγής του κεραμιδίου, όπου χρησιμοποιήθηκε επιπροσθέτως και η χρώση με το αντίσωμα, το οποίο ήταν σημασμένο με τη χρωστική FITC. Το πρωτόκολλο αυτού του πειράματος θα αναλυθεί παρακάτω. Τα αποτελέσματα που δίνουν οι αναλύσεις FACs, επεξεργάζονται και παρουσιάζονται με τη μορφή διαγραμμάτων.

#### 4. Διερεύνηση της τοξικότητας του κεραμιδίου και του SNLI.

Διαλύματα σε DMSO, του αναλόγου C2 του κεραμιδίου, ονόματος N-Ακετυλ-D-σφιγγοσίνη, χρησιμοποιήθηκαν για να διαπιστωθεί η τοξικότητα του κεραμιδίου σε γλοιωματικά κύτταρα και σε αστροκύτταρα. Το ανάλογο αυτό φαίνεται να παρουσιάζει την ίδια δράση με το κεραμίδιο, ενώ επιπροσθέτως έχει αναφερθεί ότι αυξάνει και την ενδογενή παραγωγή του [5,6,19]. Το ανάλογο C2 χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα πειράματα, γιατί το ίδιο το κεραμίδιο δεν μπορεί να διαπεράσει τη κυτταρική μεμβράνη. Πιο συγκεκριμένα, δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις από 20-50  $\mu\text{M}$  του αναλόγου C2, σε αστροκύτταρα και γλοιωματικά κύτταρα (MT539 και SMA560), με διαφορετικούς χρόνους επώασης (24, 48 και 72 ώρες) σε καλλιέργεια DMEM 5% (5% περιεκτικότητα σε FCS). Σε όλα τα πειράματα υπήρχε ένα αρνητικό control χωρίς C2 κεραμίδιο, καθώς και ένα δείγμα σε SNLI, για συγκριτικούς λόγους.

#### 5. Καταστολή της αυτοφαγίας και της παραγωγής της καθεψίνης D.

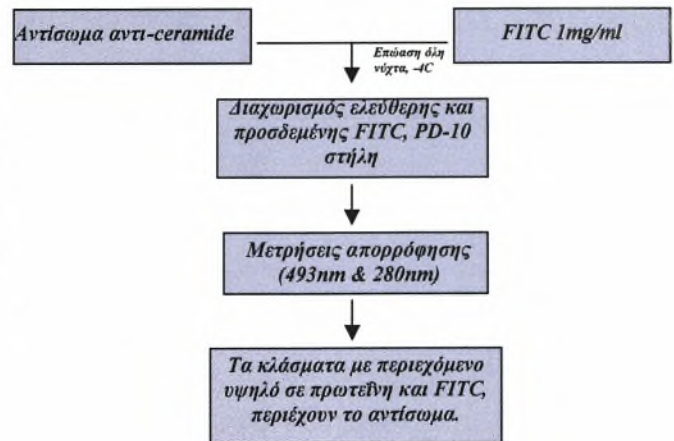
Για την διερεύνηση της αλληλεπίδρασης του κεραμιδίου με την αυτοφαγία και την παραγωγή της καθεψίνης D, χρησιμοποιήθηκαν δύο καταστολείς. Ο καταστολέας της αυτοφαγίας ονομάζεται 3MA (2 $\mu\text{M}$  και 0,5 $\mu\text{M}$ ), ο οποίος έχει αποδειχθεί ότι παρεμποδίζει την λυσοσωμική αποικοδόμηση των πρωτεϊνών και επομένως την αυτοφαγία [18]. Ο καταστολέας της καθεψίνης D, και επομένως της απόπτωσης, ο οποίος χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα πειράματα, ονομάζεται Pepstatine A (50 $\mu\text{M}$ , 45 $\mu\text{M}$  και 10 $\mu\text{M}$ ). Ο Pepstatine A, δρα καταστέλλοντας άμεσα το ένζυμο ασπαραγική πρωτεάση, το οποίο βοηθά στη ωρίμανση και ενεργοποίηση της καθεψίνης D, μέσω της πρωτεόλυσής της [13, 18, 22]. Οι δύο αυτοί καταστολείς χρησιμοποιήθηκαν μόνοι τους και σε συνδυασμό μεταξύ τους, αλλά και με το ανάλογο C2, για να διαπιστωθεί αν η δράση του κεραμιδίου σχετίζεται με την αυτοφαγία, ή την απόπτωση. Τα διαλύματα του καθενός

έγιναν σε DMSO για τον Pepstatine A και σε νερό για τον 3MA και τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε καλλιέργειες γλοιοματικών κυττάρων των κυτταρικών σειρών MT539 και SMA560 σε διαφορετικούς χρόνους επώασης (24, 48 και 72 ώρες).

#### 6. Προσδιορισμός των επιπέδων του κεραμιδίου στο κύτταρο.

Ο προσδιορισμός αυτός πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια της τεχνικής FACs σε συνδυασμό με τη χρήση της σήμανσης του κεραμιδίου, από αντισώματα σημασμένα με τη χρώση FITC. Αρχικά παρασκευάστηκαν τα αντισώματα, σημαίνοντας το αντίσωμα MID 15B4, με την χρώση FITC. Πιο συγκεκριμένα 1ml αντισώματος, επώασθηκε όλη τη νύχτα, με ταυτόχρονη ανάδευση, σε διάλυμα FITC 1mg/ml σε DMSO. Ακολούθησε ο διαχωρισμός του ελεύθερου από το προσδεμένο με FITC αντίσωμα, με την βοήθεια της υγρής χρωματογραφίας και τη χρήση της στήλης PD-10. Για την υγρή φάση, χρησιμοποιήθηκαν 20 ml PBS και συλλέχτηκαν κλάσματα των 250μl. Τέλος η μέτρηση της απορρόφησης στα 493nm (για την χρώση FITC) και 280nm (για το αντίσωμα) των κλασμάτων, έδειξαν πια από αυτά περιείχαν το αντίσωμα που είναι προσδεμένο με τη χρώση FITC (Εικόνα 12).

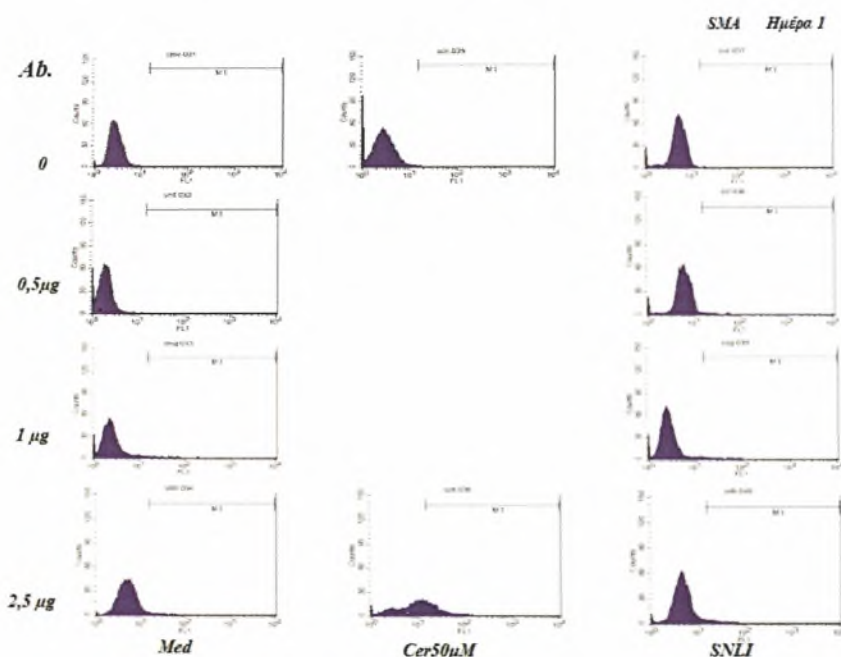
**Εικόνα 12.** Η προετοιμασίας του αντισώματος για την χρώση του κεραμιδίου: Το αντίσωμα επώαζεται με τη χρώση FITC. Μετά από υγρή χρωματογραφία, ακολούθησε η μέτρηση της απορρόφησης των δειγμάτων, για τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας τους σε σημασμένο αντίσωμα.



Ακολούθησε η αλλαγή του διαλύματος στο οποίο βρίσκεται το αντίσωμα, έτσι ώστε η αποθήκευσή του να είναι δυνατή. Η αλλαγή αυτή έγινε με την χρήση των ειδικών στηλών zeba desalt spin 89893 των 10ml, οι οποίες φυγοκεντρήθηκαν στα 1000g για 2min. Οι πλύσεις έγιναν 3 φορές με 5 ml PBS και στη συνέχεια στο δείγμα προστέθηκε 2,7 ml διαλύματος BSA 0,1% και NaN<sub>3</sub> 0,09%. Η επανάληψη της μέτρησης της απορρόφησης στα 493 και 280nm, βοήθησαν στον υπολογισμό της συγκέντρωσης του αντισώματος στο δείγμα, η οποία ήταν 0,0379 ug/ml.

Η πειραματική χρήση του αντισώματος ήταν δυνατή, μετά την δοκιμή της μεθόδου, η οποία έγινε με τη χρήση τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων του αντισώματος (0,5 , 1 και 2,5  $\mu\text{g}$ ) σε δείγματα γλοιωματικών κυττάρων (MT και SMA) τα οποία είχαν επωαστεί σε medium 5%, SNLI και C2 κεραμίδιο 50 $\mu\text{l}$  για 24 ώρες. Τα δείγματα χωρίστηκαν σε ομάδες φιξαρισμένων και μη κυττάρων, έτσι ώστε το αντίσωμα να μπορεί να εισέλθει στο εσωτερικό των κυττάρων, μέσω των πόρων που σχηματίζει το φιξάρισμα, αλλά και να μπορεί να υπολογιστεί η πρόσδεση στο κεραμίδιο που φυσιολογικά βρίσκεται στη κυτταρική μεμβράνη. Τα κύτταρα φιξαρίστηκαν με την επώαση σε 1ml PFA 3,7% (paraformaldehyde, PBS, NaOH pH 7,5) για 30min στους 4°C, στο σκοτάδι. Στη συνέχεια το PFA αφαιρέθηκε από τα δείγματα, με την προσθήκη 1ml PBS Saponin 0,1% και τη φυγοκέντρηση στα 1200rpm για 10min, στους 4°C. Για την χρήση του αντισώματος, αρχικά τα δείγματα επώασθηκαν σε 25 $\mu\text{l}$  φυσιολογικό ορό ποντικού (NMS) (για την αποφυγή, μη ειδικής πρόσδεσης του αντισώματος), για 15min σε θερμοκρασία δωματίου. Έπειτα προστέθηκαν 10 $\mu\text{l}$  αντισώματος, και ακολούθησε επώαση 45min, στο σκοτάδι και σε θερμοκρασία 4°C. Μετά από 2 πλύσεις με 1ml διαλύματος PBS-BSA Saponin 0,1% και φυγοκέντρηση στα 1200rpm για 5min, τα δείγματα επανα-διαλύθηκαν σε 500 $\mu\text{l}$  PBS και η διαδικασία συνεχίστηκε ομοίως με αυτή της προετοιμασίας των δειγμάτων για ανάλυση FACs, διπλής χρώσης. Οι χρωστικές που χρησιμοποιήθηκαν, αυτή τη φορά, ήταν το αντι-ceramide/FITC αντίσωμα για τη σήμανση του κεραμιδίου και το TO-PRO, για την σήμανση των νεκρών κυττάρων (μόνο στα δείγματα που δεν είχαν φιξαριστεί, διότι η χρώση θα έβαφε και τα ζωντανά κύτταρα στα φιξαρισμένα κύτταρα, εξαιτίας των πόρων που δημιουργούνται).

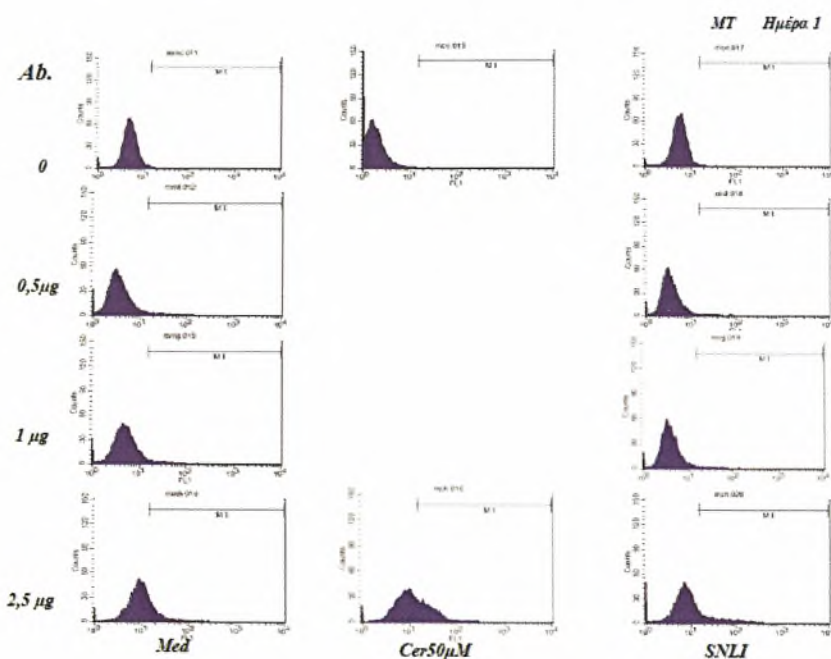
Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατά την ανάλυση FACs, σε φιξαρισμένα γλοιωματικά κύτταρα των κυτταρικών σειρών SMA και MT (Εικόνα 13, 14). Τα αποτελέσματα από τα μη φιξαρισμένα κύτταρα δεν απεικονίζονται, διότι η πρόσδεση του αντισώματος που παρατηρήθηκε στο κεραμίδιο της κυτταρικής μεμβράνης, ήταν πολύ μικρή και θεωρείται αμελητέα. Στα αποτελέσματα της δοκιμής του αντισώματος στα κύτταρα SMA, παρατηρούμε στη πρώτη στήλη, το σήμα που έδωσε το αντίσωμα στις διάφορες συγκεντρώσεις του στο δείγμα των κυττάρων, τα οποία επώασθηκαν σε medium 5%, για 24 ώρες.



**Εικόνα 13.** Απεικόνιση μετρήσεων της ανάλυσης FACs, για την δοκιμή του αντισώματος αντι-ceramide (0,5 , 1 και 2,5μg), σε φιξαρισμένα γλοιωματικά κύτταρα της σειράς SMA, μετά από επώαση 24 ωρών σε *medium* 5%, C2 50μl και SNLI.

Η πρώτη στήλη, λοιπόν αποτελεί το αρνητικό control, έτσι ώστε να παρατηρηθεί η πρόσδεση στο κεραμίδιο, που φυσιολογικά περιέχει ένα κύτταρο. Επιπρόσθετος ελέγχεται και αν η μεγαλύτερη συγκέντρωση του αντισώματος, παρουσιάζει και μη ειδική πρόσδεση. Στη δεύτερη στήλη φαίνεται το θετικό control, στο οποίο έχουμε μόνο την μηδενική και την μεγαλύτερη συγκέντρωση του αντισώματος. Το θετικό control, δείχνει το σήμα που θα παρατηρούνταν, εάν υπήρχε αύξηση στη συγκέντρωση του ενδοκυττάρου κεραμιδίου. Το σήμα οφείλεται στο ανάλογο C2, το οποίο αναγνωρίζεται από το αντίσωμα ως το φυσιολογικό κεραμίδιο. Το ανάλογο προκαλεί επίσης, την αύξηση του ενδογενούς κεραμιδίου, ενισχύοντας και άλλο το σήμα [29]. Η στήλη που παρουσιάζει το μεγαλύτερο ενδιαφέρον είναι η τρίτη, στην οποία φαίνεται η αύξηση του ενδογενούς κεραμιδίου, μετά από την 24ωρη επώαση στο SNLI.

Οι ίδιες παρατηρήσεις ισχύουν και για την κυτταρική σειρά MT. Οι παρατηρήσεις αυτές δεν αποδεικνύουν μόνο ότι το αντίσωμα και η χρώση, εντοπίζουν το κεραμίδιο και μπορούν να χρησιμοποιηθούν πειραματικά, αλλά και ότι παρατηρείται ενδογενής παραγωγή του κεραμιδίου, κατά την θεραπεία με το SN.

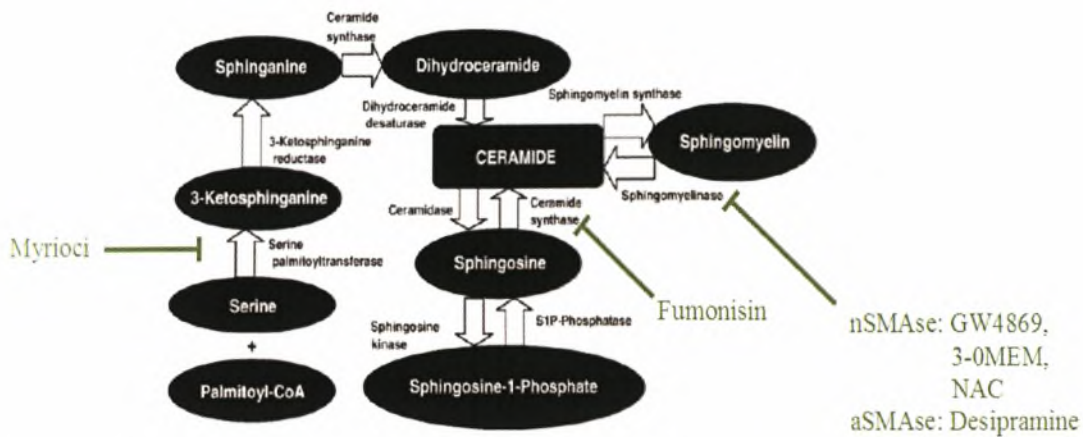


Εικόνα 14. Απεικόνιση μετρήσεων της ανάλυσης FACS, για την δοκιμή του αντισώματος αντι-ceramide (0,5 , 1 και 2,5µg), σε φιξαρισμένα γλοιωματικά κύτταρα της σειράς MT, μετά από επώαση 24 ωρών σε medium 5%, C2 50µl και SNLI.

## 7. Καταστολή της παραγωγής του κεραμιδίου.

Για την διερεύνηση του μονοπατιού παραγωγής του κεραμιδίου, το οποίο ενεργοποιείται κατά την έκθεση των καρκινικών γλοιικών κυττάρων (MT539 και SMA560) στο SNLI, SNL(4x) και SNL(4x)+I, χρησιμοποιήθηκαν συνολικά έξι καταστολείς, ο καθένας χρησιμοποιήθηκε ξεχωριστά από τον άλλο και είχε ως στόχο την καταστολή ενός από τα μονοπάτια παραγωγής. Οι καταστολείς που χρησιμοποιήθηκαν είναι οι Myriocin, Fumonisin FB1, Desipramine, GW4869, 3-O-Methylsphingomyelin (MEM) και N-Acetyl-L-cysteine (NAC). Όπως φαίνεται και στην εικόνα 15, ο κάθε καταστολέας στοχεύει την καταστολή ενός διαφορετικού ενζύμου.

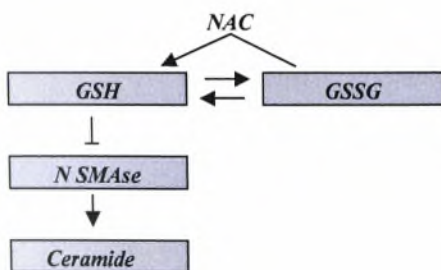
Η *de novo* σύνθεση του κεραμιδίου, στοχεύετε με τον καταστολέα Myriocin (10-1000nM) [29], που καταστέλλει το ένζυμο παλμιτοίλο-τρανσφεράση της σερίνης, καθώς και με τον καταστολέα Fumonisin FB1 (1-100µM), [13,14,29] ο οποίος στοχεύει με την σειρά του το ένζυμο συνθάση του κεραμιδίου.



**Εικόνα 15.** Η καταστολή του μονοπατιού παραγωγής του κεραμιδίου: Η de novo σύνθεση στοχεύεται από τον καταστολέα Myriocin και Fumonisin FB1. Η σύνθεση μέσω της σφιγγομυελίνης στοχεύεται με τους καταστολείς GW4869, 3-0 meth/myelin, NAC και Desipramine.

Οι δύο οδοί της σύνθεσης του κεραμιδίου από την σφιγγομυελίνη, στοχεύονται μέσω της καταστολής των ενζύμων nSMase και aSMase. Το πρώτο καταστέλλεται με μία σειρά από καταστολείς, οι οποίοι είναι ο GW4869 (2,5-10 μM) [16, 17], ο 3-0 MEM (10-60μM) [14] και ο έμμεσος καταστολέας NAC (1-25 mM) [15]. Τέλος το ένζυμο aSMase στοχεύεται με τον καταστολέα Desipramine (1-25 μM) [13].

Άξιος αναφοράς είναι ότι ο τρόπος λειτουργίας του καταστολέα NAC, ο οποίος βασίζεται στην καταστολή του ένζυμου nSMase, από τη γλουταθειόνη (GSH). Η GSH χαρακτηρίζεται από την αντι-οξειδωτική της λειτουργία, κατά την οποία η ανηγμένη της μορφή μετατρέπεται στην οξειδωμένη (GSSG) και αυτή ανάγεται πάλι μέσω του ένζυμου αναγωγάσης της γλουταθειόνης. Η αλλαγή της ισορροπίας αυτής της αντίδρασης, από τον καταστολέα NAC, οδηγεί στην υπερπαραγωγή της GSH και στη καταστολή της nSMase (Εικόνα 16) [15].



**Εικόνα 16.** Ο μηχανισμός της δράσης του καταστολέα NAC, ως έμμεσος καταστολέας της παραγωγής του κεραμιδίου από το ένζυμο nSMase.

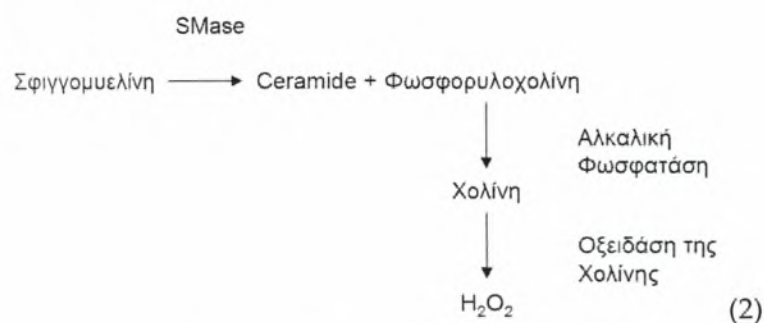


## 8. Amplex Red SMase Assay Kit.

Για να αποφευχθούν τα προβλήματα τοξικότητας των καταστολέων των ενζύμων SMase, ο προσδιορισμός της ενεργότητας τους, έγινε με τη τεχνική Amplex Red SMase Assay Kit. Πιο συγκεκριμένα, πρόκειται για μία ευαίσθητη τεχνική, η οποία προσδιορίζει την ενεργότητα των ενζύμων SMase, με τη βοήθεια της φθορισμομετρίας. Η αρχή της μεθόδου, βασίζεται στην ουσία 10-ακέτυλ-3,7-διυδροξυφenoξαζίνη (Amplex Red), η οποία αλληλεπιδρά, με στοιχειομετρία 1-1 με το  $H_2O_2$  παράγοντας το φθορίζον προϊόν resorufin (Αντίδραση 1).



Αρχικά η SMase παράγει κεραμίδιο και φωσφορυλοχολίνη. Η φωσφορυλοχολίνη υδρολύεται από την αλκαλική φωσφατάση, παράγοντας χολίνη, η οποία με την σειρά της, οξειδώνεται, από το ένζυμο, οξειδάση της χολίνης, παράγοντας  $H_2O_2$  (Αντίδραση 2).



Η παραγωγή του  $H_2O_2$ , ανιχνεύεται αφού αλληλεπιδράσει με την ουσία Amplex Red, με φθορισμομετρία στα 571-585nm. Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε εκχύλισμα γλοιωματικών κυττάρων (SMA, MT), τα οποία είχαν επωαστεί σε medium 5%, SNL+I, SNL4x και SNLI, για 24, 48 και 72 ώρες. Η διαδικασία διέφερε για τον προσδιορισμό των δύο διαφορετικών σφιγγομυελινασών στο pH του διαλύματος αντίδρασης, το οποίο είναι όξινο (pH 5) για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου aSMase και ουδέτερο (pH 7-8) για τον προσδιορισμό της ενεργότητας του ενζύμου nSMase. Το kit εμπεριέχει δύο θετικά control, το ένα με ποσότητα ενεργής SMase και το άλλο με ποσότητα  $H_2O_2$ , ενώ για αρνητικό control, χρησιμοποιούνται τα διαλύματα αντίδρασης. Μετά την εφαρμογή της μεθόδου, ο φθορισμός των δειγμάτων, καταμετρήθηκε κάθε 15 και 30 λεπτά, στους 37°C, για να προσδιοριστεί ο μέγιστη δραστηκότητα των ενζύμων (45min).

## Αποτελέσματα:

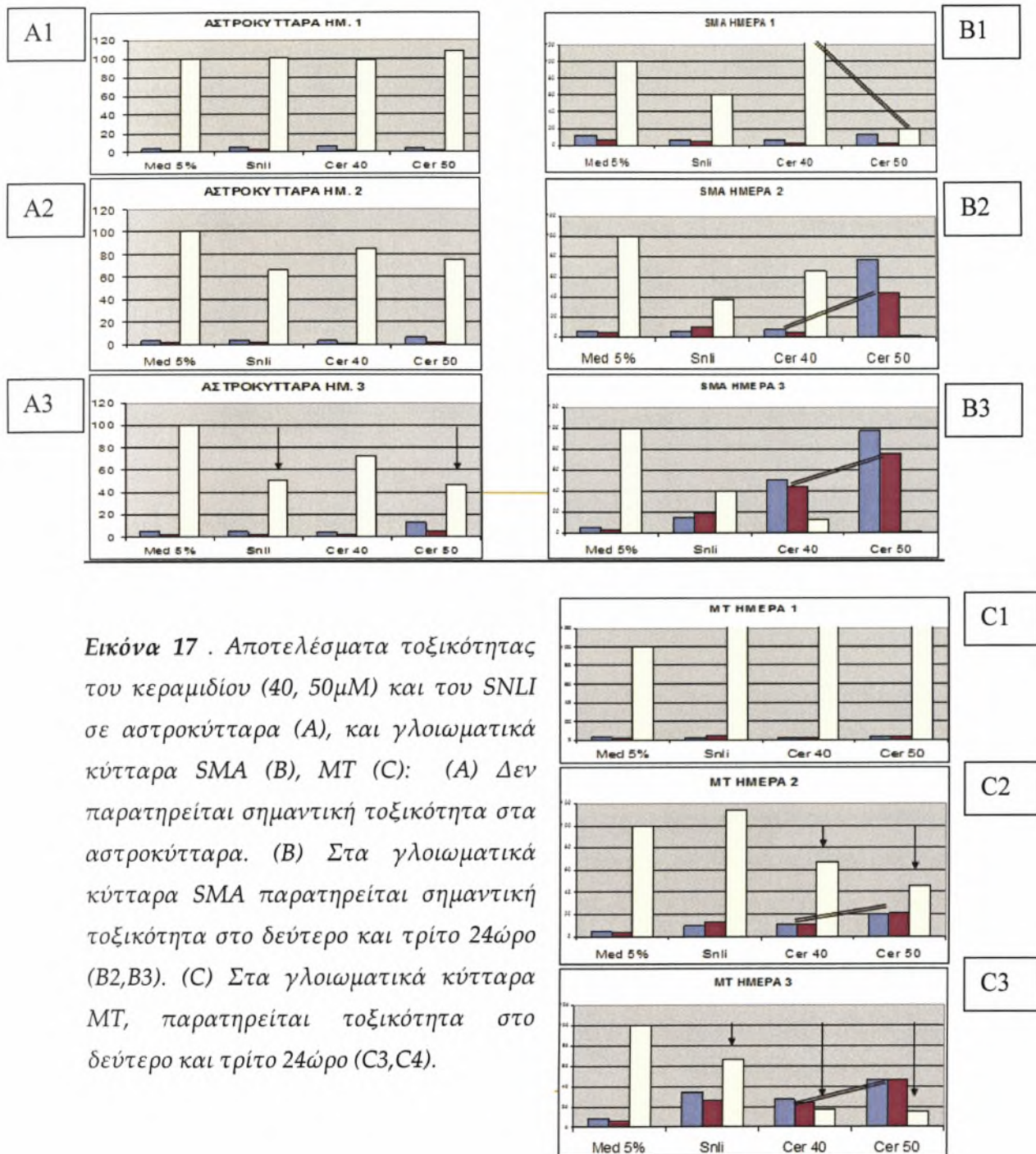
### 1. Διερεύνηση της τοξικότητας του κεραμιδίου σε σύγκριση με αυτή του SN, σε αστροκύτταρα και γλοιωματικά κύτταρα.

Αρχικά πρέπει να επιβεβαιωθεί ότι το κεραμίδιο, είναι τοξικό για τα γλοιωματικά κύτταρα (SMA, MT), αλλά όχι για τα φυσιολογικά αστροκύτταρα. Στα αποτελέσματα παρουσιάζονται μόνο οι συγκέντρωσης του κεραμιδίου 40 και 50μM, γιατί η τοξικότητα που παρουσιάζοταν στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις, δεν ήταν σημαντική. Αξιοσημείωτο είναι και το γεγονός ότι στα αποτελέσματα παρουσιάζονται τα ποσοστά των ζωντανών, νεκρών, αλλά και TO-PRO θετικών κυττάρων. Ο αριθμός των νεκρών, αλλά και των TO-PRO θετικών κυττάρων, αποτελούν δύο μορφές της τοξικότητας, εφόσον, η χρώση TO-PRO, βάφει μόνο το DNA των κυττάρων που έχουν υποστεί μεμβρανικοί ρήξη, δηλαδή που πρόκειται να πεθάνουν.

Όπως φαίνεται παρακάτω, στα αστροκύτταρα δεν παρατηρείται μεγάλη τοξικότητα, με μόνη εξαίρεση τις μετρήσεις στην εφαρμογή της μεγαλύτερης συγκέντρωσης του κεραμιδίου, κατά το τρίτο 24ωρο της θεραπείας (Εικόνα 17. A3), πράγμα λογικό για κάθε είδους κύτταρο που εκθέτεται σε τόσο υψηλή συγκέντρωση, για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η ελάττωση που παρατηρείται στον αριθμό των ζωντανών αστροκυττάρων, οφείλεται σε επίδρασης του SNLI, στην ικανότητα πολλαπλασιασμού των κυττάρων και όχι στον κυτταρικό θάνατο, εφόσον δε παρατηρείται αύξηση στον αριθμό των νεκρών, ή των TO-PRO θετικών, αστροκυττάρων.

Τα πράγματα αλλάζουν, όσο αναφορά τα γλοιωματικά κύτταρα (SMA, MT). Στην εικόνα 17. B φαίνεται η τοξικότητα στη κυτταρική σειρά SMA. Το πρώτο 24ωρο, δεν παρατηρείται τοξικότητα, αλλά παρατηρείται η ίδια μείωση στον πολλαπλασιασμό των κυττάρων, κατά την επώαση με το SNLI και το κεραμίδιο. Η παρατήρηση αυτή συνδέει το κεραμίδιο και με την ικανότητα του SNLI, να ελαττώνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των κυττάρων. Τη δεύτερη ημέρα παρατηρείται μεγάλη τοξικότητα του SNLI, αλλά και του κεραμιδίου, ανάλογη με τη συγκέντρωσή του. Αξιοσημείωτη είναι η τοξικότητα του κεραμιδίου με συγκέντρωση 50μM (17. B2), όπου δεν έχει απομείνει ανιχνεύσιμη ποσότητα ζωντανών κυττάρων.

- *IO-PRO+*
- *Έλλειμμα Dna*
- *% Ζωντανά Κύτταρα*



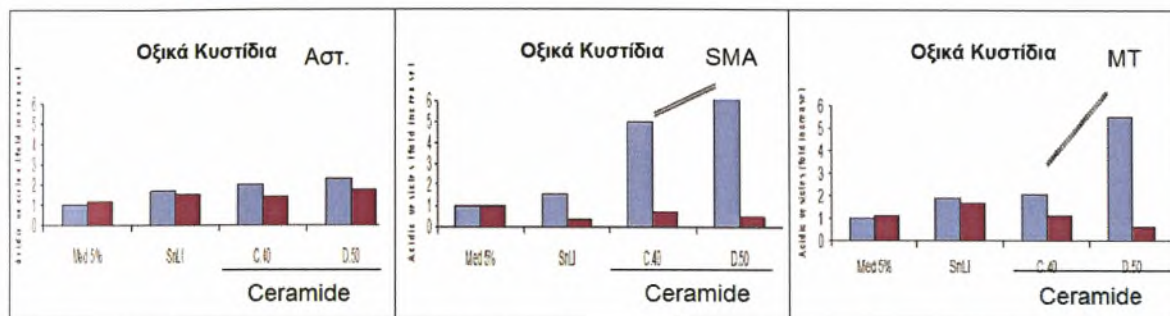
Εικόνα 17 . Αποτελέσματα τοξικότητας του κεραμιδίου (40, 50 $\mu$ M) και του SNLI σε αστροκύτταρα (A), και γλοιωματικά κύτταρα SMA (B), MT (C): (A) Δεν παρατηρείται σημαντική τοξικότητα στα αστροκύτταρα. (B) Στα γλοιωματικά κύτταρα SMA παρατηρείται σημαντική τοξικότητα στο δεύτερο και τρίτο 24ώρο (B2,B3). (C) Στα γλοιωματικά κύτταρα MT, παρατηρείται τοξικότητα στο δεύτερο και τρίτο 24ώρο (C3,C4).

Η κυτταρική σειρά MT, φαίνεται να αντιδρά πιο αργά και στο SNLI και στο κεραμίδιο, με αποτέλεσμα να εμφανίζεται μία μικρή τοξικότητα τη δεύτερη ημέρα (Εικόνα 17. C2), η οποία αυξάνεται κατά πολύ τη τρίτη ημέρα (17. C3). Την πρώτη ημέρα, βέβαια παρατηρήθηκε μία μεγάλη αύξηση των κυττάρων στο

SNLI, αλλά και στο κεραμίδιο, η οποία πρέπει να σχετίζεται με τις ιδιότητες ρύθμισης της αύξησης, που έχει το κεραμίδιο και μάλλον αποτελούν τη πρώτη αντίδραση των κυττάρων, σε αυτό. Το γεγονός αυτό, αποτελεί άλλη μία ένδειξη για την σχέση της παραγωγής του κεραμιδίου, κατά τη θεραπεία με το SNLI.

□ Ζωντανά Κύτταρα  
 ■ Νεκρά Κύτταρα

Ημέρα 3



A)

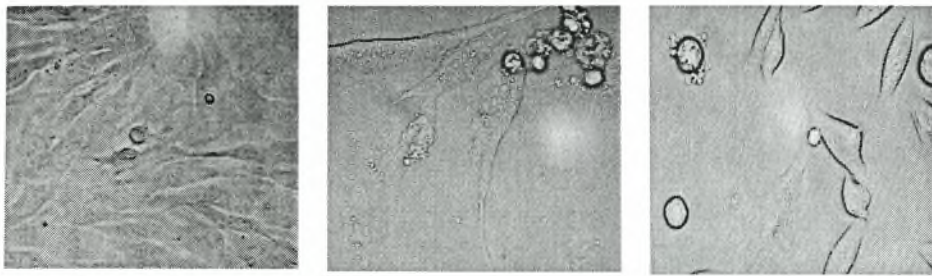
B)

C)

**Εικόνα 18.** Αποτελέσματα τοξικότητας του κεραμιδίου, με τον προσδιορισμό των οξικών κυστιδίων: Παρατηρείται αύξηση των οξικών κυστιδίων, σε ζωντανά και νεκρά κύτταρα, κατά την επώαση σε SNLI και κεραμίδιου (40, 50μM), για 72 ώρες.

Στην εικόνα 18, φαίνονται τα οξικά κυστίδια που καταμετρήθηκαν στα δείγματα των αστροκυττάρων και των γλοιωματικών κυττάρων (SMA και MT), κατά την επώαση τους σε SNLI και κεραμίδιο (40, 50μM), για 72 ώρες. Γενικά παρατηρείται αύξηση των οξικών κυστιδίων, σε ζωντανά και νεκρά κύτταρα. Η αύξηση των οξικών κυστιδίων, κατά την επώαση με το κεραμίδιο, είναι πολύ μεγάλη και ανάλογη με τη συγκέντρωση της. Η αύξηση των οξικών κυστιδίων, κατά την επώαση με το SNLI, είναι μικρότερη, αλλά ορατή. Άξια αναφοράς είναι η αύξηση των οξικών κυστιδίων που παρατηρείται και στα αστροκύτταρα, αλλά δεν είναι τόσο σημαντική, όσο οι αυξήσεις στις κυτταρικές σειρές, SMA και MT, γιατί τα ζωντανά αστροκύτταρα, όπως είδαμε και προηγουμένως, είναι περισσότερα από αυτά των SMA και MT (Εικόνα 17. A3, B3, C3).

Οι αυξήσεις των οξικών κυστιδίων, επαληθεύονται και μετά από μικροσκοπική παρατήρηση (Εικόνα 19). Το γεγονός ότι παρατηρείται εμφάνιση οξικών κυστιδίων, μετά τη θεραπεία των γλοιωματικών μας κυττάρων με SNLI, αλλά και με κεραμίδιο, επαληθεύει την αρχική θεωρία. Επομένως οι πιθανότητες να αυξάνεται η παραγωγή του κεραμιδίου, μετά την θεραπεία με το SN και η τοξικότητά του, να οφείλετε σε αυτή την αύξηση, είναι μεγάλες.



A) Med, ημέρα 1

B) SNLI, ημέρα 3

Γ)Κεραμ.25μM,ημέρα1

**Εικόνα 19.** (A, B, Γ) MT γλοιοματικά κύτταρα μετά από επώαση τους σε medium 5%, SNLI και κεραμίδιο 25μM, αντίστοιχα. Στο A και Γ, η επώαση διάρκεσε 24 ώρες, ενώ στο B 72. Είναι ορατή η εμφάνιση οξικών κυστιδίων στις εικόνες B και Γ.

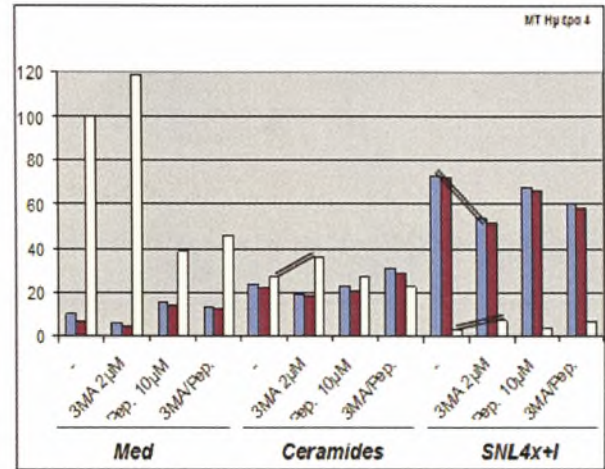
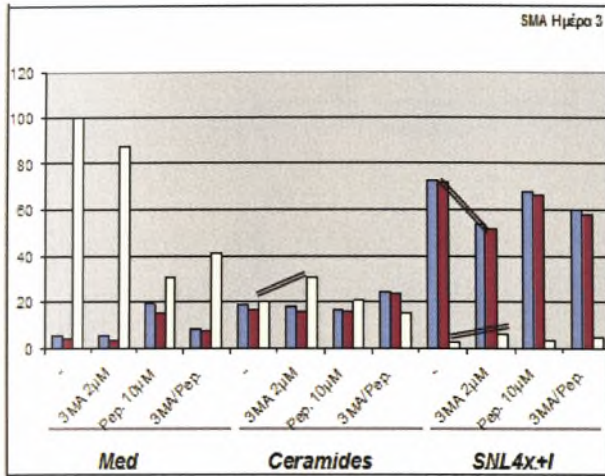
## 2. Σχέση με την αυτοφαγία και την καθεψίνη D.

Για να επιβεβαιωθεί ότι η διαδικασία κυτταρικού θανάτου που παρατηρείται κατά την θεραπεία με το SN, αλλά και με το κεραμίδιο, οφείλεται στην αυτοφαγία, ελέγχθηκε εάν ο κυτταρικός θάνατος καταστέλλεται από καταστολείς της αυτοφαγίας και της καθεψίνης D. Χρησιμοποιήθηκαν οι καταστολείς 3MA (για την αυτοφαγία) και Pepstatine A (για την καθεψίνη D), σε διάφορες συγκεντρώσεις, μόνοι τους, αλλά και σε συνδυασμό, σε κυτταροκαλλιέργειες SMA και MT κυττάρων. Τα κύτταρα είχαν επωαστεί σε medium 5%, σε κεραμίδιο (25μM, 40μM), σε SNLI και SNL4x+I, για χρονικά διαστήματα της 1-4 ημέρες. Δυστυχώς, όλες οι συγκεντρώσεις της Pepstatine A, ήταν τοξικές για τα κύτταρα, εμποδίζοντας την συσχέτιση του μηχανισμού κυτταρικού θανάτου, με τη καθεψίνη D. Η υψηλή αυτή τοξικότητα, οφείλεται στην υψηλή περιεκτικότητα του διαλύματος της Pepstatine A, σε DMSO, γεγονός που και επιβεβαιώθηκε μετά από δοκιμές. Ο καταστολέας 3MA της αυτοφαγίας όμως, λειτούργησε κανονικά, παρουσιάζοντας μία μικρή τοξικότητα.

Στην εικόνα 20 παρουσιάζονται επιλεκτικά τα αποτελέσματα των επώασεων με κεραμίδιο 25μM και SNL4x+I, κατά τη τρίτη και τέταρτη ημέρα, για τα SMA και MT κύτταρα, αντίστοιχα. Η επιλογή αυτών των αποτελεσμάτων έγινε, γιατί το κεραμίδιο 40μM, ήταν πολύ τοξικό. Επιπλέον η θεραπεία με SNLI, καθώς και οι επώσεις μικρότερου χρονικού διαστήματος, δε παρουσιάζουν αρκετή τοξικότητα, για να παρατηρηθεί η προστατευτική δράση της 3MA.

Επιπροσθέτως στις επωάσεις μικρών χρονικών διαστημάτων, η δράση του καταστολέα δεν είναι μεγάλη.

- TO-PRO+
- Έλλειμμα Dna
- % Ζωντανά Κύτταρα



A)

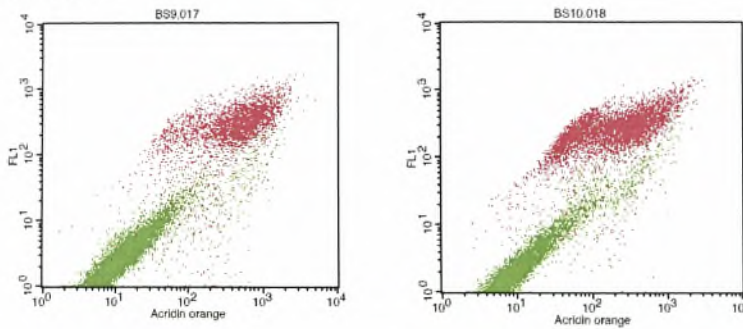
B)

**Εικόνα 20.** Καταστολή της αυτοφαγίας και της καθεψίνης D: Ο καταστολέας *Perpstatine A*, της καθεψίνης D, είναι πολύ τοξικός και παρεμποδίζει την εξαγωγή συμπερασμάτων. Ο καταστολέας 3MA, της αυτοφαγίας αποδεικνύει ότι η αυτοφαγία είναι ο μηχανισμός που προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο και κατά τη θεραπεία με το SNL4x+I, αλλά και με το κεραμίδιο 25µM.

Γενικά παρατηρούμε ότι με τον καταστολέα 3MA, στη θεραπεία με κεραμίδιο, αλλά και στη θεραπεία με το SNL4x+I, η τοξικότητα ελαττώνεται και ταυτόχρονα, αυξάνεται το ποσοστό των ζωντανών κυττάρων, και στις δύο κυτταρικές σειρές. Αποδεικνύεται λοιπόν, ότι η αυτοφαγία είναι ο μηχανισμός που ευθύνεται για τον κυτταρικό θάνατο. Το πιο σημαντικό συμπέρασμα όμως, είναι ότι και το SN, αλλά και το κεραμίδιο, προκαλούν τον θάνατο των γλοιωματικών κυττάρων, μέσω του ίδιου μονοπατιού.

Τα δεδομένα αυτά πάρθηκαν με τη βοήθεια των αναλύσεων FACs, διπλής χρώσης (AO, TO-PRO), κατά τις οποίες (Εικόνα 21), άμεσα παρατηρείται η προστατευτική δράση του καταστολέα 3MA.

SMA Ημέρα 3  
SNL4x+I



A) -

B) 3MA 2μM

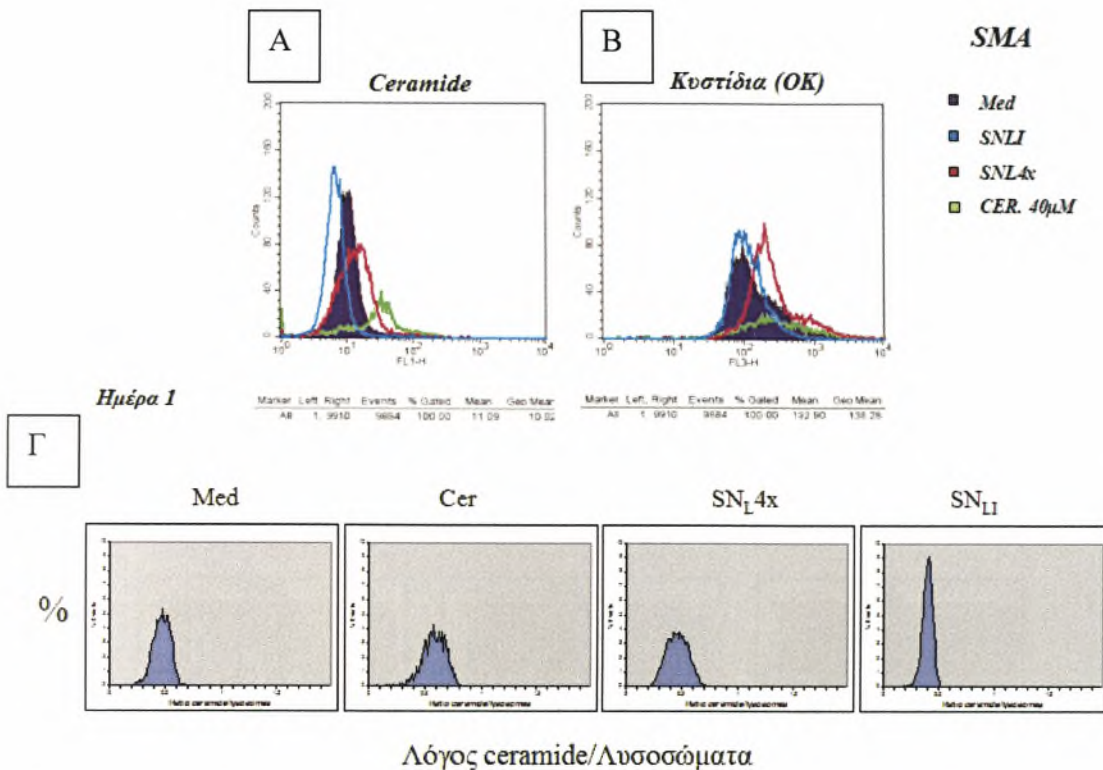
**Εικόνα 21.** Αποτελέσματα ανάλυσης FACs, κατά τη θεραπεία με το SNL4x+I, σε συνδυασμό με τον καταστολέα 3MA: (A) Χωρίς τον καταστολέα, (B) Με τον καταστολέα, Ο άξονας y (FL1), δείχνει τη περιεκτικότητα των κυττάρων σε DNA. Ο άξονας x δείχνει την περιεκτικότητα των κυττάρων σε οξικά κυστιδία.

Κατά την θεραπεία με SNL4x+I σε συνδυασμό με τον καταστολέα 3MA, στο τρίτο 24ωρό, διακρίνονται δύο πληθυσμοί κυττάρων, με ροζ ο πληθυσμός των κυττάρων που παραμένουν ανέπαφα από το SNL4x+I και με πράσινο τα κύτταρα που προχωρούν σε αυτοφαγία, αυξάνοντας το ποσοστό των οξικών κυστιδίων τους και ταυτόχρονα χάνοντας DNA. Στην εικόνα 21. B, παρατηρείται μία ελάττωση της έλλειψης DNA και του ποσοστού των οξικών κυστιδίων, μετά την χρήση του καταστολέα 3MA, γεγονός που αποδεικνύει την προστατευτική του δράση και τη σχέση της αυτοφαγίας με τον κυτταρικό θάνατο που επάγεται από το SN.

3. Προσδιορισμός των επιπέδων του κεραμιδίου, κατά την θεραπεία με SN.

Για να αποδειχθεί ότι το SN προκαλεί την αυτοφαγία, μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του κεραμιδίου, χρησιμοποιήθηκε το αντι-ceramide αντίσωμα, συνδεδεμένο με τη χρώση FITC, για τον προσδιορισμό των επιπέδων του κεραμιδίου στα γλοιοωματικά κύτταρα, κατά την επώαση σε medium 5%, SNLI, SNL4x και κεραμίδιο 40μM, για 24 και 48 ώρες. Η ανάλυση έγινε με τη βοήθεια της τεχνικής FACs διπλής χρώσης (Lysotracker Red και FITC), για τον προσδιορισμό των επιπέδων των οξικών κυστιδίων και του κεραμιδίου. Η ανάλυση των κυττάρων που επώασθηκαν σε medium 5% και σε κεραμίδιο, αποτελούν το αρνητικό και το θετικό control της ανάλυσης.

Τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 22, όπου φαίνεται το πρώτο 24ωρο επώασης, στη κυτταρική σειρά SMA.

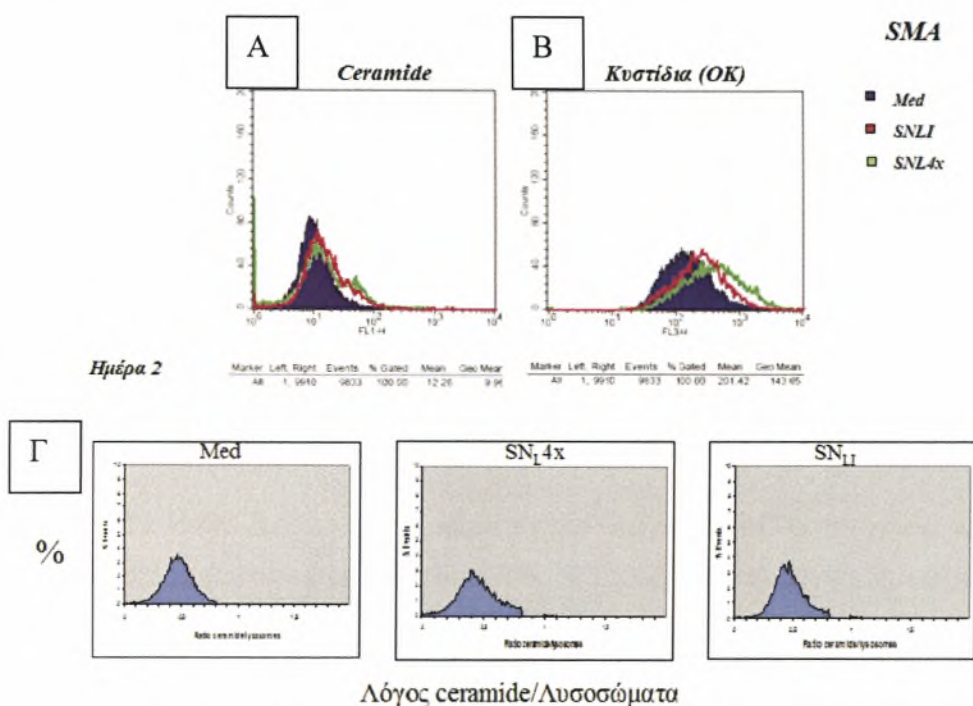


**Εικόνα 22.** Τα επίπεδα του κεραμιδίου σε καλλιέργεια της κυτταρικής σειράς SMA, κατά το πρώτο 24ωρο της θεραπείας με *medium* 5%, SNLI, SNL4x και κεραμίδιο 40μM. Στο Α και Β βλέπουμε τις διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του κεραμιδίου και των οξικών κυστιδίων, αντίστοιχα. Στο Γ παρουσιάζονται τα ίδια αποτελέσματα με τη μορφή λόγου, των επιπέδων του κεραμιδίου, προς τα επίπεδα των λυσοσωμάτων, ή διαφορετικά των οξικών κυστιδίων.

Πιο συγκεκριμένα στην εικόνα 22. Α βλέπουμε τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης του κεραμιδίου και παρατηρούμε μία αύξηση της κατά την επώαση με το SNL4x. Την αύξηση αυτή τη παρατηρούμε και στα οξικά κυστίδια (22. Β). Στην εικόνα 22. Γ παρουσιάζονται τα ίδια αποτελέσματα, με τη μορφή του λόγου του σήματος που έδωσε το κεραμίδιο, προς το σήμα που έδωσαν τα οξικά κυστίδια (ή λυσοσώματα, εφόσον η μέτρηση, έγινε με τη βοήθεια της χρώσης Lysotracker Red). Παρατηρούμε ότι ο λόγος παραμένει σταθερός και στις τρεις θεραπείες, γεγονός που οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η αύξηση του κεραμιδίου και των οξικών κυστιδίων, συμβαίνουν ταυτόχρονα.



Οι εικόνες 23, 24 και 25 παρουσιάζουν τα αποτελέσματα με ανάλογο τρόπο. Στην εικόνα 23, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα, του δεύτερου 24ώρου στα κύτταρα SMA. Το θετικό control δεν απεικονίζεται, γιατί η συγκέντρωση του κεραμιδίου ήταν μεγάλη με αποτέλεσμα τη δεύτερη ημέρα να μην απομείνουν ζωντανά κύτταρα.



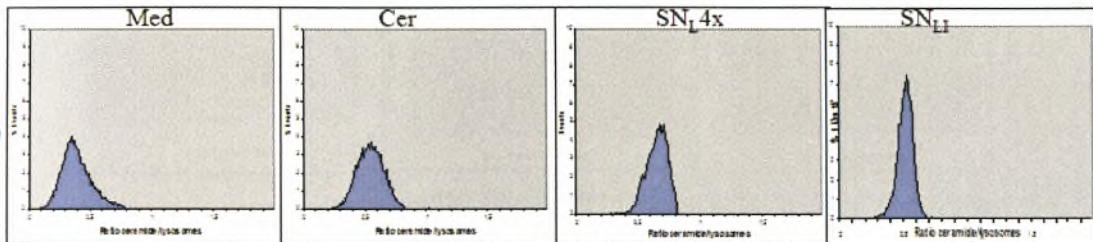
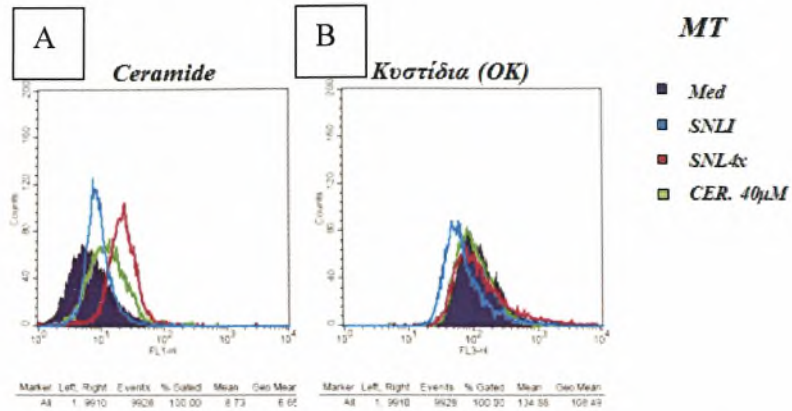
**Εικόνα 23.** Τα επίπεδα του κεραμιδίου σε κύτταρα SMA, κατά το δεύτερο 24ωρο της θεραπείας με *medium* 5%, SNLI και SNL4x (Το *med* ως αρνητικό control). Στο A και B φαίνονται οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του κεραμιδίου και των οξικών κυστιδίων, αντίστοιχα. Στο Γ παρουσιάζονται τα ίδια αποτελέσματα με τη μορφή του λόγου κεραμίδιο/ λυσοσώματα.

Παρατηρείται αύξηση των επιπέδων του κεραμιδίου και στο SNLI, αλλά και στο SNL4x (Εικόνα 23. A). Η ίδια αύξηση παρατηρείται και στα οξικά κυστίδια (Εικόνα 23. B), γεγονός που επαληθεύεται και από τους λόγους κεραμίδιο/ οξικά κυστίδια, οι οποίοι για άλλη μία φορά παραμένουν σταθεροί (Εικόνα 23. Γ).

Στις εικόνες 24 και 25, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της κυτταρικής σειράς MT. Τα κύτταρα MT, είναι γνωστό από προηγούμενα πειράματα ότι παρουσιάζουν μία ανθεκτικότητα στο SN, αλλά και στο κεραμίδιο, σε σχέση με τα SMA.

Γ

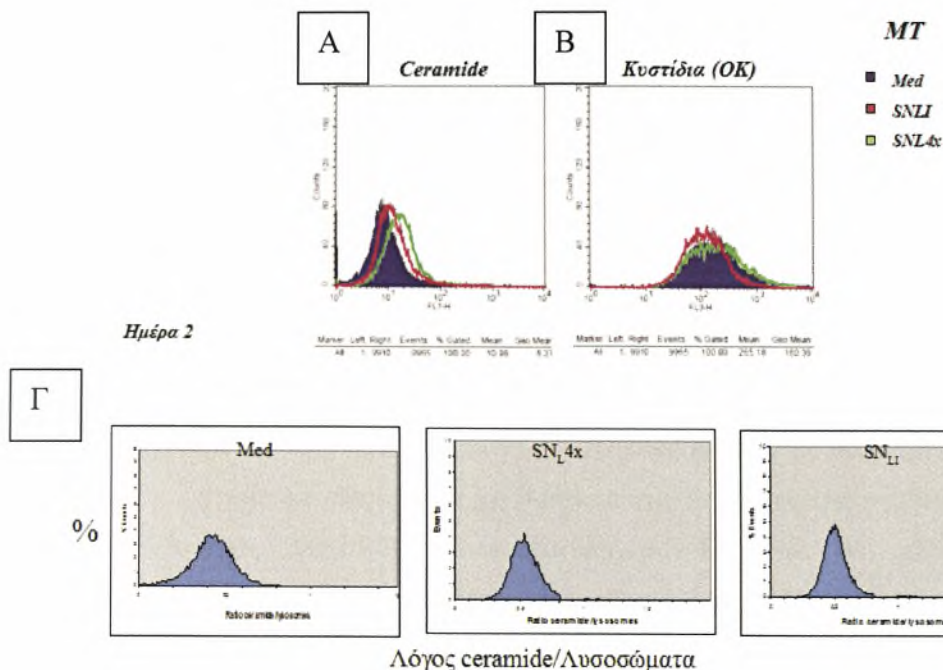
Ημέρα 1



Λόγος ceramide/Λυσοσώματα

Εικόνα 24. Τα επίπεδα του κεραμιδίου σε καλλιέργεια MT κυττάρων, κατά το πρώτο 24ωρο της θεραπείας με *medium* 5%, SNLI, SNL4x και κεραμίδιο 40µM. Στο A και B φαίνονται οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του κεραμιδίου και των οξικών κυστιδίων, αντίστοιχα. Στο Γ παρουσιάζονται τα ίδια αποτελέσματα με τη μορφή λόγου, των επιπέδων του κεραμιδίου προς τα επίπεδα των λυσοσωμάτων.

Το φαινόμενο αυτό επαναλαμβάνεται και σε αυτό το πείραμα, όπου παρατηρείται αύξηση του κεραμιδίου και στα δύο SN και κυρίως στο SNL4x (Εικόνα 24. A), αλλά δεν παρατηρείται καμία αύξηση στα οξικά κυστίδια (Εικόνα 24. B). Γεγονός που επιβεβαιώνεται και με την αύξηση των λόγων κεραμίδιο/οξικά κυστίδια (Εικόνα 24. Γ) και αποδεικνύει ότι οι διαδικασίες της αύξησης του κεραμιδίου και των οξικών κυστιδίων μετά την θεραπεία με SN, δεν είναι ταυτόχρονες, αλλά η μία ακολουθεί την άλλη. Πιθανότατα, το ίδιο να συνέβη και στη κυτταρική σειρά SMA, αλλά επειδή τα κύτταρα αυτά αντιδρούν πιο γρήγορα, αυτό το σημείο θα πρέπει να προηγήθηκε από τον χρόνο στον οποίο έγινε η ανάλυση.



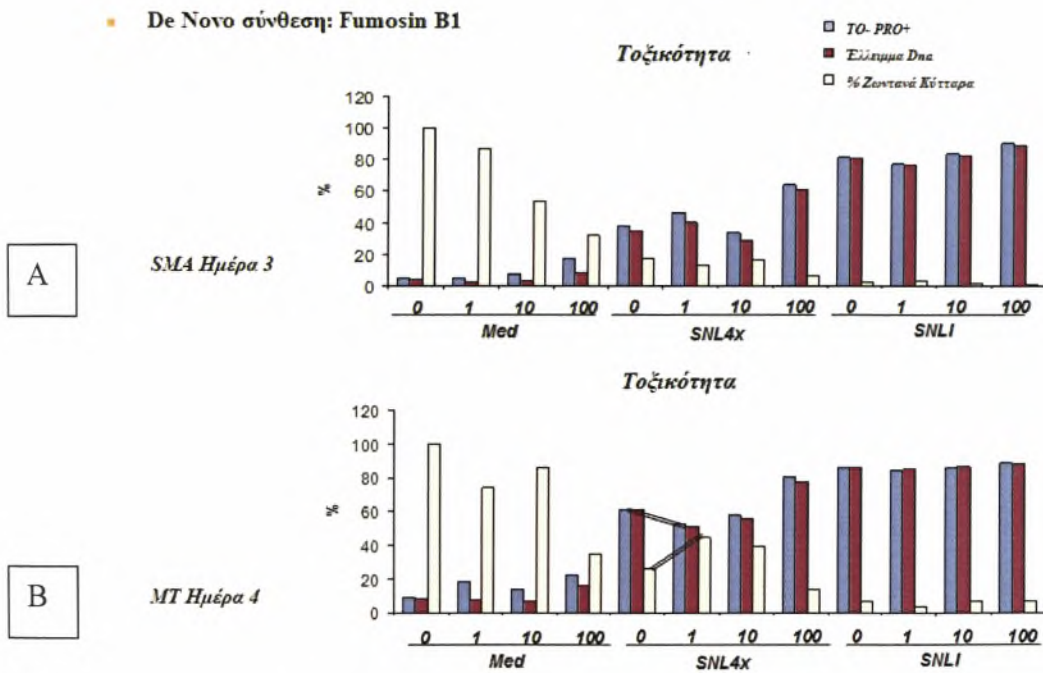
**Εικόνα 25.** Τα επίπεδα του κεραμιδίου σε καλλιέργεια MT κυττάρων, κατά το δεύτερο 24ωρο της θεραπείας με *medium* 5%, SNLI και SNL4x. Στο Α και Β φαίνονται οι διακυμάνσεις της συγκέντρωσης του κεραμιδίου και των οξικών κυστιδίων, αντίστοιχα. Στο Γ παρουσιάζονται τα ίδια αποτελέσματα με τη μορφή λόγου, των επιπέδων του κεραμιδίου, προς τα επίπεδα των λυσοσωμάτων. Ο λόγος αυξάνεται, άρα η αύξηση του κεραμιδίου προηγείται αυτής των οξικών κυστιδίων.

Οι ίδιες παρατηρήσεις ισχύουν και για την εικόνα 25, όπου παρατηρείται αύξηση στη συγκέντρωση του κεραμιδίου και στα δύο SN (Εικόνα 25. Α), αλλά δε παρατηρείται καμία αύξηση στα οξικά κυστιδία (Εικόνα 25. Β), γεγονός που εξηγεί την ανθεκτικότητα των MT κυττάρων στο SN, σε σχέση πάντα με αυτή των SMA.

Μία παρατήρηση που κάνει εντύπωση είναι, το γεγονός ότι η μεγαλύτερη αύξηση του κεραμιδίου, αλλά και των οξικών κυστιδίων στο σύνολο των αποτελεσμάτων, παρατηρείται στην επώαση με SNL4x και όχι με SNLI, το οποίο θεωρείτο πιο τοξικό. Αυτό το γεγονός οφείλεται στη συγκέντρωση που υπέστη το SNL πριν τη χρήση του, η οποία μάλλον το κατάστησε ισχυρότερο από το SNLI. Το κύριο συμπέρασμα όμως, είναι ότι η θεραπεία γλοιωματικών κυττάρων με SN προκαλεί την αύξηση του κεραμιδίου. Το γεγονός αυτό προκαλεί νέα ερωτήματα. Ένα από τα πιο σημαντικά ερωτήματα είναι: Ποιο είναι το μονοπάτι παραγωγής του κεραμιδίου, το οποίο διεγείρεται από το SN και οδηγεί στην υπερπαραγωγή του και στη συνέχεια στην αυτοφαγία;

4. Προσδιορισμός του μονοπατιού παραγωγής του κεραμιδίου, με την χρήση καταστολέων.

Για τον προσδιορισμό του μονοπατιού που ευθύνεται για την αύξηση της συγκέντρωσης του κεραμιδίου, μετά από την επώαση με SN, επιστρατεύτηκαν διάφοροι καταστολείς, οι οποίοι είχαν ως στόχο την καταστολή ενζύμων που παίρνουν μέρος σε ένα από τα δύο μονοπάτια παραγωγής του κεραμιδίου, το *de novo* και το μονοπάτι παραγωγής του κεραμιδίου από τη σφιγγομυελίνη. Αρχικά παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της καταστολής του μονοπατιού της *de novo* σύνθεσης, τα οποία πάρθηκαν με τη βοήθεια της FACs ανάλυσης διπλής χρώσης (Acridine Orange, TO-PRO). Ο καταστολέας Fumosin B1, είναι γνωστός καταστολέας του ενζύμου συνθάση του κεραμιδίου. Η χρήση του έγινε στις κυτταρικές σειρές SMA και MT, με χρόνο επώασης σε *medium* 5%, SNL4x και SNLI, 3 και 4 24ώρα.



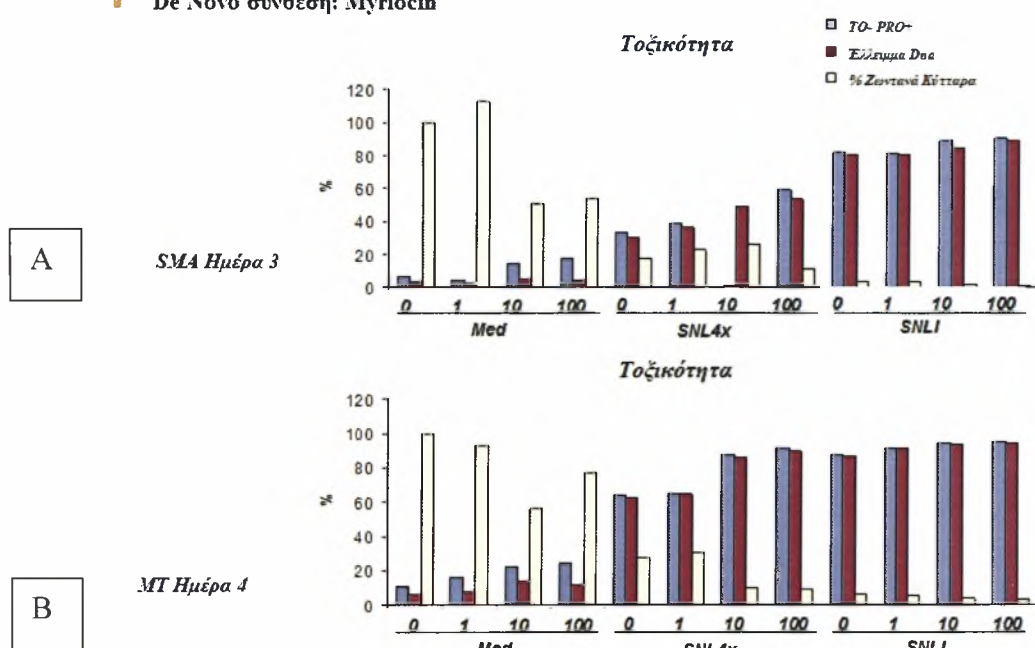
Εικόνα 26. Αποτελέσματα της καταστολής της *de novo* σύνθεσης του κεραμιδίου, με τη βοήθεια του καταστολέα Fumosin B1 σε διάφορες συγκεντρώσεις (1, 10, 100μM): SMA (A) και MT (B) κύτταρα, επώασθησαν σε *medium* 5%, SNL4x και SNLI, για χρονικό διάστημα 3 και 4 24ώρων, αντίστοιχα.

Ο καταστολέας παρουσιάζει μία σχετικά χαμηλή τοξικότητα. Παρατηρείται ότι ο καταστολέας Fumosin B1 δε προστατεύει σημαντικά τα κύτταρα, από την

τοξικότητα του SN (Εικόνα 26), με μόνη εξαίρεση τη μικρή βελτίωση που παρατηρείται για τα κύτταρα MT (Εικόνα 26 B), κατά την επώαση σε SNL4x. Η μικρή αυτή προστασία αποδεικνύει ότι το ένζυμο συνθάση του κεραμιδίου δεν ευθύνεται για την αύξηση του κεραμιδίου, κατά την θεραπεία με το SN, παρά μόνο σε ένα πολύ μικρό ποσοστό.

Η πειραματική διαδικασία, συνεχιστική με τη χρήση του καταστολέα του ενζύμου παλμιτοΐλο-τρανσφεράση της σερίνης, της *de novo* σύνθεσης. Ο καταστολέας αυτός, ονομάζεται Mygiosin και η χρήση του έγινε στις κυτταρικές σειρές SMA και MT, με χρόνο επώασης σε medium 5%, SNL4x και SNLI, 3 και 4 24ώρα.

■ De Novo σύνθεση: Mygiosin



Εικόνα 27. Τα αποτελέσματα της καταστολής της *de novo* σύνθεσης του κεραμιδίου, με τον καταστολέα Mygiosin, σε συγκεντρώσεις 1, 10, 100nM: SMA (A) και MT (B) κύτταρα, επώασθηκαν σε medium 5%, SNL4x και SNLI, για χρονικό διάστημα 3 και 4 24ώρων, αντίστοιχα.

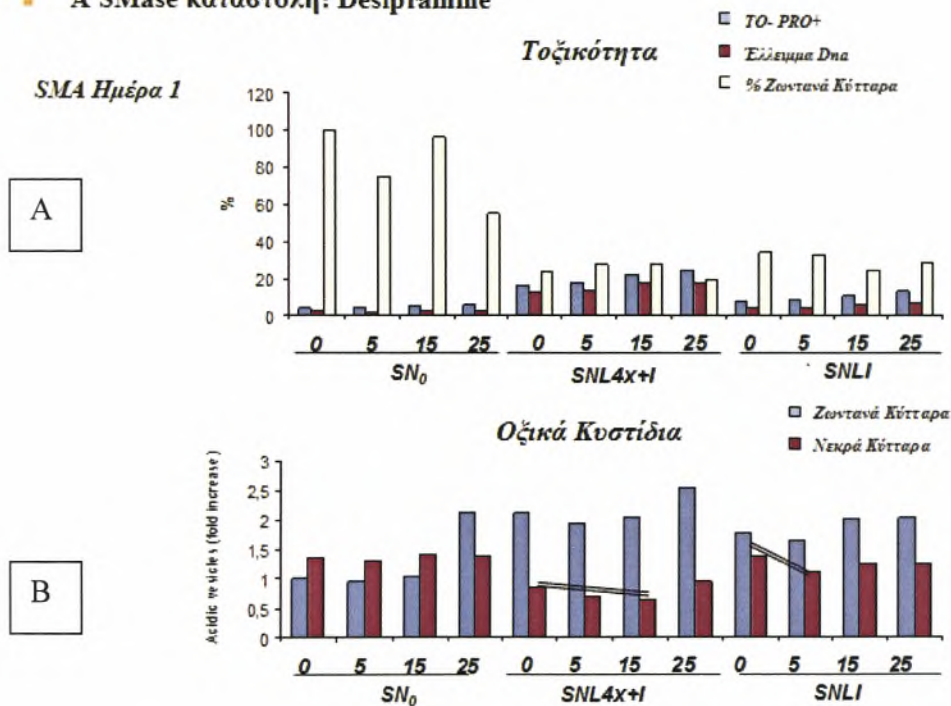
Ο καταστολέας παρουσιάζει χαμηλή τοξικότητα, αλλά δε προστατεύει καθόλου τα κύτταρα από την τοξικότητα του SN (Εικόνα 27), επομένως ούτε το ένζυμο παλμιτοΐλο-τρανσφεράση της σερίνης δεν παίζει κανένα ρόλο στο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου που επάγεται από τα SN.

Σύμφωνα με την εικόνα 15 (σελίδα 23) και αφού τα δύο κύρια ένζυμα της *de novo* σύνθεσης, δε παίζουν κύριο ρόλο στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου

που προκαλείται από το SN, σειρά έχει ο έλεγχος των δύο ενζύμων (nSMase, aSMase) που παίρνουν μέρος στη παραγωγή του κεραμιδίου από τη σφιγγομυελίνη.

Το ένζυμο aSMase στοχεύετε με τον καταστολέα Desipramine. Σε αυτό το πείραμα έγινε επώαση με medium 5%, SN<sub>0</sub> (υπερκείμενο μη διεγερμένων μικρογλοιακών κυττάρων), SNL4x+I και SNLI, για χρονικό διάστημα ενός μόνο 24ώρου. Το πείραμα είχε επαληθευτεί και άλλες φορές, με μεγαλύτερους χρόνους επώασης, αλλά η Desipramine παρουσίασε μεγάλη τοξικότητα. Η δοκιμή με το SN<sub>0</sub> και τον μικρό χρόνο επώασης, έδωσε τελικά αποτελέσματα, γιατί και η τοξικότητα ήταν μικρότερη στο SN<sub>0</sub>, αλλά και ο μικρός χρόνος επώασης δεν επέτρεπε την εκδήλωση της.

■ **A SMase καταστολή: Desipramine**



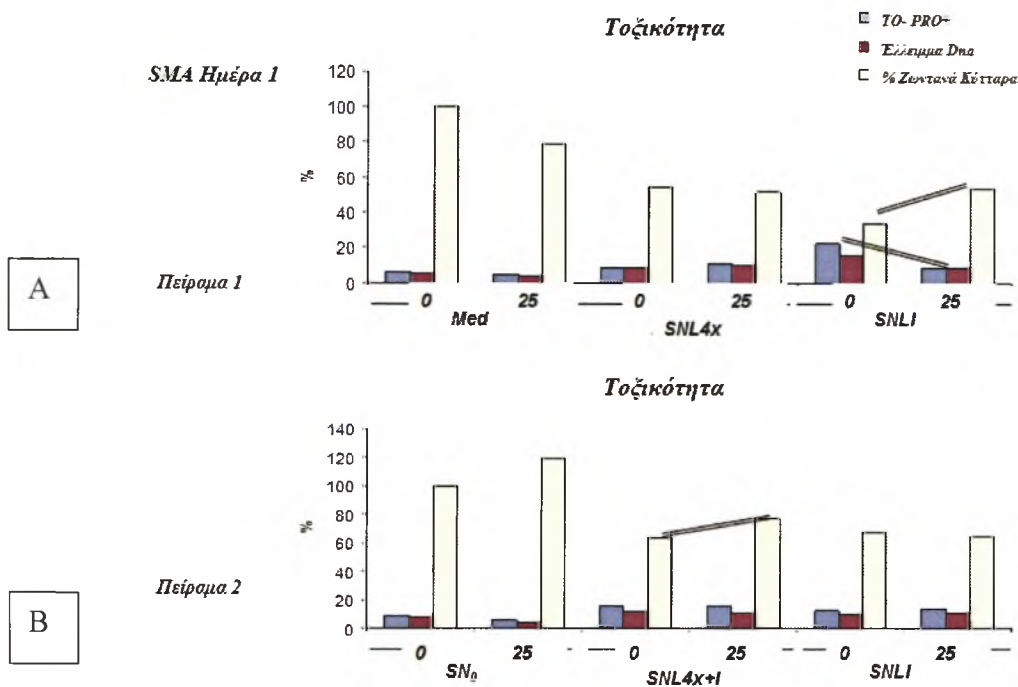
Εικόνα 28. Τα αποτελέσματα της καταστολής της aSMase από την Desipramine: Το πείραμα για λόγους μεγάλης τοξικότητας, περιορίστηκε στη κυτταρική σειρά SMA, με επώαση με SN<sub>0</sub> και SNL4x+I, SNLI, για τον μικρό χρόνο επώασης το πρώτου 24ώρου. Παρουσιάζονται (A) η τοξικότητα και (B) τα οξικά κυστίδια.

Δυστυχώς τα αποτελέσματα περιορίζονται μόνο στη κυτταρική σειρά SMA, διότι στα MT ο καταστολέας δε παρουσίασε καμία δράση, εφόσον ο χρόνος επώασης της μίας ημέρας ήταν πολύ μικρός για να φανούν αποτελέσματα σε

κύτταρα που δεν αντιδρούν, όσο γρήγορα αντιδρούν τα SMA. Παρόλα τα προβλήματα παρατηρήθηκε μία μικρή προστατευτική δράση, η οποία θα μπορούσε να θεωρηθεί αμελητέα. Η μεγάλη τοξικότητα του καταστολέα, σε συνδυασμό με τον μικρό χρόνο επώασης όμως, αφήνει ένα ενδεχόμενο τα αποτελέσματα να μην είναι ακριβή.

Το ένζυμο nSMase, από την άλλη, προσφέρει μία επιλογή από πολλούς καταστολείς. Ο πρώτος καταστολέας που δοκιμάστηκε ήταν ο GW4869, ο οποίος παρουσίασε μεγάλη τοξικότητα και έτσι περιορίσε τα αποτελέσματα μόνο στη κυτταρική σειρά SMA και στο χρόνο επώασης της μίας ημέρας, μετά από θεραπεία με medium 5%, SN<sub>0</sub>, SNL4x, SNLI και SNL4x+I, σε δύο διαφορετικά πειράματα.

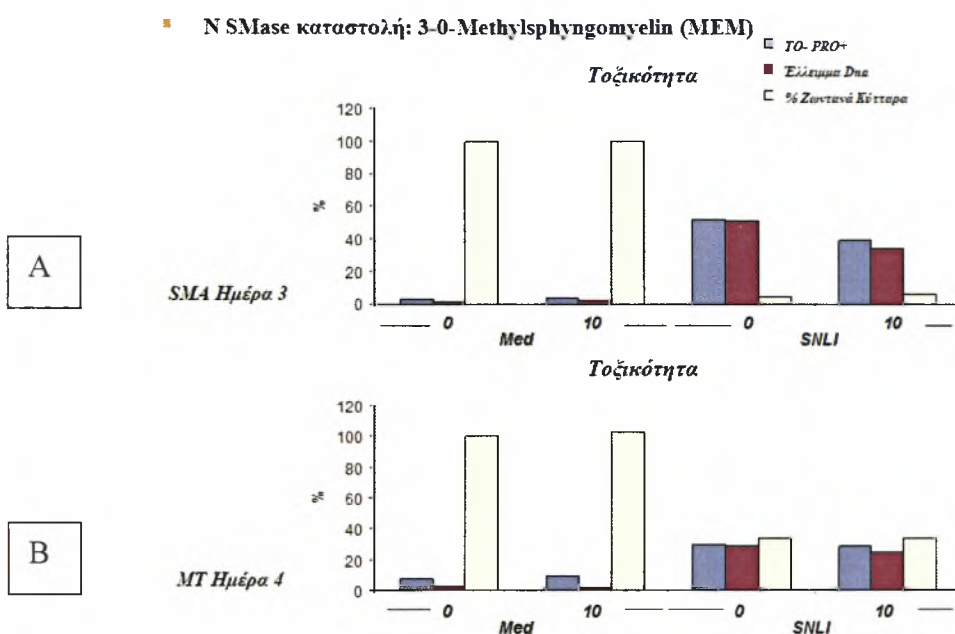
■ N SMase καταστολή: GW4869



Εικόνα 29. Τα αποτελέσματα της καταστολής της nSMase από το GW4869: Το πείραμα για λόγους μεγάλης τοξικότητας, περιορίστηκε στα κύτταρα SMA, με επώαση σε medium 5%, SN<sub>0</sub> και τα SNL4x, SNL4x+I, SNLI, για ένα 24ώρο, σε δύο διαφορετικά πειράματα. Στο πρώτο (A) και στο δεύτερο πείραμα (B), παρατηρούμε αύξηση των ζωντανών κυττάρων, στο SNL4x+I.

Παρατηρείται μικρή αύξηση των ζωντανών και ελάττωση των νεκρών κυττάρων, κατά τη χρήση του καταστολέα σε συνδυασμό με το SNLI, στο πρώτο πείραμα (Εικόνα 29. A). Κάτι ανάλογο φαίνεται και στο δεύτερο πείραμα (Εικόνα

29. Β), όπου παρατηρούμε μια μικρή αύξηση των ζωντανών κύτταρων, κατά την επώαση με το SNL4x+I. Τα αποτελέσματα αυτά, αν και δεν είναι ιδανικά, δίνουν ενδείξεις ότι το ένζυμο nSMase παίζει κάποιο ρόλο στην επαγωγή της αύξησης του κεραμιδίου, από το SN. Για αυτό ακριβώς τον λόγο, τα πειράματα συνεχίστηκαν και με άλλους καταστολείς. Ο επόμενος καταστολέας που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ο 3-0 methylsphingomyelin (MEM), ο οποίος αν και δεν ήταν τοξικός δε λειτούργησε προστατευτικά για τα κύτταρα SMA και MT. Στην εικόνα 30 παρουσιάζονται επιλεκτικά τα αποτελέσματα του MEM (10 μM), σε medium 5% και SNLI, για τα κύτταρα SMA και MT, με χρόνους επώασης 3 και 4 24ώρα, αντίστοιχα. Οφθαλμοφανής είναι η παντελής έλλειψη προστασίας από την τοξικότητα του SNLI.



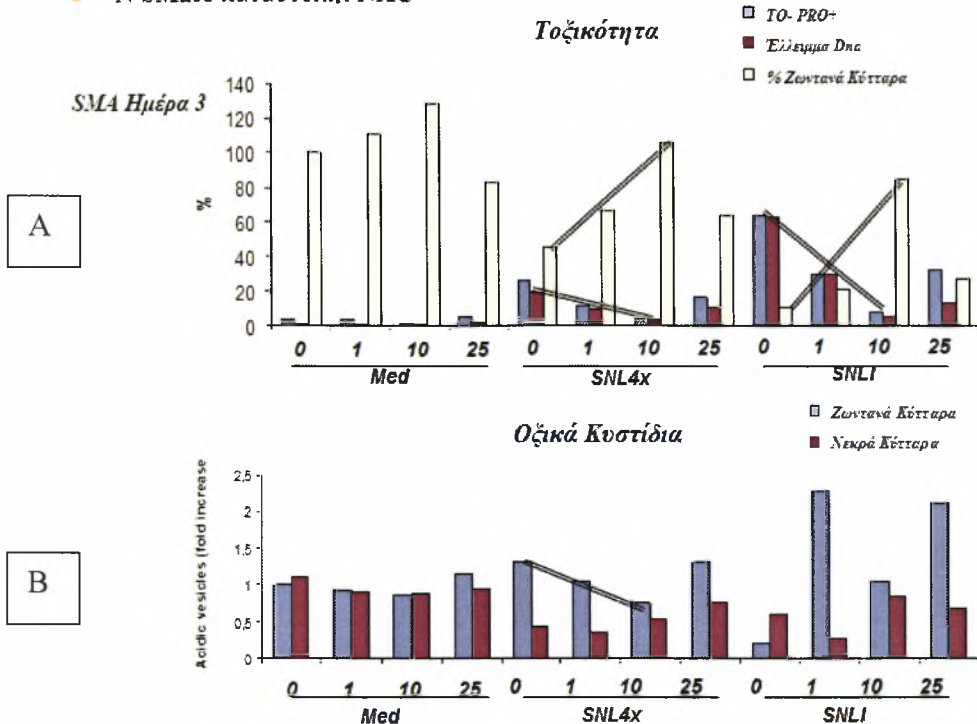
Εικόνα 30. Τα αποτελέσματα της καταστολής της nSMase, από το MEM: Παρατηρείται παντελής έλλειψη προστασίας, από την τοξικότητα του SNLI, για τα κύτταρα SMA και MT, με επώαση σε medium και SNLI, με χρόνο επώασης 3 και 4 24ώρα, αντίστοιχα.

Ακολούθησε η δοκιμή του καταστολέα NAC, ο οποίος δρα έμμεσα μέσω της αύξησης της γλουταθειόνης, που καταστέλλει τη δράση της nSMase. Ο καταστολέας αυτός έδωσε τα επιθυμητά αποτελέσματα, προστατεύοντας από τα SNLI και SNL4x σε ποσοστό σχεδόν 100% για τα κύτταρα SMA και λίγο λιγότερο για τα κύτταρα MT, προφανώς εξαιτίας της αργής αντίδρασης που τα χαρακτηρίζει. Τα πειράματα επαληθεύτηκαν δύο φορές και παρουσιάζονται στις



εικόνας 31 και 32 . Η τοξικότητα μειώνεται κατά πολύ (Εικόνα 31. Α), στα SMA και την ίδια στιγμή μειώνονται και τα οξικά κυστίδια (Εικόνα 31. Β).

■ N SMase καταστολή: NAC

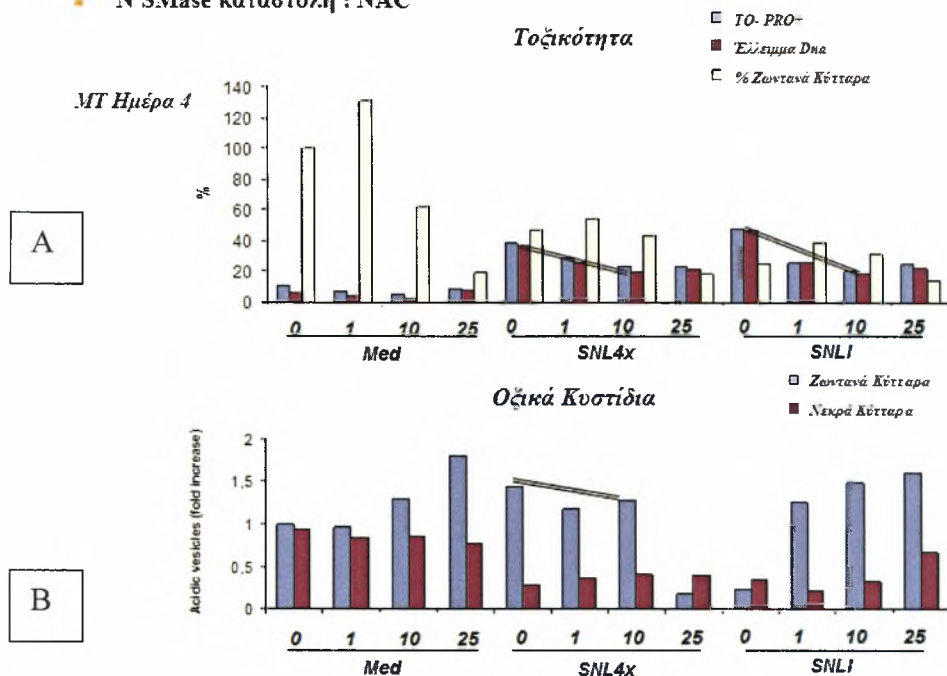


Εικόνα 31. Τα αποτελέσματα της καταστολής της nSMase, από τον καταστολέα NAC σε κύτταρα SMA, μετά από επώαση τριών 24ώρων: Παρατηρείται μεγάλη προστασία από το SNL4x και από το SNLI. Η προστατευτική δράση φαίνεται και στην ελάττωση της τοξικότητας (Α), αλλά και στη μείωση του αριθμού των οξικών κυστιδίων (Β).

Ακόμα και στα MT κύτταρα, όπου η ελάττωση της τοξικότητας είναι μικρότερη (Εικόνα 32. Α) και η μείωση στα οξικά κυστίδια δεν είναι τόσο προφανής (Εικόνα 32. Β), η προστασία που προσφέρει ο καταστολέας NAC είναι εντυπωσιακή.

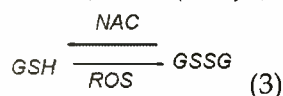
Τα τελευταία αποτελέσματα κατευθύνουν το ενδιαφέρον προς το ένζυμο nSMase, αλλά ο ρόλος που παίζουν τα ένζυμα SMase δεν έχει επιβεβαιωθεί πλήρως. Και αυτό οφείλεται στο ότι δεν βρέθηκε ένας άμεσος καταστολέας για τα δύο ένζυμά, καθιστώντας τα αποτελέσματα, αναξιόπιστα.

• N SMase καταστολή : NAC



Εικόνα 32. Τα αποτελέσματα της καταστολής της nSMase από τον καταστολέα NAC σε κύτταρα MT, μετά από επώαση 4 24ώρων: Παρατηρείται προστασία από το SNL4x και από το SNLI. Η προστατευτική δράση φαίνεται στην ελάττωση της τοξικότητας (Α) και στη μείωση του αριθμού των οξικών κυστιδίων (Β).

Για παράδειγμα η δράση του καταστολέα NAC στη καταστολή του οξειδωτικού stress (Αντίδραση 3), θα μπορούσε να οφείλεται και η επιβίωση των κυττάρων.



Για να διευκρίνιση της δράσεις αυτών των δύο ενζύμων, έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας τους, κατά την επώαση με τα SN των διεγερμένων μικρογλοιακών κυττάρων.

5. Προσδιορισμός της ενεργής σφιγγομυελινάσης.

Ο προσδιορισμός της ενεργότητας των SMase, έγινε με τη βοήθεια μιας απλής μεθόδου Amplex Red SMase Assay Kit, η οποία εφαρμόστηκε δύο φορές, μία για κάθε SMase. Η τεχνική Amplex Red SMase Assay Kit, εφαρμόστηκε σε εκχυλίσματα MT και SMA κυττάρων, τα οποία επώαστηκαν σε medium 5%, SNLI, SNL4x και SNL+I, σε χρόνο 1-3 24ώρα. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων με τη βοήθεια της φθορισμομετρίας, κατά την οποία

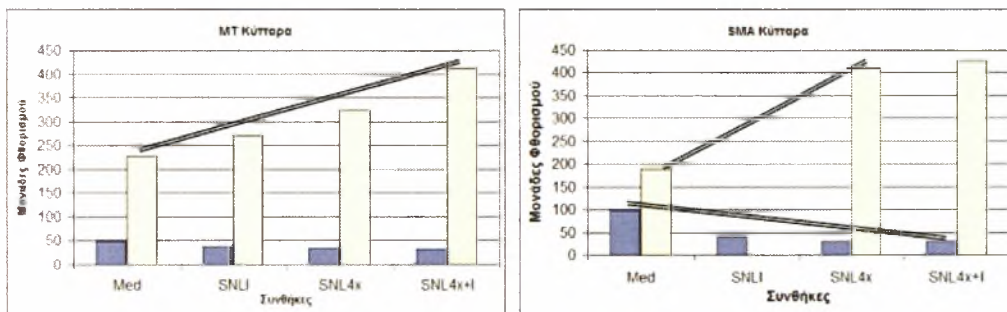
παρατηρήθηκε ότι η δραστηριότητα των ενζύμων έμεινε σταθερή, μετά από χρόνο επώασης 45 λεπτών. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στις εικόνες 33 και 34. Τη δεύτερη ημέρα δεν παρατηρήθηκε φθορισμός, εξαιτίας φθοράς των δειγμάτων μετά την εκχέλιση των κυττάρων.

Στη δοκιμή του ενζύμου nSMase, παρατηρήθηκε μικρή ενεργότητα του ενζύμου τη πρώτη ημέρα, η οποία παραμένει σταθερή σε όλες τις συνθήκες για τα κύτταρα MT (Εικόνα 33. Α), αλλά φαίνεται να ελαττώνεται στις συνθήκες των SN, στα κύτταρα SMA (Εικόνα 33. Β). Το φαινόμενο αυτό πιθανώς, οφείλεται στην ελάττωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των κυττάρων, η οποία παρατηρείται την πρώτη ημέρα εφαρμογής της θεραπείας με το SN στα κύτταρα SMA (Εικόνα 17. Β1).

□ Ημέρα 1

□ Ημέρα 3

N SMase



A) MT κύτταρα, την 1 & 3 ημέρα.

B) SMA κύτταρα, την 1 & 3 ημέρα.

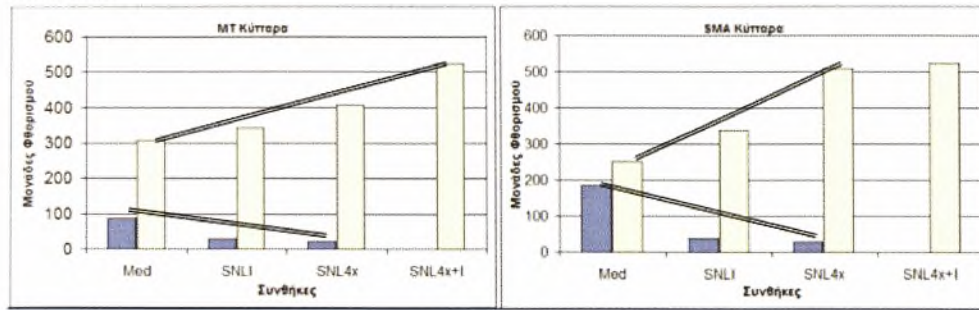
**Εικόνα 33.** Τεχνική Amplex Red SMase Assay Kit, για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της n SMase: Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας, μετά από επώαση 45 λεπτών, για τα κύτταρα MT (Α) και SMA (Β).

Η ενεργότητα του ενζύμου, φαίνεται να πολλαπλασιάζεται και στις συνθήκες medium 5%, SNLI, SNL4x και SNL4x+I, κατά αύξοντα σειρά, την τρίτη ημέρα επώασης. Παρατηρείται ότι δεν υπάρχει φθορισμός στη συνθήκη SNLI, στα κύτταρα SMA, για τη τρίτη ημέρα επώασης (Εικόνα 33 Β), φαινόμενο που οφείλεται σε πιθανή καταστροφή του δείγματος κατά την διαδικασία της εκχύλισης.

Οι ίδιες περίπου παρατηρήσεις, ισχύουν και για τα αποτελέσματα της ενεργότητας του ενζύμου aSMase (Εικόνα 34). Παρατηρείται μία μικρή ενεργότητα του ενζύμου τη πρώτη ημέρα, η οποία φαίνεται μεγαλύτερη στη συνθήκη με το medium 5%, στα κύτταρα MT και SMA.

- Ημέρα 1
- Ημέρα 3

### A SMase



A) MT κύτταρα, 1 & 3 ημέρα.

B) SMA κύτταρα, 1 & 3 ημέρα.

**Εικόνα 34.** Τεχνική *Amplex Red SMase Assay Kit*, για τον προσδιορισμό της ενεργότητας της *a SMase*: Απεικονίζονται τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας, μετά από επώαση 45 λεπτών, για τα κύτταρα MT (A) και SMA (B).

Στα κύτταρα MT η διαφορά δεν είναι σημαντική, αλλά στα SMA, είναι υπολογίσιμη. Η αυξημένη ενεργότητα της *aSMase*, στο *medium*, πιθανός οφείλεται στο μεγαλύτερο αριθμό κυττάρων που υπήρχαν εκεί, σε σχέση με αυτά στο SN. Η ενεργότητα της *nSMase* φαίνεται να πολλαπλασιάζεται στις συνθήκες *medium* 5%, SNLI, SNL4x και SNL4x+I, κατά αύξοντα σειρά, την τρίτη ημέρα επώασης, και στις δύο κυτταρικές σειρές.

Εντύπωση προκαλεί η αύξηση της ενεργότητας των ενζύμων στη συνθήκη του *medium*, κατά τη τρίτη ημέρα επώασης (Εικόνα 33, 34). Η αυξημένη ενεργότητα των *SMase* στο *medium* οφείλεται στο γεγονός ότι, τα κύτταρα πολλαπλασιάζονται γρήγορα στη συνθήκη *medium*. Ο κορεσμός των κυττάρων στη καλλιέργεια, είναι πιθανόν να εξάντλησε τα θρεπτικά συστατικά, την τρίτη ημέρα επώασης, ενεργοποιώντας τη διαδικασία της αυτοφαγίας, μέσω των *SMase* ενζύμων, για τη συντήρηση των κυττάρων στη ζωή.

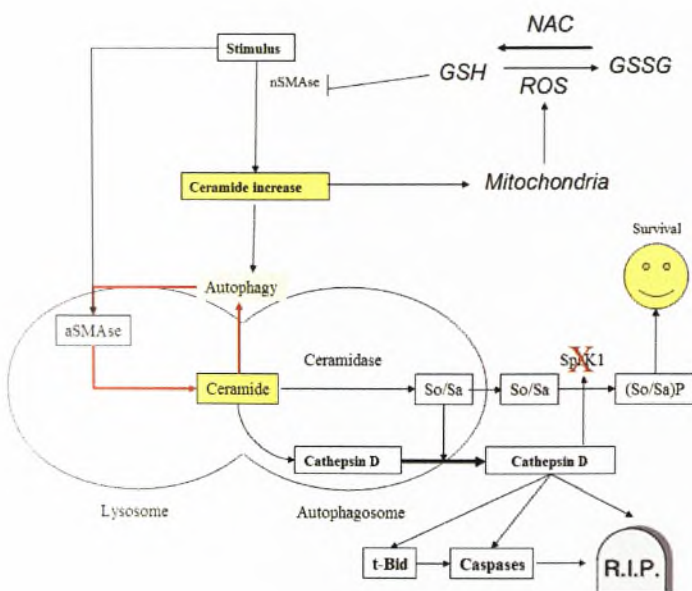
Αυτά τα αποτελέσματα αποδεικνύουν ότι και τα δύο ένζυμα *SMase*, αυξάνουν ταυτόχρονα σε δραστηριότητα κατά τη θεραπεία με όλα τα SN, ανάλογα με την τοξικότητά του καθενός. Συνεπώς το μονοπάτι που ευθύνεται για την αύξηση των επιπέδων του κεραμιδίου και τον κυτταρικό θάνατο που ακολουθεί μέσω της αυτοφαγίας κατά τη θεραπεία με το υπερκείμενο των διεγερμένων μικρογλοιακών κυττάρων, είναι χωρίς καμία αμφιβολία, αυτό που πραγματοποιείται μέσω των *SMase* ενζύμων.

## Συζήτηση-Συμπεράσματα:

Το υπερκείμενο διεγερμένων μικρογλοιακών κυττάρων (SN) προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω της αυτοφαγίας, εξειδικευμένα σε καρκινικά αστροκύτταρα (SMA, MT) και όχι σε υγιή. Σε αυτή τη μελέτη αποδεικνύεται ότι και το κεραμίδιο, το οποίο είναι ένα σφιγγολιπίδιο γνωστό για τις ρυθμιστικές του ικανότητες κατά την ανάπτυξη, τη διαφοροποίηση και τον κυτταρικό θάνατο, εμπλέκεται άμεσα στο μονοπάτι του κυτταρικού θανάτου, που επάγεται από το SN. Όπως φαίνεται το κεραμίδιο παρουσιάζει εξειδικευμένη τοξικότητα κατά των καρκινικών αστροκυττάρων και όχι κατά των υγίων. Η τοξικότητα αυτή προκαλεί τον κυτταρικό θάνατο μέσω της αυτοφαγίας, όπως ακριβώς και αυτή του SN. Τα κοινά αυτά στοιχεία ανάμεσα στη κυτταρο-τοξικότητα του κεραμιδίου και του SN, οδήγησε στην ανάγκη να διευκρινιστεί εάν τα επίπεδα του κεραμιδίου αυξάνονται κατά τη θεραπεία με SN, γεγονός που αποδειχτικό με τη χρήση του αντι-ceramide αντισώματος. Συμπερασματικά λοιπόν το SN προκαλεί την αυτοφαγία μέσω της αύξησης των επιπέδων του κεραμιδίου.

Ακολούθησε η ταυτοποίηση του μονοπατιού που οδηγεί στην αύξηση του κεραμιδίου. Η *de novo* σύνθεση αποκλείστηκε πρώτη και η περαιτέρω έρευνα στο μονοπάτι παραγωγής του κεραμιδίου από τη σφιγγομυελίνη, απέδειξε ότι τα ένζυμα SMase παρουσιάζουν μεγάλη δραστηριότητα κατά τη θεραπεία με το SN, η οποία είναι ανάλογη με την τοξικότητά του κάθε SN.

Οι παρατηρήσεις αυτές βοήθησαν στην επέκταση του αρχικού θεωρητικού μοντέλου του μηχανισμού του κυτταρικού θανάτου, που επάγεται από το SN (Εικόνα 35).



**Εικόνα 35.** Το θεωρητικό μοντέλο του κυτταρικού θανάτου: Το σήμα, από τους παράγοντες του SN, προκαλεί την αύξηση των επιπέδων του κεραμιδίου μέσω των ενζύμων *aSMase* και *nSMase*. Η αύξηση οδηγεί στην επαγωγή της αυτοφαγίας και στην ενεργοποίηση της καθεψίνης D, που βοηθά στον σχηματισμό οξικών κυστιδίων, ή στην απόπτωση. (Ευγενική προσφορά του κ. Mora Rodrigo)

Ο κυτταρικός θάνατος επάγεται από εκκρινόμενους από διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα, παράγοντες. Οι παράγοντες αυτοί δεν είναι βέβαια γνωστοί, αλλά μεταδίδουν ένα σήμα, το οποίο αποδείχτηκε ότι προκαλεί την αύξηση των επιπέδων του κεραμιδίου μέσω των ενζύμων aSMase και nSMase. Η αύξηση αυτή οδηγεί στην επαγωγή της αυτοφαγίας και είναι πιθανών να ενισχύεται, καθώς σχηματίζονται τα αυτοφαγοσώματα.

Το κεραμίδιο όμως, είναι γνωστό και για την ενεργοποίηση της καθεψίνης D, η οποία μπορεί να καταστείλει την κινάση SphK1. Η καταστολή της κινάσης αυτής επιτρέπει το σχηματισμό οξικών κυστιδίων από τα σφιγγολιπίδια, σφιγγοσίνη και σφιγγανίνη (So, Sa). Η καθεψίνη D όμως, μπορεί να οδηγήσει στο κυτταρικό θάνατο και μέσω της απόπτωσης, ενεργοποιώντας τον αποπτωτικό παράγοντα t-Bid, ο οποίος ενεργοποιεί τις κασπάσες. Με λίγα λόγια, η αυτοφαγία θα μπορούσε να δώσει τη θέση της στην απόπτωση, η οποία μάλλον έχει κατασταλεί στα καρκινικά κύτταρα.

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης δημιουργούν μία σειρά από ερωτήματα. Αν το κεραμίδιο παίζει τον ρόλο του δεύτερου αγγελιοφόρου του σήματος που επάγει τον μηχανισμό του κυτταρικού θανάτου, που επάγουν τα διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα, τότε είναι πιθανών να είναι είδη γνωστός ο προσδέτης και ο υποδοχέας που βοηθάει στη μεταγωγή του σήματος. Είναι γνωστό ότι ο παράγοντας νέκρωσης TNF $\alpha$  και η ιντερφερόνη-1 $\beta$ , είναι οι ρυθμιστές της παραγωγής του κεραμιδίου, από τη σφιγγομυελίνη [15]. Συνεπώς η μελέτη μπορεί να επεκταθεί στη ταυτοποίηση του παράγοντα που εκκρίνουν τα διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα, αρχίζοντας από τον έλεγχο των παραπάνω. Επιπλέον η έρευνα μπορεί να επεκταθεί και στη μελέτη των επιπτώσεων που θα είχε η καταστολή ή η υπερέκφραση της κινάσης SphK1 στα γλοιοματικά κύτταρα, αλλά και στο μονοπάτι κυτταρικού θανάτου το οποίο διερευνήθηκε.

Οι δυνατότητες είναι πολλές, αλλά ο κύριος στόχος είναι η ταυτοποίηση των παραγόντων που εκκρίνουν τα διεγερμένα μικρογλοιακά κύτταρα, η οποία θα βοηθούσε κατά πολύ στη περαιτέρω ερευνά, αφού η χρήση των SN θα είναι περιττή, ελαττώνοντας έτσι και το κόστος.

Είναι γεγονός ότι το κεραμίδιο εμπλέκεται και σε πολλά άλλα είδη καρκίνων, είτε επειδή η παραγωγή του φαίνεται να καταστέλλεται, στους ανθεκτικούς σε θεραπεία καρκίνους, είτε επειδή η παραγωγή του επάγεται από τα χημειοθεραπευτικά φάρμακα. Αυτή η εμπλοκή του κεραμιδίου στη καρκινική ανάπτυξη και θεραπεία, καθιστά τη μελέτη του επιτακτική.

### Βιβλιογραφικές Αναφορές:

1. Piontek, Regnier-Vigouroux, Brandt (2002) Contact With Astroglial Membranes Induces Axonal And Dendritic Growth Of Human Cns Model Neurons And Affects The Distribution Of The Growth Associated Proteins Map1b And Gap43. *J. Neurosci. Res.* 67, 471-483.
2. Gresser, Hein, Riese, Regnier-Vigouroux (2000) Tumor Necrosis Alpha And Interleukin,4 Alpha Inhibit Through Different Pathways Interferon-Gamma-Induced Antigen Presentation, Processing And Mhc Class Ii Surface Expression On Astrocytes, But Not On Microglia. *Cell And Tissue Research*, 300, 373-382.
3. Burudi, Riese, Stahl, Regnier-Vigouroux, (1999) Identification And Functional Characterization Of The Mannose Receptor In Astrocytes. *Glia*, 25, 44-55.
4. Behnam Badie, Jill Schartner. (2001) Role Of Microglia In Glioma Biology. *Microscopy Research And Technique* 54, 106-113.
5. Bittman, Li, Samadder, Arthur (2007) Anticancer Activity Of A Ceramide Analog Containing A Disulfide Linkage. *Cancer Letters*, 1, 53-58
6. Pahlavani, Vargas (2000) The Effect Of A Ceramide Analog, N-Acetylsphingosine On The Induction Of Proliferation And Il-2 Synthesis In T Cells From Young And Old F344 Rats. *Immunopharmacology*, 49, 345-354
7. Serano, Pegram, Bigner (1980) Tumorigenic Cell Culture Lines From A Spontaneous Vm/Dk Murine Astrocytoma (Sma). *Acta Neuropathol (Berl)* 51, 53-64
8. Sampson, Ashley, Archer, Fuchs, Dranoff, Bigner (1997) Astrocytoma And Abrogation Of Its Tumorigenicity By Cytokine Secretion. *Neurosurgery* 41, 1365-1373
9. Graeber, Scheithauer, Kreutzberg (2002) Microglia In Brain Tumors. *Glia* 40, 252-259
10. Watters, Schartner, Badie (2005) Microglia Function In Brain Tumors. *Journal Of Neuroscience Research* 81, 447-455

11. Zhu, Parada (2002) The Molecular And Genetic Basis Of Neurological Tumors. *Nature* 2, 616-626
12. Maher, Furnari, Bachoo, Rowitch, Louis, Cavenee, Depinho (2001) Malignant Glioma: Genetics And Biology Of A Grave Matter. *Genes & Development* 15, 1311-1333
13. Heinrich, Wickel, Schneider-Brachert, Sandberg, Gahr, Schwandner, Weber, Brunner, Kronke, Schutze (1999) Cathepsin D Targeted By Acid Sphingomyelinase-Derived Ceramide. *Embo* 18, 5252-5263
14. Delgado, Casas, Liebaria, Abad, Fabrias (2006) Inhibitors Of Sphingolipid Metabolism Enzymes. *BBA* 14, 1958-1972
15. Inderjit, Kalipada, Mushfiquddin, Avtar (1998) Cytokine-Mediated Induction Of Ceramide Production Is Redox-Sensitive. *The Journal Of Biological, Chemistry* 273, 20354-20362
16. Luberto, Hassler, Signorelli, Okamoto, Sawai, Boros, Hazen-Martin, Obeid, Hannun, Smith (2002) Inhibition Of Tumor Necrosis Factor-Induced Cell Death In Mcf1 By Novel Inhibitor Of Neutral Sphingomyelinase. *The Journal Of Biological, Chemistry* 277, 41128-41139
17. Marchesini, Luberto, Hannun (2003) Biochemical Properties Of Mammalian Neutral Sphingomyelinase2 And Its Role In Sphingolipid Metabolism. *The Journal Of Biological, Chemistry* 278, 13775-13783
18. Mizushima (2004) Methods For Monitoring Autophagy. *Ijcb* 36, 2491-1502
19. Granot, Milhas, Carpentier, Dagan, Segui, Gatt, Levade (2006) Caspase-Dependent And -Independent Cell Death Of Jurkat Human Leukemia Cell Induced By Novel Synthetic Ceramide Analog. *Nature Leukemia* 20, 392-399
20. Hitoshi, Tak (2004) Pathways Of Apoptotic And Non-Apoptotic Death In Tumour Cells. *Nature* 4, 592-603
21. Shintani, Klionsky (2004) Autophagy In Health And Disease: A Double-Edged Sword. *Science* 306, 990-995



22. Coopman, Beaujouin, Derocq, Garcia, Grondou-Lassis, Laurent-Matha, Prebois, Rochefort, Vignon (2006) Cathepsin D: Newly Discovered Function Of A Long-Standing Aspartic Protease In Cancer And Apoptosis. *Cancer Letters* 237, 167-179
23. Daido, Kanzawa, Yamamoto, Takeuchi, Kondo, Kondo (2004) Pivotal Role Of The Cell Death Factor Bnip3 In Ceramide-Induced Autophagic Cell Death In Malignant Glioma Cells. *Cancer Research* 64, 4286-4293
24. Reynolds, Maurer, Kolesnick (2004) Ceramide Synthesis And Metabolism As A Target For Cancer Therapy. *Cancer Letters* 206, 169-180
25. Panday, Murphy, Agrawal (2006) Recent Advances In The Immunobiology Of Ceramide. *Experimental And Molecular Pathology* 10, 1016-1018
26. Sawada, Kiyono, Nakashima, Shinoda, Naganawa, Hara, Iwama, Sakai (2004) Molecular Mechanisms Of Tnf- $\alpha$ -Induced Ceramide Formation In Human Glioma Cells: P53-Mediated Oxidant Stress-Dependent And -Independent Pathways. *Cell Death And Differentiation* 11, 997-1008
27. Scarlatti, Sala, Somenzi, Signorelli, Saddhi, Ghidoni (2003) Resveratrol Induces Growth Inhibition And Apoptosis In Metastatic Breast Cancer Cells Via *de novo* Ceramide Signaling. *Faseb* 17, 2339-2341
28. Deigner, Claus, Bonaterra, Gehrke, Bibar, Blaess, Cantz, Metz, Kinscherf (2001) Ceramide Induces Asmase Expression: Implications For Oxldl-Induced Apoptosis. *Faseb* 15, 807-814
29. Zheng, Kollmeyer, Symolon, Momin, Munter, Wang, Kelly, Allegood, Liu, Peng, Ramaraju, Sullards, Cadot, Merrill (2006) Ceramides And Other Bioactive Sphingolipid Backbones In Health And Disease: Lipidomic Analysis, Metabolism And Roles In Membrane Structure, Dynamics, Signaling And Autophagy. *BBA* 1758, 1864-1884
30. Von Haefen, Wieder, Gillissen, Staè Rck, Graupner, Doè Rken, Daniel (2002) Ceramide Induces Mitochondrial Activation And Apoptosis Via A Bax-Dependent Pathway In Human Carcinoma Cells. *Oncogene* 21, 4009-4019

31. Garcí'A-Ruiz, Colell, Mari, Morales, Ferna'Ndez-Checai (1997) Direct Effect Of Ceramide On The Mitochondrial Electron Transport Chain Leads To Generation Of Reactive Oxygen Species. *Jbc* 272, 11369–11377
32. Marasas, Riley, Hendricks, Stevens, Sadler, Gelineau-Van Waes, Missmer, Cabrera, Torres, Gelderblom, Allegood, Martinez, Maddox, Miller, Starr, Sullards, Roman, Voss, Wang, Merrill (2004) Fumonisin Disrupt Sphingolipid Metabolism, Folate Transport, And Neural Tube Development In Embryo Culture And In Vivo: A Potential Risk Factor For Human Neural Tube Defects Among Populations Consuming Fumonisin-Contaminated Maize. *J Nutr.* 134, 711-6
33. Merrill, Nimkar, Menaldino, Hannun, Loomis, Bell, Tyagi, Lambeth, Stevens, Hunter (1989) Structural Requirements For Long-Chain (Sphingoid) Base Inhibition Of Protein Kinase C In Vitro And For The Cellular Effects Of These Compounds. *Biochemistry* 28, 3138-45
34. Kågedal, Zhao, Svensson, Brunk (2001) Sphingosine-Induced Apoptosis Is Dependent On Lysosomal Proteases. *Biochem J.* 359, 335-43
35. Goni, Alonso (2006,2007) Biophysics Of Sphingolipids I. Membrane Properties Of Sphingosine, Ceramides And Other Simple Sphingolipids. *Biochim Biophys Acta* 1758, 1902-21 Kαt 1768, 1309-10
36. Scarlatti, Bauvy, Ventruti, Sala, Cluzaud, Vandewalle, Ghidoni, Codogno (2004) Ceramide-Mediated Macroautophagy Involves Inhibition Of Protein Kinase B And Up-Regulation Of Beclin. *The Journal Of Biological Chemistry* 279, 18384–18391
37. Won, Im, Khan, Singh, Singh (2004) The Role Of Neutral Sphingomyelinase Produced Ceramide In Lipopolysaccharide-Mediated Expression Of Inducible Nitric Oxide Synthase. *Journal Of Neurochemistry*, 2004, 88, 583–593
38. Won, Singh (2006) Sphingolipid Signaling And Redox Regulation. *Biology & Medicine* 40, 1875–1888

39. Lavieu, Scarlatti, Sala, Carpentier, Levade, Ghidoni, Botti, Codogno (2006) Regulation Of Autophagy By Sphingosine Kinase 1 And Its Role In Cell Survival During Nutrient Starvation. *The Journal Of Biological Chemistry* 281, 8518–8527
40. Persaud-Sawin, Boustany (2005) Cell Death Pathways In Juvenile Batten Disease. *Apoptosis* 10, 973–985
41. Daido, Kanzawa, Yamamoto, Takeuchi, Kondo, Kondo (2004) Pivotal Role Of The Cell Death Factor Bnip3 In Ceramide-Induced Autophagic Cell Death In Malignant Glioma Cells. *Cancer Research* 64, 4286–4293
42. Hyun Kim, Choi, Kang, Hwa Kwon, Keun Kim (2005) Ceramide Induces Non-Apoptotic Cell Death In Human Glioma Cells. *Neurochemical Research* 30, 969–979
43. Riboni, Campanella, Bassi, Villani, Gaini, Martinelli-Boneschi, Viani, Tettamanti (2002) Ceramide Levels Are Inversely Associated With Malignant Progression Of Human Glial Tumors. *Glia* 39, 105–113
44. Van Blitterswijk, Van Der Luit, Veldman, Verheij, Borst (2003) Ceramide: Second Messenger Or Modulator Of Membrane Structure And Dynamics? *Biochem. J.* 369, 199-211
45. Ogretmen, Pettus, Wood, Szulc, Bielawska, Obeid, Hannun (2002) Biochemical Mechanisms Of The Generation Of Endogenous Long Chain Ceramide In Response To Exogenous Short Chain Ceramide In The A549 Human Lung Adenocarcinoma Cell Line. Role For Endogenous Ceramide In Mediating The Action Of Exogenous Ceramide. *J. Biol. Chem.* 277, 12960–12969
46. Hinkovska-Galcheva, Boxer, Kindzelskii, Hiraoka, Abe, Goparju, Spiegel, Petty, Shayman, (2005) Ceramide 1-Phosphate, A Mediator Of Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 280, 26612–26621
47. Hanada, Nishijima, Kiso, Hasegawa, Fujita, Ogawa, Akamatsu (1992) Sphingolipids Are Essential For The Growth Of Chinese Hamster Ovary Cells. Restoration Of The Growth Of A Mutant Defective In Sphingoid Base Biosynthesis By Exogenous Sphingolipids.. *J. Biol. Chem.* 267, 23527–23533

48. Nagiec, Baltisberger, Wells, Lester, Dickson (1994) The Lcb2 Gene Of Saccharomyces And The Related Lcb1 Gene Encode Subunits Of Serine Palmitoyltransferase, The Initial Enzyme In Sphingolipid Synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 91, 7899–7902
49. Hanada, Nishijima, Fujita, Kobayashi (2000) Specificity Of Inhibitors Of Serine Palmitoyltransferase (Spt), A Key Enzyme In Sphingolipid Biosynthesis, In Intact Cells. A Novel Evaluation System Using An Spt-Defective Mammalian Cell Mutant. *Biochem. Pharmacol* 59, 1211–1216
50. Van Helvoort, Van't Hof, Ritsema, Sandra, Meer (1994) Conversion Of Diacylglycerol To Phosphatidylcholine On The Basolateral Surface Of Epithelial (Madin-Darby Canine Kidney) Cells. Evidence For The Reverse Action Of A Sphingomyelin Synthase. *J. Biol. Chem.* 269, 1763–1769
51. Kudoh, Velkoff, Wenger (1983) Uptake And Metabolism Of Radioactively Labeled Sphingomyelin In Cultured Skin Fibroblasts From Controls And Patients With Niemann-Pick Disease And Other Lysosomal Storage Diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 754, 82–92
52. Spence, Clarke, Cook (1983) Pathways Of Sphingomyelin Metabolism In Cultured Fibroblasts From Normal And Sphingomyelin Lipidosis Subjects. *J. Biol. Chem.* 258, 8595–8600
53. Marggraf, Kanfer (1984) The Phosphorylcholine Acceptor In The Phosphatidylcholine:Ceramide Cholinephosphotransferase Reaction. Is The Enzyme A Transferase Or A Hydrolase? *Biochim. Biophys. Acta* 793, 346–353
54. [http://www.mdanderson.org/Featured\\_Sites/flowcytometry/](http://www.mdanderson.org/Featured_Sites/flowcytometry/)
55. <http://facs.scripps.edu/facslab.html>
56. <http://www.facslab.toxikologie.uni-mainz.de/engl.%20Websites/zytometrie-engl.jsp>

