

Gradu Amaierako Lana
Biokimika eta Biologia Molekularreko Gradua

Zeramidek autofagian eta apoptosian duten eragina karakterizatzeko metodoa

Egilea:
Andrea Olarte San Juan
Zuzendaria:
Alicia Alonso
Kozuzendaria:
Asier Etxaniz

© 2020, Andrea Olarte San Juan

Hitzaurrea:

Nire gradu amaierako lanaren helburua C16 zeramidak autofagian eta apoptosian duen eragina karakteritzea zen. Helburu hori lortzeko, lehenengo lauhilekoan esperimentuan erabiliko nituen teknikak erabiltzen ikasi nuen eta bigarren lauhilekoan esperimendua egiten hasi nintzen. Proiektuaren lehenengo bi zereginak hasi nituen, hots, SUVen karakterizazioa eta autofagiaren determinazioa Western plapaketa-
ren bidez. Zeramida SUVetan ondo integratzen zela ziurtatu nuen, baita C16 zeramida autofagia aktibatze-
ko gai zela determinatu ere, baina ezin izan nituen lortu nahi genituen erreplika guztiak, ezta falta
ziren zereginak amaitu ere.

Egindako zereginekin etorkizun handiko emaitzak lortu zirela eta laborategira bueltatzeko aukerarik ez
zegoela ikusita, GrAL esperimentalak GrAL bibliografikoan bilakatu beharrean, ikerketa proiektu baten
proposamen batera egokitu nuen, master amaierako lan (MAL) baten proposamen batera hain zuzen ere.
Horrela, orain arte baliagarria izan den metodologia azaltzeko aukera izan dut eta etorkizunean master
bat eginez gero, aplikatzeko aukera izango nuke.

AURKIBIDEA

1.SARRERA	1
1.1 AUTOFAGIA	1
1.1.1 Autofagiaren partehartzaileak eta mekanismoa	1
1.1.2 Autofagiaren paradoxa	3
1.2 ZERAMIDA	4
1.2.1 Zeramiden eragina autofagian	5
1.3 AUTOFAGIA, ZERAMIDAK ETA MINBIZIA	5
1.4 ZERAMIDEN IKERKUNTZA	6
2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK	7
3. METODOLOGIA ETA ZEREGINAK	7
3.1 METODOLOGIA	7
3.2 ZEREGINAK	9
4. KRONOGRAMA	11
5.AURREKONTUA	11
6. AURRETIAZKO EMAITZAK	12
7. ONDORIOAK ETA PROIEKTUAREN JARRAIPEN POSIBLEAK	13
8. BIBLIOGRAFIA	14

1.SARRERA

1.1 AUTOFAGIA

Autofagia zelularen homeostasirako erabakigarria den prozesu katabolikoa da eta hiru mota daude: makroautofagia, mikroautofagia eta txaperonen bidezko autofagia. Lan honetan makroautofagiari buruz bakarrik hitz egingo da eta aurrerantzean autofagia bezala aipatuko da. Autofagia prozesuan bi geruza lipidikoko besikula batek zelularen elementu zitoplasmatikoak inguratzen ditu eta, ondoren, entzima hidrolitikoek batera lisosomekin fusionatzen da. Entzimek bideratzen duten hidrolisi erreazioei esker, digestio intrazelularra gertatzen da. Hala, proteinen eta organuluen kalitatea mantentzea lortzen da, baita ubiquitina proteasoma bidezidorrarekin batera poliubikitinatuta eta agregatuta dauden proteinak degradatzea ere¹.

Autofagia basalaren maila estres-egoeretan areagotzen da, sortzen diren proteina agregatuak degradatzeko eta beharrezkoak diren mantengaiak eta energia sortzeko. Egoera horietan autofagia sustatuko ez balitz, txarto tolestutako proteinek gaixotasun neurodegeneratiboak eragingo lituzkete eta energia eta mantengai faltak heriotza eragingo luke². Hori gutxi balitz, autofagiak histokonpatibilitate handiko konplexuak bideratzen duen antigenoen aurkezpena modulatzeko balio du, baita autoimmunitatea eta tolerantzia erregulatzeko ere³. Horrez gain, patogeno intrazelularren aurkako babesa bermatu eta zelula apoptotikoak irensteko baliagarria da⁴.

Homeostasia eta biziraupena sustatzen duen prozesu kataboliko hain garrantzitsua da, bere erregulazio faltak gaixotasun neurodegeneratiboak, infekzioak, bihotz eta birikietako gaixotasunak, estres metabolikoa eta minbizia eragin ahal dituen. Horregatik, prozesua kontrolatzeko mekanismoa eta horretan eragina duten egitura eta molekulak ezagutzea ezinbestekoa da⁵.

1.1.1 Autofagiaren partehartzaileak eta mekanismoa

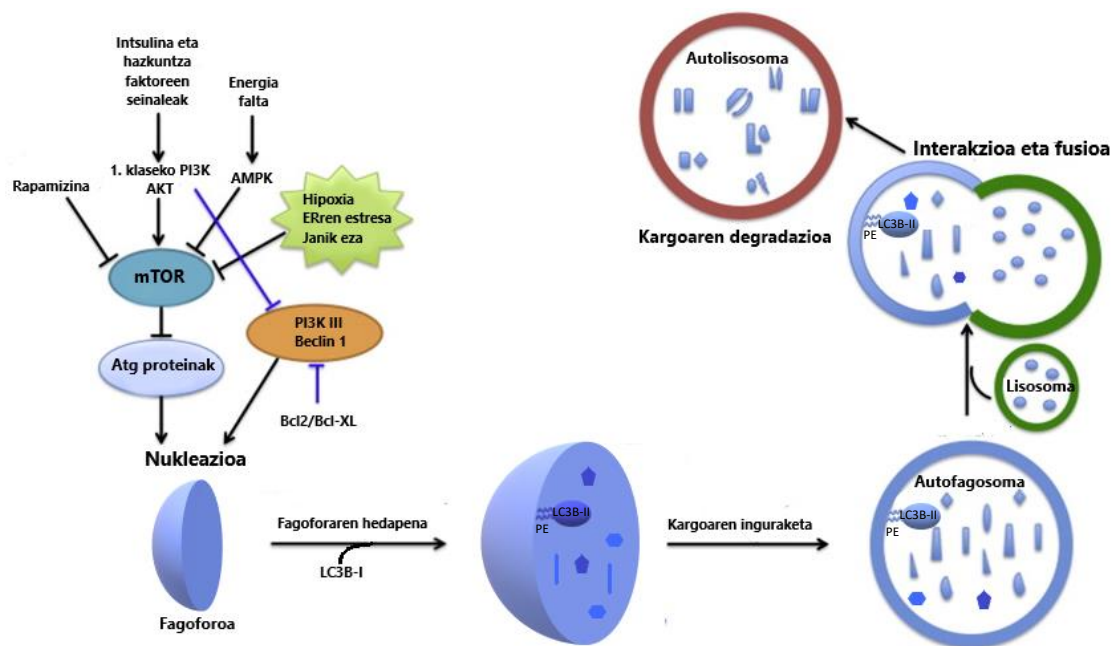
Autofagia prozesuaren degradazio ahalmena autofagosoman, hots, degradatu beharreko egiturak inguratzen dituen lipidozko geruza bikoitzeko organulu iragankorrean oinarritzen da. Autofagosomaren eraketa geruza bakarreko besikula txiki (fagoforoa) baten nukleaziotik hasten da. Jarraian, fagoforoa hedatu egiten da eta, horrela, degradatu beharreko egiturak (kargoa) inguratzen ditu, zitoplasmatik banatuta utzi arte. Ondoren, fagoforoaren mintz bakuna bi mintzetan banatzen da geruza bikoitzeko autofagosoma eratzeko. Azkenik, autofagosoma lisosoma primarioekin fusionatzen da, lisosomen entzima hidrolitikoek kargoa degradatzeko⁶. Hortaz, bi gertaera nagusi daudela esan daiteke; lehenengoa, autofagosomaren biogenesisia eta horrekin batera egiten den kargoaren hautaketa eta, bigarrena, kargoa degradatzeko lisosomekin gertatzen den fusioa.

Autofagosomaren sintesia abiarazteko autofagia prozesua erregulatzen duten proteinen, hots, ATG (*Autophagy-related protein*) proteinen, aktibazioa eta antolaketa hierarkikoa beharrezkoa da⁷. Horretarako, ATG proteinen aktibazioa oztopatzen duen mTOR modulatzailea inhibitu egin behar da. Estres-egoerek (mantenugai falta kasu), rapamizina eta AMPK-k besteak beste, mTOR inhibitu eta, ondorioz, ATG proteinen aktibazioa sustatzen dute⁸. Orain arte, 40 ATG proteina baino gehiago identifikatu dira ugaztun zeluletan. Azken urteetan proteina horien inguruan ikerketa asko egin diren arren, ATG proteinen arteko interakzioak eta bakoitzaren funtzioak ez dira guztiz argitu⁹.

Behin proteina autofagikoak aktibatu direla, autofagosomaren eraketan parte hartzen duen lehenengo proteina, ULK kinasa konplexua da. Baldintza normaletan mTOR konplexuak ULK kinasak konplexuarekin elkarreragiten du eta, ondorioz, haren kinasa aktibitatea inhibitzen du. mTOR inhibitzen denean, ordea, ULK kinasa konplexua disoziatu eta aktibatu egiten da. Hala, beste hainbat ATG proteina errekrutatuko ahalko ditu fagoforoaren nukleazioa hasteko. Adibidez, fagoforoaren nukleazioa eta hedapena ahalbidetzen duen ATG9 proteina. Ondoren, fosfatidilinositol 3 kinasa konplexua I (PI3KI) fagoforoa hedatzen ari den gunera errekrutatzen da eta PI3Petan aberatsak diren gunek eratzen ditu. Gune horiek fagoforoaren hedapen prozesurako garrantzitsuak dira, baita horietara batzen diren WIPI proteinak ere¹⁰.

Jarraian, autofagosomaren heltze prozesuan oso garrantzitsuak diren proteinak errekrutatzen dira, LC3/GABARAP familiako proteinak hain zuzen ere. Familia hori 6 proteinaz osatuta dago eta horietatik gehien ikertu dena eta bere funtzioa hoberen ezagutzen dena LC3B da. LC3B zitoplasman LCB3-I moduan sintetizatzen da, karboxilo terminalean glizina bat duelarik¹¹. Autofagia aktibatzen denean, Atg4 proteasak LCB3-I moztu egiten du eta, ondoren, Atg7 proteinak aktibatzen du. Behin aktibo dagoela, Atg3 proteinara transferitzen da. Prozesu horri esker, karboxilo terminaleko glizina autofagosomaren fosfatidiletanomalinarekin (PE) batu daiteke¹². Ondorioz, LC3-II aktiboa sortzen da, autofagosomaren mintzera kobalentei atxikituta, degradatu beharreko organuluak edo egiturak identifikatzeko eta enkapsulatzeko ahalmena duena. Horrek autofagia prozesuan degradatu beharrekoa modu selektiboan hautatzea ahalbidetzen du¹³. Gainera, LC3-II autofagosomara lotuta egotearen ondorioz, autofagiaren aktibazioa identifikatzeko gehien erabiltzen den markatzailea da¹⁴.

ATG proteina guztiak errekrutatuta eta fagoforoa itxi ondoren, autofagosoma heldua SNARE proteinen laguntzaz lisosoma primarioekin fusionatuko da. Lehenik eta behin, autofagosomaren kanpoko geruza lisosomen mintz bakunarekin fusionatuko da. Ondoren, lisosomen entzima hidrolitikoek autofagosomaren barruko mintza degradatuko dute, enkapsulatutako egiturak degradatu ahal izateko¹⁵.



1. irudia: Autofagia prozesuaren eskema, zeinetan prozesuaren aktibatzaileak, inhibitzaileak eta gertaera nagusiak azaltzen diren. Jiang *et al.* (2014) egindako lanean agertzen den eskeman oinarrituta dago.

1.1.2 Autofagiaren paradoxa

Autofagia biziraupen prozesuekin erlazionatuta dago, besteak beste, proteinen eta zaharkituta dauden organuluaren degradazioarekin. Egitura horiek degradatzen ez badira, zelula hil egin daiteke edo gaixotasunak garatu. Horrez gain, estres-egoeretan mantengai eta energia faltari aurre egiten dion prozesua da eta zelula-heriotza inhibitzen du zelula berreskuratzen den bitartean hil ez dadin¹⁷. Hori horrela izanda, iRNA bidez autofagia geneak edo prozesuaren urratsen bat oztokatzen duen inhibitzaile kimikoak erabiltzen badira, zelula hil egiten da. Hortaz, egoera horietan autofagiak biziraupena sustatzen duela esan daiteke¹⁸.

Hala ere, beste zenbait egoeratan apoptosi prozesuaren aurrekaria izan daiteke. Are gehiago, azken urteotan apoptosiarekiko independentea den zelula-heriotza programatua ere eragin dezakeela ikusi da¹⁹. 2011n Shen eta Codognok autofagiak eragindako zelula-heriotza edo programatutako II. zelula-heriotza definitu zuten. Heriotza mota horretan autofagia izango litzateke eragile nagusia eta ez prozesuaren aurrekari edo laguntzailea. Horrez gain, hiltzen ari ziren zeluletan, autofagia heriotzaren eragilea zela ziurtatzeko, hiru irizpide definitu zituzten: (i) zelula-heriotza apoptosiaren inplikaziorik gabe gertatzen da, (ii) hiltzen ari diren zeluletan, autofagiaren fluxua zein autofagiaren markatzaileen maila handitzen da (iii) autofagiaren inhibizioak heriotza saihesten du²⁰. Autofagiak heriotza bi modutan eragin ahal du. Alde batetik, gehiegi aktibatzen bada, zitoplasma eta organulu askoren degradazioa induzitu dezake eta horrek bizi-funtzioen galera eta heriotza eragin²¹. Bestetik, zelularen biziraupena sustatzen duten proteina jakin batzuk degradatu ditzake eta zelula-heriotza eragin²².

Duela gutxi zelula-heriotza programatuaren funtzioa egotzi zitzaionez, bi autofagia mota bereizi behar dira: biziraupena sustatzen duena, hots, autofagia bizigarria eta heriotza eragiten duena, autofagia hilgarria. Paradoxa hori kontrolatzen duten mekanismoak oraindik ezezagunak dira¹⁹, baina hainbat ikerketek agerian utzi dute zeramiden eragina paradoxan handia dela; izan ere, zelula-heriotza funtzioa betetzeaz gain, autofagia ere eragin dezaketela ikusi da²³.

1.2 ZERAMIDA

Zeramidak esfingolipidoen bidezidorreko bitartekari nagusiak dira. Seinale-molekula oso hidrofobikoak dira eta amida lotura bidez lotuta dauden esfingosina eta kate hidrokarbonatu (14-26 C) batez osatuta daude²⁴. Zeramida endogenoa *de novo* biosintesiaren bidez edo beste esfingolipidoen degradazio bidez eratu daiteke.

De novo zeramida biosintesian, zeramida sintasak (CerS) eta serina palmitoil transferasa (SPT) entzimek parte hartzen dute. SPT entzimak palmitoil-CoA eta serina kondentsatuz, dihidroesfingosinak eratzen ditu. Ondoren, 1-6 zeramida sintasak (CerS1-6) zeramiden aurrekariak diren dihidrozeramidak sintetizatzen ditu. CerS guztiek ez dute espezifitate berdina izango eta, ondorioz, luzera ezberdineko dihidrozeramidak eratuko dira. Desaturasek dihidrozeramidei laugarren eta bostgarren karbonoen artean lotura bikoitza gehitzean, asegabetasun ezberdineko zeramidak sortzen dituzte²⁵. Beste esfingolipidoen degradazio bidezko sintesian, berriz, esfingomielinasek (SMasa) eta zeramidasek hartzen dute parte, besteak beste²⁶. Are gehiago, ikerketek adierazi dute zeramida guztiak ez direla berdin sortzen eta gantz azidoen luzerak, kokapen zelularrak eta lipido- eta proteina-ituek estres egoera eta zelula/ehun desberdinetan dituzten funtzio espezifikoak definitzen laguntzen dituztela²⁷.

Zeramidak biokimika eta biofisika arloan asko ikertu dira. Ikuspuntu biokimikotik, apoptosian eta bizi-zikloaren erregulazioan bigarren mezulari gisa garrantzi handia dute. Biofisika alorrari dagokionez, propietate oso bereizgarriak dituzte; izan ere, kontzentrazio baxuetan ere bigeruzak lipidikoko propietate biofisikoetan eragin handia eduki dezakete. Asko laburbilduz, hauek dira zeramidaren propietate biofisiko garrantzitsuenak: oso hidrofobikoak dira, bigeruzak lipidiko baten molekula-ordena asko handitzen dute eta horrek mintzaren gogortasuna handitzen du, kurbadura negatiboa eragiten dute, fosfolipidoz osatutako mintzetan fase desberdinak edo domeinu lipidikoak eratu ditzakete eta, azkenik, mintz lipidikoak desegonkortu eta iragazkorragoak bihurtu ahal dituzte. Propietate horiek zeramiden faktore ezberdinek definitzen dituzte. Adibidez, kate azilikoaren luzerak hidrofobizitatea determinatuko du: C2 zeramida uretan disolbatu daiteke, baina C18 zeramida ez²⁸.

Zeramidari buruzko ikerketa asko abian egon arren, ikerkuntza gutxi bideratu dira zeramiden propietate biofisikoen eta zelulan duten efektuen arteko erlazioa ulertzera. Horregatik, proiektu honetan propietate biofisiko desberdinak dituzten zeramidak erabiliko dira, efektu biokimiko/propietate biofisiko erlazio honen ulerpenera laguntzeari begira.

1.2.1 Zeramiden eragina autofagian

Zeramidek estres egoerek bezala autofagia sustatu dezakete mTOR bidezidorraren bidez edo Beclin eta Bcl-2 konplexua disoziatuz. Zeramidek disoziazio hori bi modutan eragin dezakete. Alde batetik, JNK1 aktibatu dezakete eta horrek Bcl-2 fosforilatu eta, ondorioz, Beclin-1etik disoziatu. Bestetik, zeramidek BH3 domeinua duen proteina metatu dezakete, hots, BNIP3 proteina eta horrek Beclin-1 proteinaren BH3 domeinuek Bcl-2 proteinarekin eratzen dituen interakzioak apurtu ditzake²⁹. Zeramida motak, egoera patologikoak eta zeramiden sintesiak sustatuko den autofagia motan eragina izango dute. Hala ere, ez dago argi zeramidek aipatutako proteinekin interakzio zuzena duten ala aktibazio eta disoziazio horiek zeharkako efektu baten ondorioz sortzen diren.

Zeramidek autofagia bizigarria indultzeko beste modu bat, mantenugaiak garraiatzen dituzten proteinen adierazpena gutxituz lortzen da; izan ere, garraiatzailerik gabe energia gutxitu eta heriotza eragin daiteke. Hortaz, autofagiak zeramidek eragindako mantenugai eta energia galerei aurre egiten die eta horrek zelularen biziraupena sustatzen du³⁰. C2 zeramidak ere Akt eta mTOR inhibituz eta ERK1/2 aktibatuz autofagia bizigarria sustatzeko gai dira³¹. C2 zeramida ikerketan askotan erabiltzen da; izan ere, haren azil-katea oso motza denez, errazago disolbatzen da eta, ondorioz, maneiatzeko errazagoa da. Hala ere, zelulan oso gutxi agertzen denez, bere garrantzi fisiologikoa oso eztabaidagarria da.

Beste zenbait kasutan, ordea, zeramidek autofagia hilgarria sustatu dezaketela ikusi da. Glioma zeluletan C18 zeramidaren sintetizatzen duen CerS1en adierazpena areagotzen denean edo C18 zeramida exogenoa gehitzen denean, erretikulu endoplasmaticoaren estresa aktibatu eta PI3K/AKTren bidezidorra inhibitzen da. Horren ondorioz, autofagia hilgarria aktibatu eta zelula hil egiten da³².

1.3 AUTOFAGIA, ZERAMIDAK ETA MINBIZIA

Zeramidak proliferazioa inhibitzeko erantzun asko sustatzen ditu, hala nola zelula-heriotza, seneszentzia, bizi-zikloaren etenaldia eta desberdintzapena. Horrez gain, ikerketa askok erakutsi dute zeramidak minbizidun zelulen heriotzarekin erlazionatzen diren prozesuekin zerikusia duela, besteak beste, apoptosiarekin, nekroptosiarekin, autofagiarekin eta mitofagiarekin¹⁹. Horregatik, zeramida minbizidun zelulen progresioa eta tumoreen hazkuntza inhibitzeko etorkizun handiko lipidoa da.

Minbizietan autofagia erregulatzen duten onkogene eta tumoreen ezabaketa bideratzen duten gene asko mutaturik daude. Adibidez, PI3-kinasa aktibatuta dago minbizidun zeluletan eta, ondorioz, mTOR aktibatu egiten da eta horrek autofagiaren inaktibazioa dakar. Autofagia inhibituta dagoenean, kaltetuta dauden mitokondria eta peroxisomen metaketa gertatzen da. Azken horiek oxigenoa espezie erreaktiboak sortu ahal dituzte eta, ondorioz, DNA kaltetuko duen toxizitatea areagotu egiten da. Hortaz, autofagiaren inaktibazioak tumoreen sintesia suspertzen duela esan daiteke³³.

Dena den, minbizidun zeluletan autofagia ez dago beti inaktibatuta; izan ere, minbizia sendatzeko zenbait tratamenduk zeramiden sintesia areagotzen dutela ikusi da eta azken horiek autofagia³⁴. Minbiziaren azken etapetan areagotutako autofagia biziraupena sustatzen duen mekanismoa izan daiteke. Prozesu horri esker, minbizidun zelulek behar dituzten mantenugaiak lortzen dituztelako eta kalte intrazelularrak konpontzen dituztelako³⁵.

Hortaz, zeramida bakoitzak autofagiaren eta zelula-heriotzaren erregulazioan duen funtzioa ulertzea lortzen bada, minbiziaren fase bakoitzerako eraginkorrena den tratamendua erabili ahalko genuke eta, horrela, egoera bakoitzean beharrezkoa den autofagia mota edo apoptosia aktibatzea. Adibidez, Xiao Su-ren taldeak tratamenduekiko erresistentzia duten minbizidun zelulei aurka egiteko, nanoliposomen bidezko terapia konbinatua erabili zuen. Nanoliposometan doxorubizina, hots, minbizidun zelulen heriotza eragiten duen antibiotikoa eta 1,2-distearoil-sn-glizerol-3-fosfoetanolaminara (PEG) konjugatuta dagoen C16 zeramida integratu zuten. Konbinaketa horri esker, minbizidun zelulek garatzen dituzten erresistentziak gainditzea lortu zuten; izan ere, C16 zeramidak aktibitate zitotoxikoa areagotzen zuen³⁶.

1.4 ZERAMIDEN IKERKUNTZA

Zeramidak oso molekula hidrofobikoak direnez, zelulei exogenikoki gehitzea zaila da; izan ere, kate luzeko zeramidak (C16 eta C18, bestak beste) ez dira ondo disolbatzen. Zeramiden kantitatea zelulan handitzeko beste metodo bat haien sintesia areagotzea da, aktibatzaileak erabiliz edo CerSintasa transfektatuz. Dena den, zeramidek efektua eragiteko kontzentrazio txikiak behar dituzte eta metodo horiekin eratzen den zeramida kantitatea kontrolatzea oso zaila da³⁷. Azken urteetan, Petter Slotte-ren taldeak zeramida zelulei gehitzeko metodologia berri bat garatu du. Metodologia horrekin zeramida Cholesteryl Phosphocolina (CholPC) lipido sintetikoarekin nahastuz eta liposoma txikiak eratuz, kate luzeko zeramidak HeLa zeluletan modu egokian sartu daitezkeela frogatu dute. Dena den, ikerketa horretan ez zen aztertu gehitutako zeramidaren eragina autofagiaren aktibazioan³⁸.

Aurretik aipatu den bezala, ikerketa asko egin dira zeramidek autofagia eta heriotza-zelularrarekin duten erlazioa azaltzeko. Hala ere, zeramiden funtzioa guztiz ulertzeko ikerketa horietatik lortutako datu guztiak batzen direnean, normalizazio arazo bat dago; izan ere, ikerkuntza bakoitzak zeramida mota jakin bat (C2,C16,C18) eta zeramida zelulari gehitzeko modu jakin bat erabiltzen du. Are gehiago, ikerketa bakoitzak zeramidek eragiten dituzten efektu desberdinak aztertzen ditu eta, gainera, zelula mota desberdinetan^{31,32,36}. Horregatik, zenbait zeramida moten funtzioa aztertzeko ezinbestekoa da horiek zelulei gehitzeko metodologia eta zelula mota bakarra erabiltzen duen ikerketa garatzea. Gainera, zelula-heriotzaz gain, autofagiaren aktibazioa aztertzea ere berebizikoa da, baita aktibatzen duten autofagia hilgarria edo bizigarria den jakitea ere. Azkenik, garrantzitsua da fisiologikoki garrantzitsuak ez diren zeramidak erabili beharrean (C2 eta C6), kate luzea duten eta propietate biofisiko (C16, C18, C24) bereziak dituzten zeramidak erabiltzea, maneiatzeko zailak izan arren²⁸.

2. HIPOTESIAK ETA HELBURUAK:

Orain arte egindako ikerketek agerian utzi dute zeramiden inplikazioa autofagiaren erregulazioan oso handia dela eta zeramiden sintesiak, morfologiak eta kokapen zelularrak besteak beste, eragina izan ahal dutela. Horregatik, proiektu honen helburu nagusia zeramida mota desberdinek autofagiaren kontrolaren gain duten eragina karakterizatzea da eta hori ikertzeko beharrezkoa den metodo orokorra osatzea. Metodologia horrek, zeramidek biziaren eta heriotzaren arteko paradoxan duten eragina ulertzen lagunduko liguke, hots, zeramidek zelulen biziraupen (autofagia bizigarria) eta heriotza (autofagia hilgarria, apoptosia eta nekrosia besteak beste) prozesuak aktibatze eta erregulatzeko duten gaitasuna ulertzen, hain zuzen ere. Helburu nagusia kontuan hartuta, honako hauek dira proiektuaren azpi-helburuak:

1. Zeramida motek CholPC lipidoarekin batera HeLa zeluletan autofagia eragiten duten jakitea eta eragingo balute, autofagia aktibatze behar diren kontzentrazioak determinatzea.
2. Autofagia sustatzen duen kontzentrazioetan heriotza-zelularra gertatzen den aztertzea, ezaugarri apoptotikoak eta nekrotikoak aztertuz.
3. Zeramidek sustatzen duten autofagia motaren karakterizazioa, hots, induzitzen duten autofagia bizigarria edo hilgarria den aztertzea.

3. METODOLOGIA ETA ZEREGINAK:

3.1 METODOLOGIA

Aukeratutako zeramida motak

Lan honetan hiru zeramida mota erabiltzea erabaki da, C6 (Avanti Polar Lipis, 860506P), C16 (Avanti Polar Lipids, 860051P) eta C24:1 (Avanti Polar Lipids, 860525P). C16 eta C24:1 fisiologikoki oso garrantzitsuak dira eta propietate biofisikoa desberdinak dituzte. C6 zeramida, ordea, fisiologikoki ez da hain garrantzitsua, baina bere kate azilikoa motza denez, entsegu askotan erabili da²⁸.

Zelula-lerroaren aukeraketa

Esperimenturako HeLa zelulak (ATCC CCL-2) erabiliko dira; izan ere, autofagia bizigarria edo hilgarria ikertzeko orain arte egin diren esperimentu askotan HeLa zelulak erabili dira. Gainera, zeramida zelulan sartzeko erabiliko den metodologian HeLa zelulak erabiltzen dituzte. Hortaz, zelula horiek erabiliz gero, emaitzak alderatzeko orduan errazagoa izango da eta protokoloa zehatz-mehatz jarraitzen dela ziurtatzen da³⁸.

Zeramidatan aberatsak diren SUVen eraketa

Zeramida zeluletan integratzeko Petter Slotte-ren taldeak proposaturiko protokoloa jarraituko da. Ikerlari talde horrek zeramidaren hidrosolugarritasuna handitzen duen molekula bat sortu du, kolesterilfosfolina (CholPC)³⁸. Molekula horren buru polarrak zeramida uretatik babesten du eta, ondorioz, zeramida lamela bakarreko besikula txikietan (*small unilamellar vesicles*, SUV) integratzea ahalbidetzen du. Hasteko, zeramida eta CholPC lipidoen 1:1 proportzioko nahasketa deshidratatu egingo da, nitrogeno gasa eta hutsa egiten duen ponpa erabilia. Ondoren, PBS bufferra gehituta lipidoen nahasketa hidratatu egingo da mintz askotariko besikulak (MLV, multilamellar vesicle) lortzeko. Horretarako, 20 minutuz 3 minutuko bainu eta 1 minutuko vortexeko zikloak egingo dira. Bainuaren tenperatura lipidoen trantsizio tenperatura (T_m), hots, fase zurrunik fase jariakorrera pasatzeko behar den tenperatura baino pixka bat altuago izan behar da. C16 zeramidarena oso altua da, 90°C hain zuzen ere eta CholPCrena, ordea, zero baino txikiagoa. Hortaz, biak nahasten direnean, zeramidaren hidrosolugarritasuna handituko da eta, ondorioz, bere trantsizio tenperatura txikituko edo desagertuko da³⁹. Azkenik, MLVak SUV bilakatzeko 40 minutuz sonikatu egingo dira³⁸.

SUVen karakterizazioa kalorimetria eta TCL bidez

Behin intereseko SUVak lortuta, zeramida ondo integratu dela ziurtatuko da. Horretako, bi teknika erabiliko dira: kalorimetria eta geruza meheko kromatografia (*thin layer chromatography*, TLC). Kalorimetriak trantsizio tenperaturak neurtzen ditu. Ondorioz, SUVetan zeramida integratzen bada, ez da zeramidaren trantsizio tenperatura 90°C-tara ikusiko eta SUVak ondo eratu direla jakingo da.

TLCK, ordea, SUVetan integratuta dauden zeramida eta CholPC polaritatearen arabera banatuko ditu. Horretarako, TLCaren plaka oxalatorekin aktibatuko da eta, ondoren, berogailuan ordu batez lehortuko da. Jarraian, lagin bakoitzaren (zeramida, CholPC, SUV eta MLVak) 30 mM eta fase mugikorra prestatuko dira. Ondoren, laginak plakan gehituko dira eta plaka fase mugikorrean barneratuko da. Laginak goraino igo direnean, plakari azido sulfurikoa gehitu eta bost minutuz itxarongo da. Azkenik, plaka lehortuko da konposatu bakoitza ondo bereizi arte.

Autofagiaren detekzioa Western plapaketa bidez

Western plapaketa erabilia zeramidak autofagia aktibatzen duen ala ez neurtuko da; izan ere, teknika horri esker, autofagiaren markatzailea, hots, LC3B-II identifikatu daiteke. Egoera normalean LC3B-Ien banda ikusten da 19-20 kDa inguruan, autofagia aktibatzean bigarren banda bat ikusten da (LC3B-II) 16-17 kDa inguruan. LC3B proteina ikusarazteko erabiliko diren antigorputz primario eta sekundarioak honako hauek dira: untxi anti-LC3B antigorputz monoklonala (Abcam, ab483940) eta HRP lotuta duen anti-untxi antigorputz sekundarioa (Santa Cruz, sc-2357). Horrez gain, karga kontrol gisa GAPDH proteinaren aurkako antigorputz primario (Santa Cruz, sc-47724) eta sekundarioak erabiliko dira (Santa Cruz, sc-2954)

Autofagiaren detekzioa mikrokospio konfokala erabiliz

Autofagia inaktiboa duen zelula bati LC3Bren aurkako immunofluoreszentzia egiten denean, zitoplasma osoan markaketa homogeneo ikusten da, LC3B-I proteina zitosolikoa delako. Autofagia aktibatzean denean, ordea, LC3B-II autofagosometara batuko da eta, ondorioz, markaketa zitoplasmako besikuletan ikusiko da. Hori ikusarazteko ohiko immunofluoreszentzia protokoloa erabiliko da. Hasteko, kristalezko estalkietan hazitako zelulak zeramidarekin tratatuko dira. Ostean, paraformaldehido % 4rekin fixatuko dira eta, jarraian, Triton X-100ekin permeabilizatuko dira antigorputzak zeluletan sartu ahal izateko. LC3B markatzeko lehenengo antigorputza (untxi anti-LC3B Ab monoklonala 1:1000 (Abcam, ab48394)) gehituko da, ondoren, fluoreszentzia duen bigarren antigorputza (Alexa 488 anti-rabbit, Thermo Fisher, A11008). Zelulen nukleoak DAPIrekin markatuko dira (Sigma-Aldrich, 268298), erreferentzia bezala erabiltzeko. Markatuta dagoen LC3B proteina ikusteko Nikon Eclipse C1 mikroskopio konfokala erabiliko da, 488nm-tan kitzikatuz eta 510 nm-tan igorpena jasoz.

Zelula-heriotzaren determinazioa fluxu-zitometria erabiliz

Zeramidarekin tratatutako zelulak apoptosia edo nekrosia jasaten duten aztertzeko, Annexin V/PI kita erabiliko da (BD biosciences, 556547). Kit horretan fluoreszenteki markatuta dagoen Annexin V proteina zeluletara gehitzen eta apoptosi goiztiarra jasaten duten zeluletara batuko da, bere kanpo-mintzean PS (Phosphatidylserine) lipidoa dutelako. Propidiodia ioduroa (PI) mintz plasmatikoa guztiz iragazkorra duten zeluletan bakarrik sartuko da, hots, apoptosi berantiarrean edo nekrosian dauden zeluletan. Ondorioz, zelula horiek fluoreszenteki markatuta egongo dira. Beraz, Annexin V/PI kita zitometroarekin batera erabiliz, zelula-hazkuntzan egoera onean, apoptosian edo nekrosian dauden zelulen ehunekoak jakin daitezke³¹.

Inhibitzaile eta aktibatzaileak

Aztertuko diren prozesuen (autofagia eta heriotza zelularra) karakterizazioa egiteko, lan askotan erabili diren aktibatzaile eta inhibitzaileak erabiliko dira. Aktibatzaileak kontrol positiboak edukitzeko erabiliko dira. Horrela, teknikak ondo ateratzen ari direla ziurta daiteke. Autofagiaren aktibatzaile bezala rapamizina erabiliko da (Santa Cruz, sc-3504) eta apoptosia aktibatzeke staurosporina (Santa Cruz, sc-3510A). Autofagia inhibitzeke 3-MA (Santa Cruz, sc-3504) eta Wortmannina (Santa Cruz, sc-3505).

3.2 ZEREGINAK

1. SUVen eraketa eta karakterizazioa

Lehenik eta behin, aukeratutako zeramidak CholPCrekin SUVak eratzeko gai direla ziurtatuko da. Horretarako, kalorimetria eta TLC metodologiak erabiliko dira. Karakterizazioa beharrezkoa da kate oso luzeko zeramidek zailtasunak eman ahal dituztelako. SUVak CholPCrekin eratu ezin badira, zeramidak fosfatidilkolina (PC) lipidoarekin nahastuko dira. Ikerkuntza askotan zeramidek PC lipidoarekin liposomak eratu ahal dituztela ikusi baita²⁸.

2. Autofagia eta zelula-heriotza detektatzeko tekniken balioztatzea

Gure taldean HeLa zelulak erabiltzen diren lehenengo aldia denez, autofagia eta apoptosi prozesuak zelula horietan Western plapaketa, mikroskopia konfokala eta zitometria bidez modu egokian detektatu daitezkeela ziurtatzeko prozesu bien aktibatzaileak erabiliko dira. Gero tratamendu horiek zelulei zeramidak gehitzen diren esperimentuetan erabiliko dira kontrol positibo bezala. Kontrol positiboak edukita, autofagiaren inhibitzaileak ere erabiliko dira, haien kontzentrazio egokiak aukeratzeko.

3. Zeramidek autofagiaren aktibazioan duten eragina aztertzea

Zelulak zeramida/CholPC SUVekin tratatuko dira 24 orduz. Erabilitako kontzentrazioak 200 μ M-etik behera izango dira diluzio seriatu batean eta aurretik egindako ikerketetan oinarrituta hautatuko dira³⁸. Autofagiaren aktibazioaren kontrol positibo bezala rapamizinarekin tratatutako zelulak erabiliko dira. Tratutako zeluletan autofagia aktibatu den ala ez determinatzeko, Western plapaketa eta immunofluoreszentzia metodoak erabiliko dira.

4. Zeramidek zelula-heriotza eragiteko duten gaitasuna aztertzea

Zelulak autofagia detektatzeko erabili diren baldintza berdinetan tratatuko dira eta Annexin V/PI kitaren eta zitometroaren bidez aztertuko dira. Esperimentu horri esker, HeLa zelulak apoptosian edo nekrosian zein proportzioetan dauden jakin dezakegu. Apoptosiaren aktibazioaren kontrol positibo gisa staurosporinarekin trataturiko zelulak erabiliko ditugu.

5. Zeramidek eragindako autofagia motaren karakterizazioa

Zeramidek induzitzen duten autofagia mota karakterizatzeko, hasieran egindako esperimentuetan autofagia aktibatzeke determinatu diren baldintzak erabiliko dira. Horrez gain, zitometroan Annexin V/PI kita erabiliz, heriotza-tasa neurtuko da eta honako hau hartuko da kontuan: autofagiaren inhibitzailea gehitzean heriotza-tasa murrizten bada, autofagiak heriotza prozesuan laguntzen duela onartuko dugu, hots, zeramidak autofagia hilgarria eragiten duela. Inhibitzaileak, heriotza-tasa handitzen badu, ordea, zeramidak autofagiaren paradoxan duen eragina biziraupena sustatzea dela onetsiko da. Emaidza horiek zenbait gauza ulertzen lagunduko digute: zeramida mota bakoitzak aktibatzen duen autofagia mota, zeramida mota berberak autofagia hilgarria zein bizigarria kontzentrazioaren arabera aktibatu ditzaketen edo zeramidek kontrolatzen duten erregulazioa askoz konplexuagoa den.

4. KRONOGRAMA

ZEREGINA	HIRUHILEKOAK			
	I	II	III	IV
1. SUVen eraketa eta karakterizazioa	×			
2. Autofagia eta zelula-heriotza detektatzeko tekniken balioztatzea	×			
3. Zeramidek autofagiaren aktibazioan duten eragina aztertzea		×		
4. Zeramidek zelula-heriotza eragiteko duten gaitasunaren azterketa			×	
5. Zeramidek eragindako autofagia motaren karakterizazioa				×
6. Datuen analisia eta emaitzen txostena idatzi				×

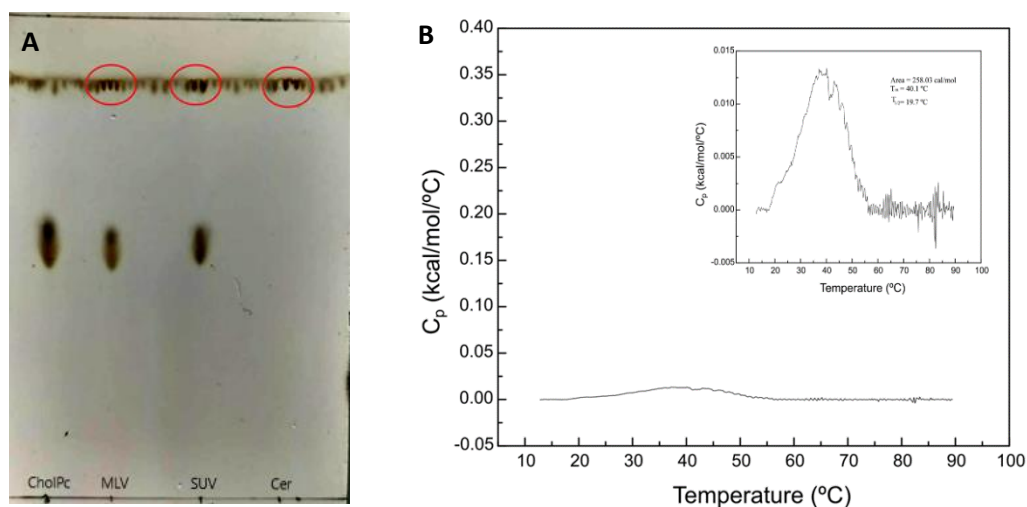
5.AURREKONTUA

MATERIALA	AURREIKUSITAKO PREZIOA
Material orokorra: pipeten puntak, eskularruak, Eppendorf hodiak, pipetak, erreaktiboak eta beirazko materiala, besteak beste.	400
Zelulen-hazkuntzarako materiala: medioa, plaka normalak, antibiotikoak, tripsina...	450
Lipidoak eta erreaktiboak	700
Western plaketarako materiala: markatzaileak, antigorputzak, errebelatzeko erreaktiboak...	850
Mikroskopia konfokalarentzako materiala: antigorputzak eta portak besteak beste.	600
Mikroskopia konfokala (SGIKER, FBB) ordu batez 10 aldiz erabiltzeak dakarren gastua.	800
Zitometriarako materiala: Anexin V/PI kita, FACSSFlow	750
TOTALA:	4.550

6. AURRETIAZKO EMAITZAK:

Peter Slotte-ren taldeak proposatu duen metodologiari esker³⁸, C16 zeramidetan aberatsak diren mintz bakuneko besikula txikiak, hots, SUVak sintetizatzea lortu da. Horrez gain, kalorimetria eta TLC teknikei esker, zeramida SUVetan integratu dela ziurtatu da.

TLC teknika erabilia SUVek eta MLVek dituzten osagaiak polaritatearen arabera bereiztea lortu da. Gainera, kontrol positiboak erabilia zeramida integratu den ala ez jakin ahal izan da. 2A irudian ikus daitekeen bezala, bai MLVek, bai SUVek kontrol positiboak duen puntu berdina dute goiko aldean. Hortaz, zeramida SUVetan integratzen dela ziurra daiteke.

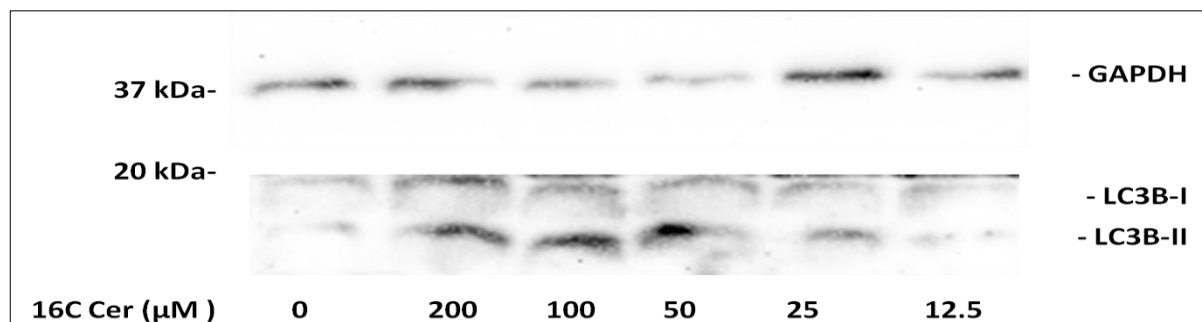


2. irudia: Zeramidaren integrazioa SUVetan. (A) CholPC, SUV, MLV eta C16 zeramidaren TLC. (B) C16:CholPC laginaren termograma eta irudiaren barruan trantsizio endotermikoaren zooma agertzen da.

Zeramida ondo integratu dela ziurtatzeko TLC teknika egiteaz gain, kalorimetria ere egin da. Azken teknika horrekin zeramida ondo integratu dela ziurtatzeaz gain, zeramida SUVetan zein egoeran dagoen aztertu da, hots, zeramida gel-fasean edo fase fluidoan dagoen. Kalorimetroak lipidoek fase batetik bestera aldatzeko behar duten beroa neurtzen du eta aldaketa hori zein tenperaturatan gertatzen den esaten du. Termograman (2B irudia) trantsizio endotermikoa 20-60°C artean gertatu dela ikusten da. Beraz, 60°C-tik aurrera nahasketaren osagai guztiak fase fluidoan daudela ziurra daiteke eta zeramida nahasketan integratzen dela; izan ere, ez da zeramidaren beste trantsiziorik ikusten termograman. Beste era batera esanda, zeramida ondo integratuta egongo ez balitz, zeramidaren trantsizio tenperaturan (90°C-tan) piko bat ikusiko zen.

Dena den, termograman ikusten den entalpiaren balorea (azalera) oso baxua da; izan ere, SUVetan dagoen zeramida CholPCrekin nahastuta dagoenez, zeramidaren hidrosolugarritasuna handitzen da eta, ondorioz, fase batetik bestera aldatzeko behar den beroa gutxitu edo desagertu egiten da. Hau da, CholPCri esker, zeramida fase jariakorrera igarotzen da zuzenean eta, ondorioz, ez da pikoa agertzen³⁹. Jariakortasuna handipen hori garrantzi handiko ezaugarria izan daiteke SUVak zeluletan ondo sartzeko.

Ondoren, lortutako C16 zeramidadun SUVak HeLa zelulekin 24 orduz inkubatu ziren, Western plaketaren bidez C16 zeramidak autofagia aktibatzen duen determinatzeko; izan ere, teknika horri esker, autofagiaren markatzailea, hots, LCB3-II neurtu daiteke.



3. irudia: C16 zeramidetan aberatsak diren SUVekin 24 orduz inkubatutako zelulen laginen Western plaketaren emaitza.

200 μM , 100 μM , 50 μM eta 25 μM C16 zeramida kontzentrazioetan LC3B-II banda ikus daiteke. Ondorioz, C16 zeramidak kontzentrazio horietan autofagia indultzeko ahalmena duela jakin daiteke. Esperimentuaren hurrengo teknikan, hots, fluxu-zitometriari, mikroskopia konfokalean eta Western plaketan, kontzentrazio horietatik egokienak erabiliko ziren.

7. ONDORIOAK ETA PROIEKTUAREN JARRAIPEN POSIBLEAK

Planifikatuta zegoen guztia egiteko denborarik izan ez arren, aurretiazko emaitzak nahikoak izan dira honako bi ondorioak ateratzeko. Alde batetik, zelulei gehitzeko erabilitako metodoa eraginkorra dela eta, bestetik, C16 zeramida gehitzean autofagiaren aktibazioa neurtu daitekeela. Etorkizun handiko emaitzak direla ikusita, proiektua aurrera eramateko eta horretatik informazio asko lortzeko aukerak handiak direla uste dugu. Zeramida mota ezberdinek autofagia edo apoptosia aktibatzen diren ala ez jakingo genuke, betiere zeramidak zeluletan baldintza berdinetan gaineratuz.

Proiektuaren jarraipen posiblea aktibatzen duten autofagia mota, hots, hilgarria edo bizigarria nola erregulatzen duten aztertzea izango litzateke. Horretarako, kontuan hartu behar da erregulazio hori zenbait faktoreen arabera dela: zeramidaren kokapenaren arabera, katearen luzera eta konposaketaren arabera eta zeramidekin elkarrengaitan duten proteinen (LC3B-II, adibidez) presentzia edo faltaren arabera¹⁶.

Laburbilduz, zelula eukariotoek estres-egoeratan biziraupenerako eta heriotzarako erabiltzen dituzten prozesuen mekanika eta erregulazioa ulertzeaz arduratzen den gaia oso garrantzitsua da. Horregatik, proiektu honen helburua gai horretan zeramidak erabiliz, urrats bat aurrera egitea da; izan ere, zelularen biziraupenerako eta heriotzarako prozesuak erregulatzen dituzten molekulak aurkitzea eta ulertzea oso lagungarria izan daiteke, besteak beste, gaixotasunen tratamenduetan aurrerapenak lortzeko.

8. BIBLIOGRAFIA:

1. Bento, CF., Renna, M., Ghislat, G., et al. (2016). Mammalian Autophagy: How Does It Work?. *Annual Review of Biochemistry*, 85, 685-713.
2. Li, L., Chen, Y. eta Gibson, S. B. (2013). Starvation-induced autophagy is regulated by mitochondrial reactive oxygen species leading to AMPK activation. *Cell Signal*, 25 (1), 50–65.
3. Crotzer, V. L. eta Blum, J. S. (2009). Autophagy and Its Role in MHC-Mediated Antigen Presentation. *Journal of immunology*, 182 (6), 3335–3341.
4. Levine, B., Mizushima, N. eta Virgin, H. W. (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature*, 469 (7330), 323–335.
5. Dikic, I. eta Elazar, Z. (2018). Mechanism and medical implications of mammalian autophagy. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 19(6), 349-364.
6. Abada, A. eta Elazar, Z. (2014). Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis. *EMBO Reports*, 15 (8), 839–852.
7. Mizushima, N. (2020). The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion of Cell Biology*, 63, 1–10.
8. Yang, YP. *et al.* (2013). Application and interpretation of current autophagy inhibitors and activators. *Acta Pharmacologica Sinica*, 34(5), 625-635.
9. Wesselborg, S. eta Stork, B. (2015). Autophagy signal transduction by ATG proteins: From hierarchies to networks. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 72 (24), 4721–4757.
10. Graef, M. (2020). Recent advances in the understanding of autophagosome biogenesis. *F1000Research*, 9(F1000 Faculty Rev), 212.
11. Kabeya, Y. *et al.* (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *The EMBO Journal*, 19(21), 5720-5728.
12. Mizushima, N. (2020). The ATG conjugation systems in autophagy. *Current Opinion of Cell Biology*, 63:1-10.
13. Svenning, S. eta Johansen, T. (2013). Selective autophagy. *Essays in Biochemistry*, 55, 79-92.
14. Klionsky, D., *et al.* (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*, 12(1), 1–222.
15. Yu, L., Chen, Y. eta Tooze, S. A. (2018). Autophagy pathway: Cellular and molecular mechanisms. *Autophagy*, 14(2), 207–215.
16. Jiang, W. eta Ogretmen, B. (2014). Autophagy Paradox and Ceramide. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(5), 783-92.
17. Maiuri, M. C., Zalckvar, E., Kimchi, A. eta Kroemer, G. (2007). Self-eating and self-killing: Crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 8(9), 741–752.
18. Lum, J. J. *et al.* (2005). Growth Factor Regulation of Autophagy and Cell Survival in the Absence of Apoptosis. *Cell*, 120 (2), 237–248.
19. Denton, D. eta Kumar, S. (2019). Autophagy-dependent cell death. *Cell Death and Differentiation*, 26(4), 605-616.
20. Shen, H.-M. eta Codogno, P. (2011). Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species?. *Autophagy*, 7(5), 457–465.

21. Gozuacik, D. et al. Kimchi, A. (2007). Autophagy and Cell Death. *Current Topics in Developmental Biology*, 78, 217–245.
22. Yu, L. et al. (2006). Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of U S A*, 103(13), 4952–4957.
23. Lavieu, G. et al. (2007). Is Autophagy the Key Mechanism by Which the Sphingolipid Rheostat Controls the Cell Fate Decision?. *Autophagy*, 3 (1), 45–47.
24. Pewzner-Jung, Y., Ben-Dor, S. et al. Futerman, A. H. (2006). When do Lasses (longevity assurance genes) become CerS (ceramide synthases)? Insights into the regulation of ceramide synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*, 281(35), 25001–25005.
25. Kraveka, J. M. et al. (2007). Involvement of dihydroceramide desaturase in cell cycle progression in human neuroblastoma cells. *The Journal of Biological Chemistry*. 282(23), 16718–16728.
26. Tepper, A. D., Diks, S. H., Van Blitterswijk, W. J. et al. Borst, J. (2000). Glucosylceramide synthase does not attenuate the ceramide pool accumulating during apoptosis induced by CD95 or anti-cancer regimens. *Journal of Biological Chemistry*. 275(44), 34810–34817.
27. Yang, J., Yu, Y., Sun, S. et al. Duerksen-Hughes, P.J. (2004). Ceramide and other sphingolipids in cellular responses. *Cell Biochemistry and Biophysics*, 40(3), 323–350.
28. Alonso, A. et al. Goñi, F.M. (2018). The Physical Properties of Ceramides in Membranes. *Annual Review of Biophysics*, 47, 633–654.
29. Patingre, S., Bauvy, C., Levade, T., Levine, B. et al. Codogno, P. (2009). Ceramide-induced autophagy: To junk or to protect cells?. *Autophagy*, 5(4), 558–560.
30. Peralta, E. R. et al. Edinger, A. L. (2009). Ceramide-induced starvation triggers homeostatic autophagy. *Autophagy*, 5(3), 407–409.
31. Fan, C. et al. (2017). Autophagy inhibits C2-ceramide-mediated cell death by decreasing the reactive oxygen species levels in SH-SY5Y cells. *Neuroscience Letter*, 651, 198–206.
32. Wang, Z. et al. (2017). Overexpression of ceramide synthase 1 increases C18-ceramide and leads to lethal autophagy in human glioma. *Oncotarget*, 8(61), 104022–104036.
33. Mohammed, D. et al. Ogretmen, B. (2015). Ceramide induced mitophagy and tumor suppression. *Biochim Biophys Acta*, 1853(10 Pt B), 2834–2845.
34. Rath, G. et al. (2009). De novo ceramide synthesis is responsible for the anti-tumor properties of camptothecin and doxorubicin in follicular thyroid carcinoma. *The Internal Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 41(5), 1165–1172.
35. Sridhar, S., Botbol, Y., Macian, F. et al. Cuervo, A. M. (2012). Autophagy and disease: always two sides to a problem. *The Journal of Pathology*, 226(2), 255–273.
36. Su, X. et al. (2015). Co-delivery of doxorubicin and PEGylated C16-ceramide by nanoliposomes for enhanced therapy against multidrug resistance. *Nanomedicine*, 10(13), 2033–2050.
37. Sentelle, R. D., et al. (2012). Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nature Chemical Biology*, 8(10), 831–838.
38. Kjellberg, M. A., Lönnfors, M., Slotte, J. P. et al. Mattjus, P. (2015). Metabolic conversion of ceramides in HeLa cells - A cholesteryl phosphocholine delivery approach. *PLoS One*, 10(11), 1–19.
39. Slotte, J.P., Yasuda, T., Engberg, O. et al. (2007). Bilayer Interactions among Unsaturated Phospholipids, Sterols, and Ceramide. *Biophysical Journal*, 112(8), 1673–1681.