



UNIVERSITÀ
DEGLI STUDI
FIRENZE

**DOTTORATO DI RICERCA IN
SCIENZE BIOMEDICHE**

(Curriculum Biochimica e Biologia Applicata)

CICLO XXIX

COORDINATORE Prof. Persio Dello Sbarba

**RUOLO DEGLI SFINGOLIPIDI BIOATTIVI, SFINGOSINA 1-FOSFATO
E CERAMIDE 1-FOSFATO, NELL'ATROFIA MUSCOLARE**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/11

Dottorando

Dott.ssa Federica Pierucci

Tutore

Prof.ssa Elisabetta Meacci

Coordinatore

Prof. Persio Dello Sbarba

Anni 2013/2016

ABSTRACT

L'atrofia muscolare scheletrica insorge come conseguenza fisiologica dell'invecchiamento (sarcopenia) o di uno stile di vita sedentario, ma può anche essere conseguenza di patologie come l'insufficienza cardiaca cronica (Bacurau et al., 2016), la malattia polmonare cronica ostruttiva (Passey et al., 2016), l'HIV (Pinto et al., 2016), la sepsi (Cohen et al., 2015) ed di alcuni disordini neuromuscolari, quali la distrofia muscolare di Duchenne e la sclerosi laterale amiotrofica (Thomas et al., 2007) o a seguito di tumore (cachessia).

Prescindendo dall'evento scatenante, che implica sempre una multifattorialità, l'atrofia muscolare è caratterizzata dalla diminuzione della massa e della funzione muscolare (Cruz-Jentoft et al., 2010) e, dal punto di vista bio-molecolare, dalla drastica riduzione del contenuto proteico per diminuzione della velocità di sintesi e aumento della degradazione proteica, in particolare delle proteine miofibrillari (Dedkov et al., 2003; Rudrappa et al., 2016).

I principali meccanismi di proteolisi coinvolti nell'atrofia muscolare prevedono l'attivazione del sistema ubiquitina-proteasoma e del sistema autofagico-lisosomiale (Milan et al., 2015). Sono due le ubiquitina ligasi, espresse specificatamente nel muscolo scheletrico: Muscle Atrophy F-box (MAFbx), definita anche Atrogin-1/MAFbx, e Muscle Ring Finger 1 (MuRF1) (Bilodeau et al., 2016; Bodine et al., 2014; Cao et al., 2004). Questi enzimi promuovono l'ubiquitinazione di proteine bersaglio e la loro conseguente degradazione via proteasoma.

Gli sfingolipidi (SLs), rappresentano una classe di molecole bioattive capaci di modulare il destino di molti tipi cellulari, tra cui le cellule del muscolo scheletrico (mioblasti).

Infatti negli ultimi anni molti sono gli studi che sottolineano il ruolo fondamentale degli SLs nel mantenere la funzionalità e la vitalità delle fibre muscolari, quali la regolazione delle proprietà contrattili, la risposta a ormoni come l'insulina (Strackowski M. et al., 2007), il controllo della fatica (Coward L.A., 2010), ect.

In particolare, S1P è implicata nell'attivazione delle cellule satelliti, cellule staminali residenti nel muscolo, favorendone l'attivazione, la proliferazione (Sassoli et al., 2014) ed il differenziamento, finalizzato alla rigenerazione del tessuto in seguito a danno (Danieli-Betto et al., 2010; Fortier et al., 2013; Germinario et al., 2012; Nagata et al., 2006).

Poco è noto circa un possibile coinvolgimento di S1P nell'atrofia muscolare (De Larichaudy et al., 2012); vi sono invece alcune evidenze sperimentali riguardanti un'azione di protezione,

come nel caso dell'azione protettiva in una fibra muscolare isolata soggetta ad esempio a denervazione (Ieronimakis et al., 2013; Zanin M. et al., 2008) o a contrazione eccentrica (Sassoli et al., 2011).

Al momento non sono disponibili in letteratura dati riguardo il ruolo funzionale nella biologia delle cellule muscolari dell'altro sfingolipide bioattivo fosforilato, ceramide 1-fosfato (C1P).

Per questo motivo, in questa tesi sperimentale è stato valutato il potenziale ruolo degli sfingolipidi bioattivi S1P e C1P e degli enzimi coinvolti nella loro sintesi, (sfingosina chinasi, SphK e ceramide chinasi, CerK rispettivamente), nella regolazione dei processi biologici deputati al mantenimento della massa muscolare.

Lo studio è stato condotto inizialmente su un modello animale in vivo rappresentato da topi Balb/C a cui è stata indotta cachessia mediante inoculazione sottocutanea di un frammento del tumore solido carcinoma C26 (Gorselink et al., 2006). Successivamente, al fine di caratterizzare il ruolo di S1P e C1P e le vie di segnalazione da essi promosse, le condizioni di atrofia sono state riprodotte in un modello cellulare in vitro rappresentato da cellule muscolari scheletriche differenziate della linea murina C2C12 in coltura, sottoposte al trattamento con desametasone (Dexa), un glucocorticoide in grado di indurre il passaggio ad un fenotipo atrofico, accelerando la degradazione proteica (Nakashima et al., 2016).

In una prima fase, sono stati correlati i livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 ed l'espressione di SphK1 e CerK in biopsie di muscolo EDL (Extensor Digitorum Longus) di topi cachettici portatori di C26 e successivamente confermati in un modello cellulare di atrofia cioè in miotubi C2C12 trattati con Dexa. In entrambi i sistemi è stata dimostrata una correlazione tra l'asse SphK1/S1P e la comparsa di modificazioni morfologiche tipiche del fenotipo atrofico. Questi dati sono stati recentemente presentati al XIV congresso FISV 2016 presso l'Università di Roma, "La Sapienza" e sono parte di un manoscritto in preparazione.

La S1P agisce come mediatore intracellulare ma negli ultimi venti anni è stata ampiamente caratterizzata la sua azione come molecola in grado di legare specifici recettori accoppiati a proteine eterotrimeriche leganti il GTP, denominati S1P1-5.

Di questi sottotipi recettoriali solo tre sono espressi sul sarcolemma delle fibre muscolari: S1P1, S1P2, S1P3 (Ebenezer et al., 2016; Meacci et al., 2003; Pulkoski-Gross et al., 2015; Rosen et al., 2009). E' stata riscontrata un'alterazione significativa dei livelli di espressione dei tre sottotipi recettoriali nei topi cachettici C26 e nei miotubi indotti ad atrofia da Dexa e delle loro vie di segnalazione a valle. In particolare, le vie di segnalazione a valle di S1P1 ed S1P2 possono contribuire all'induzione del fenotipo atrofico, mentre quelle a valle di S1P3 sembrano

non rivestire un ruolo determinante. L'importanza di queste vie di segnalazione è stata confermata con agonisti ed antagonisti specifici dei vari sottotipi recettoriali ed i risultati ottenuti sono parte di un manoscritto in preparazione.

La seconda parte di questa tesi sperimentale si è focalizzata su potenziali strategie per contrastare l'instaurarsi di un fenotipo atrofico e favorire la rigenerazione tissutale. A questo proposito, sono stati condotti esperimenti su cellule mesenchimali stromali derivate da midollo osseo (BM-MSCs). E' stato infatti ampiamente dimostrato che il trapianto di cellule staminali mesenchimali nei tessuti muscolari murini danneggiati ha un grande potenziale terapeutico (Costamagna et al., 2015; Natsu et al., 2004; de la Garza-Rodea et al., 2011; von Roth et al., 2012) e che l'efficacia terapeutica sia principalmente attribuita alla loro abilità a secernere fattori in grado di promuovere meccanismi endogeni di riparazione tissutale in seguito a danno (Rose et al., 2008; Salem et al., 2010; Sassoli et al., 2012; Uccelli et al., 2008).

In maniera interessante è stato dimostrato che le BM-MSCs sono in grado di rilasciare S1P nel mezzo di coltura e che la sintesi e il rilascio dello sfingolipide bioattivo possano giocare un ruolo importante sulla stimolazione della proliferazione dei mioblasti C2C12 e di una coltura primaria di cellule satelliti (isolate da fibre muscolari murine EDL). Questi dati sono stati recentemente pubblicati sulla rivista internazionale PLOS ONE (Sassoli et al. 2014). Inoltre esperimenti preliminari hanno dimostrato una riduzione significativa dei livelli di espressione del fenotipo atrofico quando i miotubi sono stati incubati per 48h con il mezzo condizionato delle BM-MSCs.

Lo studio del ruolo del metabolismo degli sfingolipidi nel rimodellamento della matrice e nel differenziamento cellulare è stato esteso anche ai cardiomioblasti trattati con l'ormone peptidico relassina. Questo studio è stato recentemente pubblicato su Molecular Endocrinology (Fрати et al., 2015).

Infine, in vista dell'importanza di molti fattori antiossidanti contenuti naturalmente negli alimenti, si è iniziato ad estendere lo studio sulle proprietà nutraceutiche di un prodotto tipico della tradizione della Regione Toscana, *Castanea sativa*, ed in particolare ad uno dei suoi prodotti derivati. Estratti totali contenenti polifenoli e tocoferoli ottenuti dalla farina dolce di *Castanea sativa*, sono stati testati per la loro capacità di contrastare la comparsa in cellule muscolari differenziate del fenotipo atrofico. I risultati positivi sono stati pubblicati sulla rivista internazionale Food and Function (Fрати et al., 2014).

I dati presentati in questa tesi di dottorato, oggetto di due future pubblicazioni (Pierucci et al., 2017a, 2017b), mettono in evidenza il ruolo degli assi SphK1/S1P/S1PR e CerK/C1P come circuiti molecolari di regolazione della cellula muscolare scheletrica sia per quanto concerne le vie che portano alla degenerazione cellulare sia per quelle coinvolte nella regolazione del

microambiente cellulare con un particolare sguardo all' interazione funzionale tra cellule muscolari scheletriche, cellule mesenchimali stromali e cellule staminali coinvolte nella rigenerazione tissutale. Questi dati nel loro insieme contribuiscono a migliorare la comprensione della biologia delle cellule muscolari e mesenchimali importante per le potenzialità di una terapia cellulare orientata verso le alterazioni fisio-patologiche del muscolo scheletrico.

INDICE

ABBREVIAZIONI	4
INTRODUZIONE	5
Muscolo scheletrico.....	5
Atrofia muscolare scheletrica.....	12
Cachessia neoplastica.....	26
Sfingolipidi.....	33
Segnalazione “Inside-out” di S1P tramite S1PRs	48
Sfingolipidi e muscolo scheletrico.....	56
MATERIALI E METODI	62
Modello animale.....	62
Colture cellulari.....	64
Retrotrascrizione e Real Time PCR.....	68
Elettroforesi su gel di poliacrilammide e Western Blotting.....	70
Separazione degli sfingolipidi e determinazione del contenuto di S1P.....	72
Analisi della proliferazione cellulare	73
Immunofluorescenza confocale	75
Analisi statistica.....	76

SCOPO DELLA RICERCA	77
RISULTATI	80
Modello sperimentale di cachessia <i>in vivo</i> : topi BalB/C cachettici per l'inoculazione sottocutanea del tumore solido carcinoma C26..	80
Modello sperimentale di atrofia muscolare <i>in vitro</i> : cellule muscolari scheletriche murine C2C12 in coltura.....	85
Alterazioni del metabolismo degli sfingolipidi in un modello <i>in vivo</i> di cachessia neoplastica ed in un modello cellulare di atrofia muscolare.....	92
Ruolo funzionale dei recettori specifici per S1P in un modello cellulare di atrofia muscolare.....	118
Espressione dei recettori specifici per S1P in un modello <i>in vivo</i> di cachessia neoplastica ed in un modello cellulare di atrofia muscolare	133
Potenziali strategie terapeutiche per favorire la rigenerazione del muscolo scheletrico e contrastare l'atrofia muscolare.....	140
Sfingolipidi come potenziali bersagli/effettori per contrastare il danno cellulare	156
DISCUSSIONE & CONCLUSIONI.....	163
BIBLIOGRAFIA	174

ABBREVIAZIONI

Atrogin-1/MAFbx, Muscle Atrophy F-box (MAFbx); BM-MSCs, Bone-marrow-mesenchymal stromal cells; Cx43, Connexin 43; C1P, ceramide-1-phosphate; Cer, ceramide; CerK, ceramide kinase; CerS, ceramide synthase; Dexa, dexamethasone; DM, differentiation medium; ECM, extracellular matrix; iSK, Compound II; MB, myoblast; MT, myotube; MURF1, Muscle Ring Finger 1; PM, Proliferation medium; Poly, polyphenols; p-SphK1, phospho-sphingosine kinase1; RLX, relaxin; RT-PCR, reverse transcription-polymerase chain reaction; SCR, scrambled; shRNA, short hairpin RNA; S1P, sphingosine 1-phosphate; S1PRs1-5: S1P receptors type 1-5; Spns2, spinter 2; Sph, sphingosine; SphK, sphingosine kinase; SL, sphingolipid; SM, sphingomyelin; SMase, sphingomyelinase; SMS, sphingomyelin syntase; Toco, tocopherols; Ub-ligases, ubiquitin ligases; EDL, extensor digitorum longus; IGF-1 insulin-like growth factor 1; MRFs, myogenic regulatory factors; mTOR, mammalian target of rapamycin; MAPK, mitogen-activated protein kinase; ERK 1/2, extracellular signal-regulated kinase; TNF α , tumor necrosis factor α ; FOXO, Forkhead box O; NF- κ B, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells; TGF- β , tumor growth factor β ; IL, interleukin; GSL, Glycosphingolipids; CDase, Ceramidases; PLD, Phospholipase D; PKC, Protein Kinase C; DAGK, Diacylglycerol Kinase; ABC, ATP-binding cassette; VEGF, Vascular endothelial growth factor; EGF, Epidermal growth factor; PDGF, Platelet-Derived Growth Factor; AC, adenylate cyclase; P38 MAPK, P38 mitogen-activated protein kinase; TRPC, transient receptor potential canonical; MyoD, myogenic differentiation; MHC, Myosin Heavy Chain; HS, Horse Serum; TLC, Thin-layer chromatography; TGF β , transforming growth factor β ; MMPs, Matrix metalloproteinases; CTGF, Connective tissue growth factor; IFN- γ , Interferon gamma.

INTRODUZIONE

MUSCOLO SCHELETRICO

Il tessuto muscolare è il tessuto deputato alla contrazione (processo controllato dal sistema nervoso centrale che implica la trasformazione di energia chimica in energia meccanica, al fine di produrre lavoro) e quindi ai movimenti volontari ed involontari del corpo. Si distinguono tre tipi di tessuto muscolare: tessuto muscolare striato scheletrico, controllato dal sistema nervoso somatico (e quindi di tipo volontario); tessuto muscolare liscio, la cui contrazione è regolata dal sistema nervoso autonomo (ed è perciò involontaria); tessuto muscolare cardiaco, anch'esso striato, ma con contrazione involontaria.

Il muscolo scheletrico è composto da elementi cellulari multinucleati, allungati e cilindrici, detti fibre muscolari (o miofibre), la cui lunghezza può essere pari a quella del muscolo di cui fanno parte e il cui diametro varia dai 10 ai 100 μm . Ogni miofibra è organizzata in numerose subunità parallele chiamate miofibrille, che consistono di unità ripetute longitudinalmente, i sarcomeri. Il sarcomero rappresenta l'unità funzionale del muscolo striato. Ogni sarcomero è delimitato alle estremità da una linea Z, contenente α -actinina. Dalla linea Z di un sarcomero si diramano in entrambe le direzioni numerosi filamenti sottili, costituiti prevalentemente da actina. Ad essi si intercalano i filamenti spessi, costituiti prevalentemente da miosina. L'insieme dei filamenti sottili e spessi costituisce la porzione più densa del sarcomero, la banda A (così detta in quanto anisotropa alla luce polarizzata). La regione al centro della banda A, detta zona H, contiene solo filamenti sottili. La porzione del sarcomero compresa tra due bande A è la banda I (così chiamata per la sua caratteristica di essere isotropa alla luce polarizzata). La sezione trasversa della banda I mostra solo filamenti di actina, mentre quella della zona H mostra solo filamenti

di miosina. Nella regione di sovrapposizione ogni filamento spesso è circondato da sei filamenti sottili, mentre ogni filamento sottile è circondato da tre filamenti spessi. I filamenti di miosina presentano delle proiezioni che durante la contrazione stabiliscono contatti con i filamenti di actina (**Figura 1**).

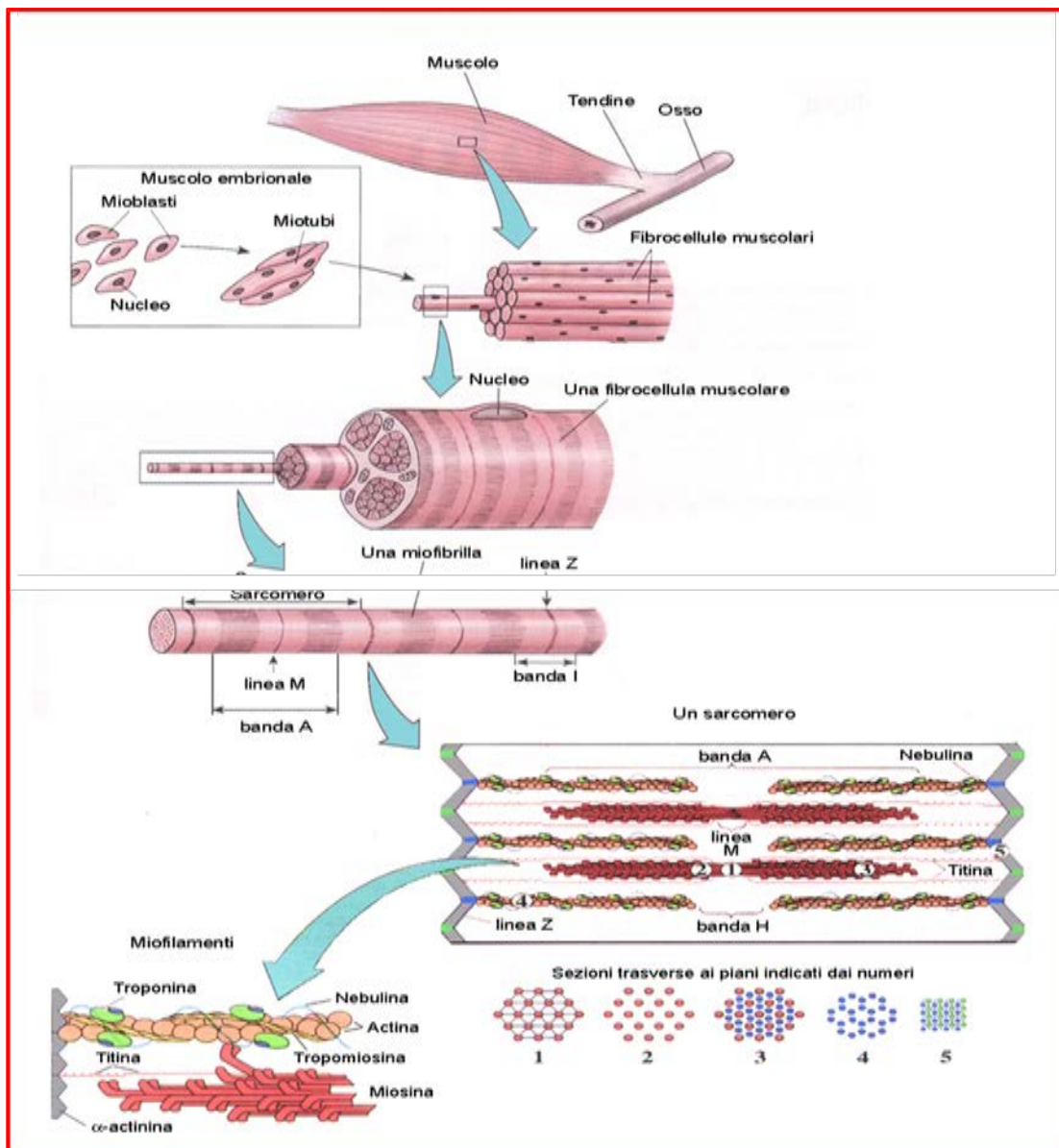


Figura 1. Struttura del muscolo scheletrico dei Vertebrati (da Randall D., Burggren W., French K. "Fisiologia animale. Meccanismi e adattamenti.").

La contrazione muscolare avviene in seguito ad uno stimolo nervoso, che causa il rilascio di ioni Ca^{2+} dal reticolo sarcoplasmatico (una caratteristica specifica del reticolo endoplasmatico liscio, tipica della cellula muscolare). Il Ca^{2+} interagisce con una proteina regolatrice, la troponina, che, in seguito ad un cambiamento conformazionale, provoca lo spostamento di un'altra proteina regolatrice, la tropomiosina, in modo da esporre il sito di legame per l'actina sulla molecola di miosina. Questo permette la formazione di legami tra actina e miosina e, grazie all'energia fornita dall'idrolisi di ATP, si ha uno slittamento dei filamenti sottili sui filamenti spessi con conseguente accorciamento del sarcomero e contrazione del muscolo (Huxley 2000).

Le fibre muscolari scheletriche possono essere suddivise in tre tipi: fibre lente (tipo I), fibre rapide ossidative (tipo IIa) e fibre rapide glicolitiche (tipo IIb). Le fibre di tipo I sono caratterizzate da bassa attività ATPasica, si contraggono lentamente e tollerano maggiormente la fatica. Possiedono un elevato numero di mitocondri ed una ricca vascolarizzazione e producono ATP principalmente per mezzo della fosforilazione ossidativa. Sono dette anche fibre rosse per il colore conferito loro dalle elevate concentrazioni di mioglobina presenti. Le fibre di tipo IIa hanno elevata attività ATPasica e si contraggono velocemente, ma resistono alla fatica perché, grazie all'elevato numero di mitocondri, sono in grado di produrre rapidamente ATP attraverso la fosforilazione ossidativa. Le fibre di tipo IIb si contraggono rapidamente, ma, possedendo pochi mitocondri, producono ATP attraverso la glicolisi anaerobia e per questo si affaticano piuttosto velocemente. Sono anche dette fibre bianche in quanto presentano scarsa mioglobina e minor vascolarizzazione.

✓ *Cenni sullo sviluppo embrionale del tessuto muscolare e sulla rigenerazione muscolare*

Le fibre muscolari scheletriche si formano nell'embrione dei Vertebrati dal mesoderma parassiale, che intorno alla terza settimana di sviluppo si segmenta in somiti, disposti ai lati del tubo neurale e della notocorda. La parte ventrale di ogni somite, lo sclerotomo, darà origine a cartilagine e ossa della colonna vertebrale, la parte dorsale invece, il dermomiotomo, si differenzierà in derma ed in muscolatura scheletrica del corpo e degli arti. Queste cellule progenitrici esprimono i fattori di trascrizione Pax-3 e Pax-7, caratterizzati dalla presenza di un dominio accoppiato (paired domain), che consiste in due motivi elica-giro-elica conservati. In risposta a segnali quali Sonic Hedgehog, Wnt e BMP4, prodotti da notocorda e strutture embrionali adiacenti, si ha attivazione dei geni Myf-5 e MyoD e down-regolazione dei geni Pax: le cellule in cui ciò avviene, i mioblasti, sono a questo punto commissionate in direzione del differenziamento in muscolo scheletrico. I mioblasti vanno quindi incontro a migrazione verso i siti di miogenesi, proliferazione e fusione in sincizi plurinucleati chiamati miotubi. Ogni miotubo si differenzierà in una fibra muscolare matura (Chargè et al., 2004; D'Andrea et al., 2016)

Non tutti i mioblasti vanno però incontro a differenziamento: alcuni rimangono nel muscolo adulto come cellule staminali quiescenti, dette cellule satelliti. In queste cellule, localizzate tra sarcolemma e lamina basale, viene mantenuta l'espressione di Pax-7. Le cellule satelliti sono responsabili della crescita postnatale del muscolo e dei processi di rinnovamento e riparazione del tessuto in seguito ad un danno (Almeida et al., 2015; Pawlikowski et al., 2015; Wang et al., 2012). Nel tessuto sano, le cellule satelliti rappresentano una quota variabile tra l'1 e il 5 % dei nuclei della fibra, ma una volta attivate, in seguito ad un evento dannoso, entro 3-4 giorni sono in grado di iniziare a proliferare e rigenerare nuovi miotubi. Il processo rigenerativo innescato dal danno attiva una risposta infiammatoria con conseguente rilascio di numerosi

fattori di crescita coinvolti nel rimodellamento del tessuto. Alcuni di questi fattori, responsabili di attivazione, proliferazione e differenziamento delle cellule satelliti, sono: il fattore di crescita degli epatociti (HGF), il fattore di crescita dei fibroblasti 6 (FGF6), l'interleuchina 4 e 6 (IL-4 e IL-6) e il fattore di crescita "insulin-like" 1 (IGF-1) (Cassano et al.,2009; Syverud et al.,2016). Il differenziamento segue gli stessi passaggi del differenziamento embrionale, con attivazione dell'espressione di fattori miogenici e progressiva diminuzione dell'espressione di Pax-7. Parallelamente alla rigenerazione delle fibre muscolari, viene anche ricostituita la popolazione quiescente di cellule satelliti, a partire da una frazione dei mioblasti proliferanti, che esce dal ciclo cellulare e torna quiescente.

Nel processo di differenziamento miogenico (sia durante lo sviluppo embrionale che nella rigenerazione in risposta ad un danno) è di fondamentale importanza un gruppo di fattori di trascrizione detti MRFs (myogenic regulatory factors, fattori regolatori miogenici) (Chao et al.,2016). I geni che li codificano vengono espressi in modo gerarchico durante la miogenesi e la loro espressione viene mantenuta anche dopo il differenziamento. Myf-5 e MyoD sono i primi ad essere espressi, nei mioblasti in proliferazione, prima della loro fusione. Essi controllano l'espressione di miogenina, che viene espressa dopo la fusione dei mioblasti ed è responsabile del differenziamento dei miotubi. Miogenina controlla anche l'espressione di MRF-4, che tra i MRFs è il fattore espresso a livelli più alti dopo il differenziamento ed è probabilmente implicato nella regolazione del fenotipo della fibra muscolare (Rudnicki et al.,2015; Walters et al., 2000) (**Figura 2**). Questi fattori di trascrizione condividono una regione di omologia con due domini funzionali significativi: un dominio di tipo helix-loop-helix (HLH, elica-loop-elica), che facilita la dimerizzazione, ed una regione basica, responsabile del legame al DNA. Queste caratteristiche sono tipiche della famiglia di proteine basic helix-loop-helix (bHLH). I MRFs si legano, come eterodimeri, ad una particolare sequenza di DNA, detta E box, presente nelle regioni regolatrici dei geni muscolo-

specifici. Sequenze E box sono presenti anche nei geni che codificano i MRFs stessi: questo fa sì che ognuna di queste proteine possa regolare la trascrizione di se stessa e degli altri MRFs (Brand-Saberi 2005; Punch et al., 2009; Zhang et al., 2016).

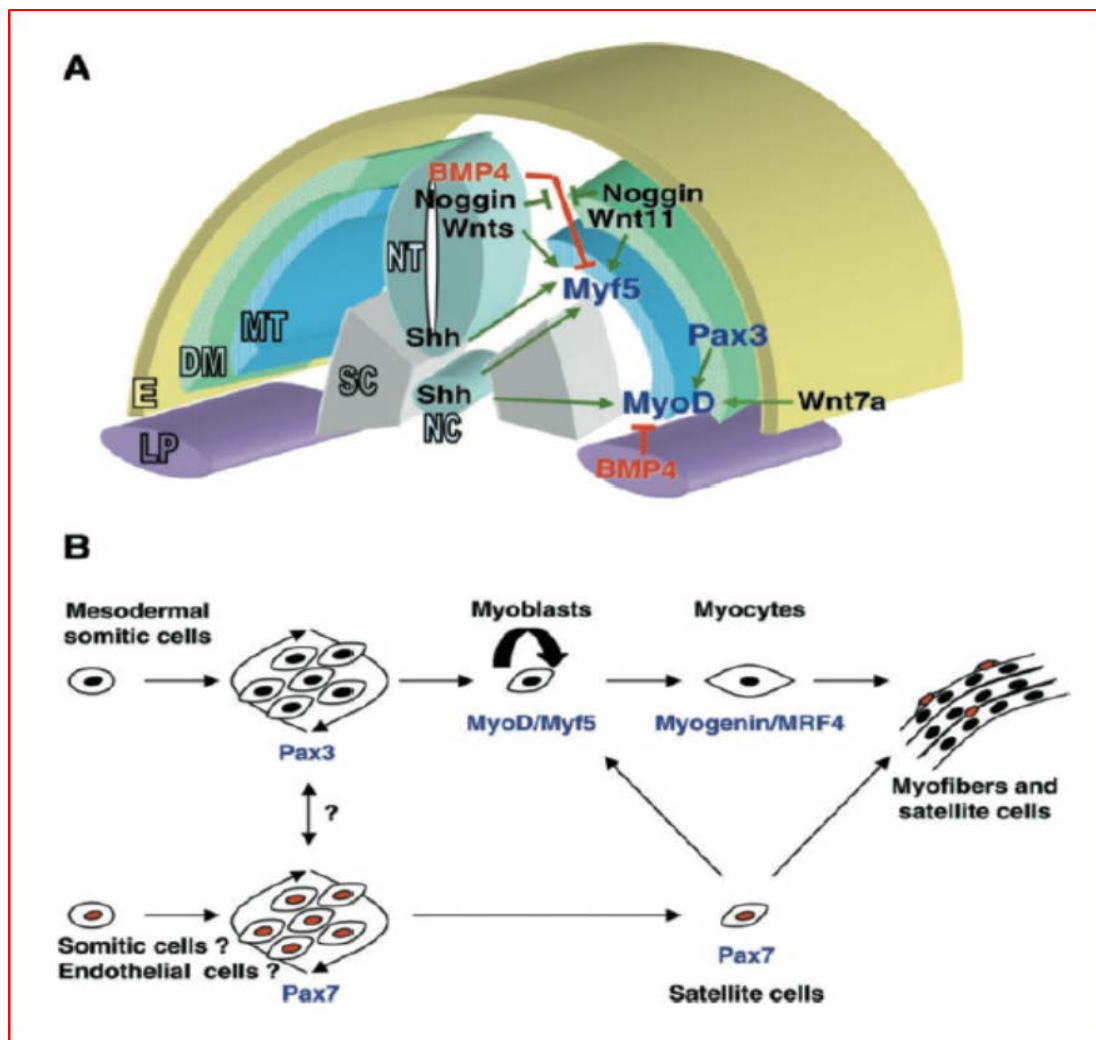


Figura 2. Vie di segnalazione ed eventi cellulari coinvolti nello sviluppo embrionale del muscolo scheletrico. **A:** cellule mesodermiche situate nella parte dorsale del somite [dermomiotomo (DM)] ricevono i segnali dai tessuti circostanti, che inducono [Wnts, Sonic hedgehog (Shh), Noggin] o inibiscono (BMP4) l'espressione dei geni primari MRFs (Myf5 e MyoD). I mioblasti migrano lateralmente per dare origine al miotomo (MT), che alla fine forma la muscolatura scheletrica. Pax3 promuove la miogenesi nel miotomo laterale. E, ectoderma; LP, piatto laterale; SC, sclerotomo; NC, notocorda; NT, tubo neurale. **B:** Cambiamento dell'espressione genica durante la miogenesi: il gene Pax3 è espresso nelle cellule precursori. Successivamente, quando vengono espressi Myf5 e/o MyoD, le cellule mesodermiche sono a questo punto commissionate in direzione del differenziamento in muscolo scheletrico (mioblasti). Più tardi, l'upregulation dei geni secondari MRFs (miogenina e MRF4) induce la differenziazione terminale dei mioblasti in miociti. Infine, la fusione dei miociti dà luogo alle miofibre multinucleate. Durante la fase successiva di miogenesi embrionale, una popolazione distinta di mioblasti, derivata dalle cellule satelliti, si fonde alle miofibre già esistenti per stimolarne la crescita. Alcune cellule satelliti rimangono strettamente associate con le fibre muscolari in uno stato indifferenziato di quiescenza. L'origine embrionale delle cellule satelliti resta da chiarire; Tuttavia, l'espressione del gene Pax7 è essenziale per l'espansione della popolazione cellulare satellitare (da Charge & Rudnicki, 2004).

ATROFIA MUSCOLARE SCHELETRICA

L'atrofia muscolare scheletrica è la perdita di massa muscolare che compare nel muscolo differenziato dei Vertebrati come conseguenza di disuso (ad esempio immobilizzazione o denervazione), invecchiamento, privazione di nutrienti, somministrazione di farmaci glucocorticoidi, disordini neuromuscolari (come la distrofia muscolare di Duchenne e la sclerosi laterale amiotrofica) e di varie altre patologie (ad esempio cancro, AIDS, diabete mellito, sepsi, insufficienza renale) (Bacurau et al., 2016; Cohen et al., 2015; Passey et al., 2016; Pinto et al., 2016).

Prescindendo dall'evento scatenante, che implica comunque sempre una multifattorialità, l'atrofia muscolare è caratterizzata, dal punto di vista morfologico, da diminuzione del diametro della fibra muscolare, della produzione di forza e della resistenza all'affaticamento (Aguera et al., 2016; Vandervoort et al., 2002) e, dal punto di vista biochimico e molecolare, dalla drastica diminuzione del contenuto proteico per diminuzione della velocità di sintesi proteica e aumento della degradazione (in particolare delle proteine miofibrillari) (Dedkov et al., 2003; Rudrappa et al., 2016).

Il contenuto proteico di una cellula muscolare differenziata risulta infatti dal bilanciamento di due processi biologici: i) la sintesi proteica, strettamente legata alla disponibilità di mRNA specifico e di fattori proteici che concorrono sia alla traduzione del messaggio dell'acido nucleico in sequenza primaria di aminoacidi, sia alla definizione della struttura nativa finale e della sua specifica funzione/localizzazione; ii) la degradazione proteica. Il turnover specifico di una proteina (e quindi la sua quantità relativa all'interno della cellula) è il risultato della velocità di entrambi i processi. Nel muscolo scheletrico il turnover proteico è tale per cui quotidianamente si ha sintesi e degradazione di una quota di proteine pari a circa l'1-2% del totale.

✓ *Regolazione della sintesi proteica*

L'inizio della traduzione richiede una serie di eventi necessari per l'assemblaggio del complesso ribosomale e per il legame all'mRNA target. La formazione dell'apparato traduzionale è regolata da un gran numero di fattori di iniziazione e di molecole di segnalazione e ciò implica l'esistenza di livelli alternativi, finemente regolati, di controllo della sintesi di nuove proteine. Il regolatore chiave del controllo traduzionale è la proteina mTOR (mammalian target of rapamycin, bersaglio della rapamicina dei Mammiferi). Stimoli di vario tipo (ad esempio nutrienti, ormoni, attività contrattile) spesso convergono su questa proteina, attivandola o inibendola, suggerendo quindi l'importante ruolo di modulatore della sintesi proteica (Drummond et al., 2009). Per comprendere il ruolo di mTOR, in studi sulla crescita muscolare in vari modelli cellulari e animali, è stata spesso utilizzata la rapamicina, inibitore specifico dell'attività di questa proteina. Ad esempio, in uno studio di Bodine e collaboratori del 2001, condotto su roditori, la rapamicina è stata utilizzata per bloccare l'ipertrofia conseguente ad un sovraccarico funzionale, dimostrando inequivocabilmente l'importanza della via di mTOR nel controllo della crescita del muscolo scheletrico. Il ruolo essenziale rivestito da questa proteina nella biologia del muscolo scheletrico è stata confermato qualche anno dopo da Baar e colleghi (Baar et al., 2006).

mTOR è una proteina di elevato peso molecolare (289 kDa) e può far parte di due diversi complessi: mTORC1 ed mTORC2.

Ci sono diverse proteine che rispondono a nutrienti, ormoni e contrazione muscolare e che regolano di conseguenza la funzionalità di mTORC1. Una delle più importanti è la proteina chinasi Akt. Il legame di vari fattori di crescita ai rispettivi recettori (ad esempio il fattore di crescita IGF-1, che è uno dei fattori più importanti nel promuovere la crescita muscolare) porta all'attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K). Questa catalizza la formazione di fosfatidilinositolo 3,4,5 trisfosfato (PIP3) a partire da fosfatidilinositolo 4,5

bisfosfato (PIP2) (questo passaggio è regolato in modo inverso dalle fosfatasi PTEN e SHIP2). Le molecole di PIP3 reclutano sul versante interno della membrana plasmatica la proteina chinasi dipendente da fosfoinositoli (PDK1) e la proteina Akt. PDK1 fosforila così Akt, attivandola. Akt può a sua volta attivare mTORC1 sia direttamente, tramite fosforilazione, che indirettamente, fosforilando e inibendo il complesso 2 della sclerosi tuberosa (TSC2), un complesso proteico che esercita un'attività inibitoria su mTORC1. Akt promuove la sintesi proteica anche inibendo la chinasi 3b della glicogeno sintasi (GSK3b), la quale bloccherebbe la traduzione di proteine attraverso l'inibizione del fattore eIF2B (Mirzoev et al., 2016).

Un'altra importante via di segnalazione coinvolta nella regolazione dell'inizio della traduzione e dell'elongazione è la via della MAPK (mitogen-activated protein kinase, proteina chinasi attivata da mitogeni) ERK 1/2 (extracellular signal-regulated kinase 1/2, chinasi regolata da segnali extracellulari). La regolazione di mTORC1 da parte di ERK 1/2 avviene o per interazione diretta con TSC2, o indirettamente, attraverso la fosforilazione di RSK1 (p90 ribosomal protein S6 kinase polypeptide 1) (Drummond et al., 2009). ERK 1/2 può anche aumentare la sintesi proteica indipendentemente da mTORC1, attraverso la segnalazione diretta a eIF4E (fattore di inizio eucariotico) mediata dalla proteina MNK1 (MAP kinase interacting kinase 1, chinasi interagente con le MAP chinasi) (Wang et al., 2007).

✓ *Meccanismi di degradazione proteica*

Nelle cellule di mammifero si distinguono quattro meccanismi principali di degradazione proteica:

- **Caspasi:** sono una famiglia di cisteino-proteasi responsabili della realizzazione nella cellula dell'apoptosi o morte cellulare programmata. Vengono sintetizzate come precursori inattivi; l'attivazione si realizza in seguito a precisi segnali di morte, grazie alla rimozione, per mezzo di un taglio

proteolitico, del prodominio inibitorio. Alcune caspasi (ad esempio le caspasi 8, 9 e 10) hanno il ruolo di iniziatori dell'apoptosi e agiscono sui precursori inattivi di altre caspasi, attivandole. Queste (ad esempio le caspasi 3 e 7) portano avanti la degradazione di molte proteine cellulari (come proteine citoscheletriche e della lamina nucleare, proteine coinvolte in proliferazione e sopravvivenza, proteine responsabili di replicazione e riparazione del DNA) e sono perciò i veri e propri effettori dell'apoptosi. L'attivazione delle caspasi, in particolare della caspasi-3, è inoltre uno dei meccanismi coinvolti nell'inizio della degradazione delle proteine miofibrillari nell'atrofia. In uno studio di Du e collaboratori del 2004 è stato dimostrato che la caspasi-3 può indurre frammentazione dell'actina, sia in complessi actomiosinici purificati che in lisati totali di fibre muscolari e di colture cellulari. Poiché l'accumulo di actina frammentata indotto dalla caspasi-3 è maggiore in presenza di inibitori del proteasoma, si pensa che i frammenti actinici siano poi degradati dal sistema ubiquitin-proteasoma (che non sarebbe in grado di procedere alla degradazione di complessi actomiosinici integri). In miotubi indotti all'atrofia dalla deprivazione di siero ed in muscoli atrofici di animali diabetici si osserva un aumento della frammentazione dell'actina, che risulta bloccato da inibitori della caspasi-3, come l'inibitore peptidico Ac-DEVD-CHO (Kandarian et al., 2006). Un altro inibitore, più specifico per la caspasi-3, è il peptide Ac-DNLD-CHO, caratterizzato per la prima volta qualche anno fa (Sakai et al., 2008). Gli inibitori delle caspasi sono oggetto di interesse come possibili farmaci per il trattamento futuro di patologie in cui è coinvolto il processo apoptotico, come ad esempio disordini neurodegenerativi, danno miocardico da ischemia-riperfusion, infezioni virali.

- Catepsine: si tratta di endopeptidasi localizzate principalmente in lisosomi ed endosomi, ma presenti anche in altre localizzazioni cellulari. Questi enzimi sono in grado di svolgere importanti funzioni anche nell'ambiente extracellulare. Esse non sono implicate solo nella degradazione di proteine confluenti nel lisosoma per endocitosi o per autofagocitosi, ma sono

fondamentali anche per il processamento proteolitico di specifici substrati. Le catepsine contribuiscono infatti a vari processi fisiologici, come la presentazione dell'antigene al sistema immunitario, il ricambio del collagene in ossa e cartilagine e il processamento di neuropeptidi e ormoni. Le catepsine, in particolare la catepsina L, contribuiscono anche alla degradazione proteica in vari modelli di atrofia (Yamazaki et al., 2010). La catepsina L ha un ruolo fondamentale in molte altre condizioni patologiche come l'artrite reumatoide, l'invasione tumorale e la metastatizzazione. Sono note diverse classi di composti in grado di inibire la catepsina L: i diazometilchetoni, gli acilossimetilchetoni, i derivati epossisuccinici come il composto E-64, le aldeidi peptidiche come la leupeptina (un composto naturale, prodotto dagli actinomyceti, in grado di inibire in modo non specifico varie classi di proteasi) (Shenoy et al., 2011).

- Calpaine: si tratta di una famiglia di cisteino-proteasi, sia ubiquitarie che tessuto-specifiche, attivate dagli ioni Ca^{2+} . L'attività delle calpaine ha un ruolo importante in processi fisiologici quali apoptosi, trasduzione del segnale, regolazione del ciclo cellulare, migrazione cellulare e miogenesi. Le calpaine sono implicate anche in processi patologici come le distrofie muscolari e possono avere un ruolo anche nell'atrofia muscolare in quanto, anche se la loro attività proteolitica è solo parziale, possono iniziare la degradazione delle proteine miofibrillari, rilasciando molecole che verranno poi completamente degradate dal proteasoma (Huang et al., 2016; Shenkman et al., 2015). In vivo, l'attività delle calpaine è regolata dal peptide calpastatina. Gli inibitori sintetici possono essere peptidici (reversibili o irreversibili) o non peptidici. Uno dei campi in cui gli inibitori delle calpaine sono stati studiati sono i disordini neurodegenerativi. Infatti, questi composti prevengono la morte neuronale, migliorano la funzionalità neurologica e diminuiscono i disturbi motori in modelli animali di danno al midollo spinale, distrofie muscolari, morbo di Alzheimer e trauma cerebrale. L'uso degli inibitori delle calpaine per prevenire la morte ischemica per apoptosi in cellule cardiache, cerebrali, epatiche e renali è

risultato essere promettente, data la capacità di questi composti di ridurre l'estensione delle lesioni e di migliorare il recupero della normale funzionalità del tessuto (Cagmat et al., 2015). Nel trattamento del cancro, gli inibitori delle calpaine possono ridurre l'invasività di linee cellulari di linfomi, leucemie, adenocarcinoma prostatico e carcinoma mammario. Inoltre, l'inibizione delle calpaine può essere utile nel trattamento di dolore e infiammazione, poiché questi enzimi tagliano varie proteine coinvolte nella nocicezione e nella risposta infiammatoria (Ono et al., 2016).

- **Sistema ubiquitina-proteasoma:** il sistema maggiormente coinvolto nell'atrofia del muscolo scheletrico è il sistema ubiquitina-proteasoma (UPS) (Baumann et al., 2016; Bilodeau et al., 2016). Questo è un sistema proteolitico dipendente da ATP che procede alla degradazione di proteine marcate dall'addizione di molecole di ubiquitina (Ub). L'ubiquitinazione delle proteine è un processo che avviene in tre tappe, ognuna delle quali è catalizzata da un enzima specifico. L'Ub viene inizialmente legata all'enzima attivatore (E1) attraverso un legame tioestere ad alta energia, poi viene trasferita all'enzima coniugante (E2), con formazione di un nuovo legame tioestere con un residuo di cisteina di E2. Infine, l'enzima Ub-ligasi (E3) catalizza la coniugazione del monomero di Ub con la proteina da degradare, attraverso la formazione di un legame isopeptidico tra il gruppo ϵ -aminico di un residuo di lisina della proteina da degradare e il gruppo carbossi-terminale del residuo 76 di glicina della molecola di Ub. Il processo è ripetuto fino a che almeno 4 monomeri di Ub sono legati alla proteina da degradare, che viene così riconosciuta dal proteasoma 26S. Nel proteasoma 26S (consistente in un core catalitico 20S e in caps regolatori 19S) ha luogo un processo dipendente da ATP che prevede prima la perdita di folding della proteina, poi attività enzimatiche simili a quelle di chimotripsina, tripsina e caspasi ed infine l'azione di esopeptidasi, con degradazione pressoché completa della proteina.

✓ *Atrogeni*

Nel 2001, Bodine e collaboratori trovarono che gli mRNA di due Ub-ligasi specifiche del muscolo erano aumentati in modelli animali di atrofia da immobilizzazione. Le due Ub-ligasi erano l'enzima Muscle Ring Finger1 (MuRF1) e l'enzima Muscle Atrophy F-box (MAFbx), chiamato anche Atrogin-1/MAFbx. Uno studio successivo, condotto da Lecker e collaboratori nel 2004, identificò un set di 120 geni differenzialmente espressi in quattro modelli di atrofia (privazione di cibo, diabete, insufficienza renale e cancro) rispetto al muscolo scheletrico sano. Questi geni, chiamati “atrogeni”, identificano un programma comune a vari tipi di atrofia e sono coinvolti in vari processi cellulari (Atherton et al., 2016), quali:

- *Degradazione proteica*: nelle quattro tipologie di muscolo atrofico sono aumentati i livelli di espressione dei geni codificanti le due Ub-ligasi specifiche Atrogin-1/ MAFbx e MuRF1, e in generale tutti i componenti della via Ub-proteasoma (in particolare Ub e vari tipi di subunità 20S e 19S del proteasoma); risulta aumentata anche l'espressione di un'importante cisteino-proteasi lisosomiale, la catepsina L; questa attivazione dell'espressione della catepsina rende almeno in parte conto dell'aumentata velocità di degradazione proteica tipica dei muscoli atrofici;
- *Produzione di energia*: nei quattro modelli di atrofia si ha riduzione dell'espressione di geni codificanti proteine mitocondriali coinvolte nel trasporto di elettroni e nella sintesi di ATP e enzimi della glicolisi e del ciclo di Krebs; questi cambiamenti portano a riduzione della capacità del muscolo di utilizzare glucosio e di produrre energia;
- *Rimodellamento della Matrice Extracellulare*: si osserva riduzione dei livelli di mRNA per collagene I, III, V e XV e per altre componenti della matrice come fibrillina e fibronectina;

- *Regolazione dell'espressione di fattori di trascrizione*: nei quattro modelli di atrofia si ha riduzione dell'espressione di tre fattori di trascrizione associati alla crescita cellulare (JUNB, MAF e SRCAP); si osserva invece aumento dell'espressione di MAX (attivatore trascrizionale) e FOXO1 (attivatore trascrizionale della famiglia forkhead), il quale può essere implicato nello sviluppo di insulino-resistenza in questi casi di atrofia;
- *Controllo traduzionale*: si osserva una forte induzione del fattore di inizio della traduzione EIF4EBP1, che, inibendo la traduzione di mRNA dotati di cap, può ridurre la velocità complessiva della traduzione proteica;
- *Controllo della crescita cellulare*: nel muscolo scheletrico, IGF-1 induce ipertrofia attivando la via di segnalazione di Akt; nei quattro modelli di atrofia studiati, si osserva una diminuzione netta di IGFBP-5, una proteina che lega la matrice extracellulare e aumenta la risposta a IGF-1; ciò suggerisce che nei muscoli atrofici si abbia una riduzione della segnalazione mediata da Akt, con conseguente soppressione della crescita cellulare (Penna et al.,2010).

✓ *Atrogin-1/MAFbx e MuRF1*

Le due Ub-ligasi Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 risultano indotte in vari modelli di atrofia (Fanzani et al., 2012; Milan et al., 2015): privazione di cibo, diabete, insufficienza renale e cancro (Passey et al.,2016). Tra questi sono inclusi: ustioni (Lang C.H. et al., 2007), sepsi (Cohen et al.,2015), somministrazione di desametasone (Oelkrug et al.,2015), iniezione di lipopolisaccaride (LPS) (Dehoux M.J.M. et al., 2003), azione di specie reattive dell'ossigeno (ROS) e citochine come TNF α (fattore di necrosi tumorale α) (Reid et al.,2011).

E' interessante notare che i topi knock-out per Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 (Atrogin-1/MAFbx $^{-/-}$ e MuRF1 $^{-/-}$), pur apparendo fenotipicamente normali, risentono meno dell'atrofia indotta da denervazione, presentando

rispettivamente il 56% e il 36% di massa muscolare in più rispetto ai controlli (Bodine S.C. et al., 2001). Questi risultati suggeriscono che Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 possano essere in parte responsabili della degradazione proteica mediata dal sistema ubiquitina-proteasoma in condizioni di atrofia muscolare (Yuan et al., 2015).

La proteina Atrogin-1/MAFbx contiene un dominio F-box, un motivo caratteristico di una famiglia di Ub-ligasi chiamate SCFs (da Skp1, Cullin, F-box). I suoi bersagli specifici noti sono il fattore regolatore miogenico MyoD (Tintignac et al., 2005), fondamentale per il differenziamento miogenico, ma importante anche per il mantenimento dell'omeostasi nella fibra adulta e per la plasticità muscolare, e la proteina eIF3-f (Lagrand-Cantaloube J. et al., 2008), una subunità regolatoria del complesso multiproteico eIF3, il quale lega la subunità ribosomale 40S e promuove il legame di metionil-tRNA e mRNA. L'aumento dei livelli di Atrogin-1/MAFbx nelle fibre muscolari atrofiche inibisce quindi la traduzione proteica attraverso la proteolisi di eIF3-f e altera l'omeostasi del tessuto attraverso la degradazione di MyoD.

La proteina MuRF1 è caratterizzata da tre domini: un dominio RING-finger, che è richiesto per l'attività Ub-ligasica, un dominio "B-box" di funzione sconosciuta e un dominio "coiled-coil", che può essere richiesto per la formazione di eterodimeri con una proteina correlata, MuRF2. I bersagli noti di MuRF1 sono la catena pesante della miosina, l'enzima creatin chinasi e probabilmente proteine miofibrillari come la titina, la nebulina e la catena leggera 2 della miosina (Stroke 2015). Inoltre, uno studio di Koyama e collaboratori del 2008 suggerisce che l'Ub-ligasi MuRF1 sia anche in grado di bloccare la sintesi proteica nel muscolo in condizioni cataboliche, favorendo gli altri organi nell'approvvigionamento di aminoacidi liberi. Complessivamente, l'azione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 nel muscolo atrofico porta a degradazione delle proteine miofibrillari e soppressione di processi anabolici e iperplastici, compresa la sintesi proteica.

In modelli di atrofia indotta da desametasone o conseguente a diabete, l'aumento dei livelli di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 viene antagonizzato dalla somministrazione contemporanea di IGF-1, che agisce attraverso la via di PI3K/Akt (Sandri M. et al., 2004; Schiaffino et al., 2011). La via di Akt dunque, oltre ad attivare la sintesi proteica può anche inibire in modo dominante i segnali inducenti atrofia, favorendo l'instaurarsi di ipertrofia. Il meccanismo attraverso cui Akt inibisce l'aumento di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 coinvolge la famiglia di fattori di trascrizione FOXO (Forkhead box O).

Queste proteine sono fattori di trascrizione altamente conservati, originariamente scoperti in quanto overespressi nel rhabdomyosarcoma e nei processi tumorigenici (Brocca et al., 2016). Nel muscolo si trovano tre diverse isoforme di fattori FOXO: FOXO1, FOXO3a e FOXO4. L'overespressione del gene *FOXO1* provoca una grave atrofia in miotubi e in fibre muscolari mature (Kamei et al., 2004), mentre nel caso di FOXO3a è sufficiente la sua attivazione per indurre atrofia (Sandri et al., 2004). I fattori FOXO sono sequestrati nel citoplasma (e quindi esclusi dal nucleo e resi inattivi) quando sono fosforilati da Akt, mentre traslocano nel nucleo quando sono defosforilati. Durante l'atrofia muscolare, l'espressione dei fattori FOXO aumenta e la riduzione dell'attività di Akt ne provoca la defosforilazione, con conseguente attivazione e traslocazione nel nucleo, dove inducono l'espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 (**Figura 3**). I fattori FOXO possono anche inibire mTORC1, favorendo ulteriormente l'instaurarsi dell'atrofia (Cassano et al., 2009). Inoltre, poiché FOXO1 può aumentare la trascrizione dell'isoforma 4 della chinasi della piruvato deidrogenasi, un inibitore reversibile del complesso della piruvato deidrogenasi, regolando quindi la decarbossilazione del piruvato a acetil-CoA nel ciclo di Krebs, la regolazione dell'espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 da parte dei fattori FOXO appare intrinsecamente legata alla velocità di sintesi proteica ed al metabolismo ossidativo della cellula muscolare (Murton et al., 2008).

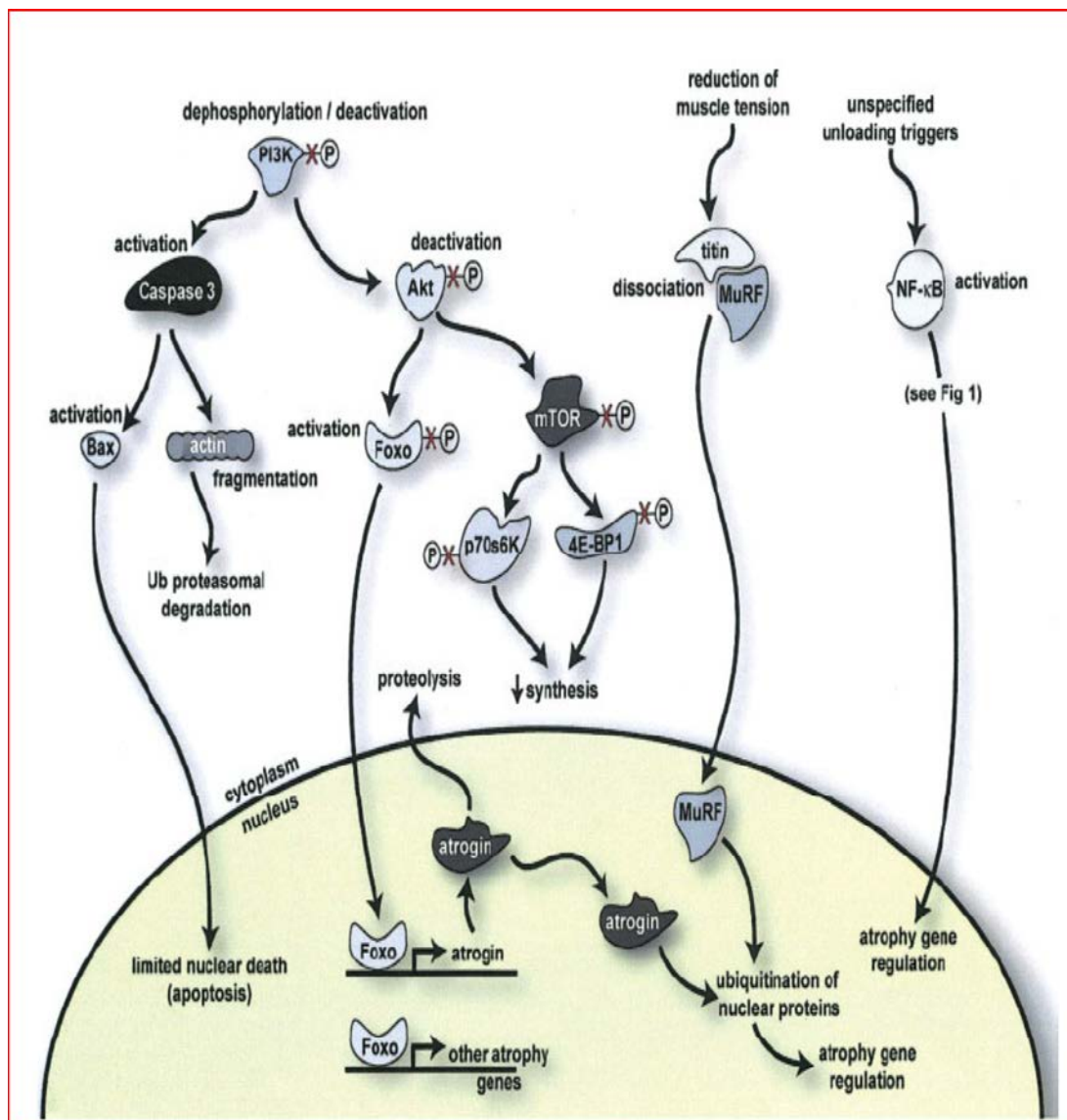


Figura 3. Vie di segnalazione coinvolte nell'atrofia muscolare scheletrica (da Kandarian S.C. et al., 2005).

✓ *Regolazione dell'atrofia da citochine*

Molte citochine sono in grado di indurre atrofia (Costamagna et al., 2015), tra cui TNF α . In uno studio di Li e collaboratori del 2005 è stato dimostrato che l'induzione dell'espressione di Atrogin-1/MAFbx da parte di TNF α è abolita dagli inibitori della proteina p38 MAPK SB203580 e curcumina, suggerendo che TNF α agisca attraverso un meccanismo dipendente da p38 MAPK per stimolare l'espressione di Atrogin-1/MAFbx.

Il legame di TNF α al suo recettore induce anche l'attivazione dei fattori di trascrizione della famiglia di NF-kB. L'attivazione di NF-kB è richiesta per la perdita di proteine muscolari indotta da citochine (Ladner et al., 2003). L'attivazione di NF-kB è controllata dal complesso della chinasi I κ B (IKK). In seguito a fosforilazione da parte di IKK, la proteina I κ B viene ubiquitinata e degradata, con conseguente attivazione di NF-kB. In uno studio di Cai e collaboratori del 2004, topi transgenici che esprimevano una forma costitutivamente attiva di IKK (chiamati topi MIKK) mostravano un'attivazione permanente di NF-kB, che causava aumento dei livelli di espressione di MuRF1, ma non di Atrogin-1/MAFbx, con conseguente atrofia muscolare. Inoltre, topi MIKK incrociati con topi knock-out per MuRF1 (MuRF1 $^{-/-}$) mostravano una diminuzione del 50% delle proteine degradate, dimostrando che la degradazione proteica mediata da NF-kB è in larga misura dipendente dall'overespressione della Ub-ligasi MuRF1.

Inoltre, studi in colture cellulari di mioblasti C2C12 suggeriscono che TNF α , attraverso NF-kB, sia in grado anche di inibire il differenziamento dei miotubi. Ciò impedirebbe l'attivazione delle cellule satelliti e quindi la conseguente rigenerazione del tessuto muscolare, aumentando ulteriormente l'effetto dell'atrofia (Guttridge et al., 2000).

✓ *Miostatina*

Nel 2004, Schuelke e collaboratori descrissero per la prima volta una mutazione del gene umano della miostatina correlata con un aumento della massa muscolare scheletrica. La miostatina, un membro della superfamiglia del TGF- β (tumor growth factor β , fattore di crescita tumorale β), è quindi considerata uno dei più potenti regolatori negativi della crescita muscolare. Come tutti i membri della superfamiglia del TGF- β , la miostatina esercita la sua attività attraverso i recettori tirosino-chinasici di tipo I e II. Alcune proteine sono in grado di interferire con l'attività della miostatina attraverso un legame diretto, come la proteina GASP-1 (growth and differentiation factor-associated protein-1, proteina associata a fattori di crescita e differenziamento) o la follistatina. Queste proteine inibiscono l'atrofia muscolare legando diverse isoforme della miostatina.

L'espressione della miostatina è regolata da molti fattori, come è dimostrato dalla presenza nel promotore del gene di sequenze di tipo E box (siti di legame per MyoD e per gli altri MRFs), di elementi di risposta ai glucocorticoidi (GRE) e agli androgeni (ARE), suggerendo che la sua attività sia richiesta anche per controllare importanti eventi miogenici come proliferazione e differenziamento dei mioblasti. Una down-regolazione anche lieve dell'espressione della miostatina è sufficiente per indurre ipertrofia muscolare, mentre per indurre iperplasia è necessaria la soppressione totale della miostatina (Cassano et al., 2009).

✓ *Modelli cellulari di atrofia muscolare*

Le colture cellulari forniscono un buon modello per lo studio sia dei processi di differenziamento miogenico, sia di condizioni patologiche come l'atrofia muscolare. Una delle linee cellulari più frequentemente utilizzate per studi di questo tipo è la linea di cellule muscolari murine C2C12, sviluppata da Yaffe e Saxel nel 1977.

Molti studi riguardanti la definizione dei meccanismi dell'atrofia muscolare fanno uso di miotubi trattati con glucocorticoidi come il desametasone: i cambiamenti metabolici indotti da questi trattamenti (come l'aumento della degradazione proteica e dell'espressione di molti geni implicati nella via ubiquitin-proteasoma) sono infatti simili ai cambiamenti osservati nei muscoli atrofici di modelli animali e di pazienti (Oelkrug et al., 2015; Stevenson et al., 2005). La via di segnalazione mediata dai glucocorticoidi passa attraverso il loro legame, nel citoplasma, con il recettore GR, il quale va poi incontro a dimerizzazione e traslocazione nel nucleo. Nel nucleo, GR si lega agli elementi di risposta ai glucocorticoidi (GRE), presenti nei promotori di vari geni, modulando la trascrizione genica. Inoltre, sono stati descritti anche meccanismi non genomici di azione dei glucocorticoidi, come il loro inserimento, indipendente dal recettore, nella membrana plasmatica e l'interazione di GR con chinasi o con i loro regolatori (Stahn et al., 2008).

In uno studio di Menconi e collaboratori del 2008 vengono valutati gli effetti del trattamento con desametasone in miotubi C2C12. L'induzione di un fenotipo atrofico è dimostrata dalla diminuzione del diametro dei miotubi, dovuta principalmente ad un aumento della degradazione proteica, mentre la sintesi proteica non risente del trattamento. In accordo con numerosi altri studi, si osserva un aumento dei livelli dell'mRNA di Atrogin-1/MAFbx. Poiché nel promotore del gene di Atrogin-1/MAFbx non sono presenti GRE noti, l'aumento della sua espressione indotto da desametasone avviene probabilmente attraverso meccanismi non genomici, che portano a defosforilazione ed attivazione del fattore FOXO1 (Zhao et al., 2009).

Per quel che riguarda l'altra Ub-ligasi specifica del muscolo, MuRF1, l'effetto del desametasone sulla sua espressione è più controverso. In alcuni studi (Johns et al., 2013; Sackey et al., 2004) i livelli dell'mRNA di MuRF1 in miotubi C2C12 trattati con desametasone rimangono pressoché invariati rispetto al controllo; in altri studi (Sackey et al., 2007; Zhao et al., 2009), invece, aumentano in modo significativo.

CACHESSIA NEOPLASTICA

Nel dicembre 2006, la cachessia è stata così definita da un gruppo di scienziati e clinici riuniti a Washington D.C.: “la cachessia è una complessa sindrome metabolica associata ad una sottostante malattia e caratterizzata da perdita di massa muscolare, con o senza perdita di massa grassa. La principale caratteristica clinica della cachessia è la perdita di peso negli adulti o il blocco della crescita nei bambini. La perdita di massa muscolare nella cachessia è distinta da quella dovuta a starvazione, invecchiamento, depressione primaria, malassorbimento e ipertiroidismo ed è associata ad un aumento della mortalità” (Evans et al., 2008).

La cachessia risulta quindi dall'adattamento dell'organismo ad una malattia preesistente come il cancro. La malattia genera un quadro clinico caratterizzato da infiammazione, perdita di appetito, bassi livelli di testosterone e altri ormoni anabolizzanti e anemia. Diminuzione dell'assunzione di cibo e anoressia risultano nella perdita di massa corporea e muscolare. Alla perdita di massa muscolare contribuiscono anche insulino-resistenza, bassi livelli di ormoni anabolizzanti e infiammazione.

In pazienti con cancro si trovano valori sierici elevati di molti mediatori infiammatori come le interleuchine 1, 6 e 8 (IL-1, IL-6, IL-8), il TNF- α ed il fattore di crescita dell'endotelio vascolare VEGF-A. I livelli di questi mediatori sono ulteriormente aumentati in pazienti cachettici. Il tumore primario è la sorgente principale di citochine pro-infiammatorie (Tisdale 2010).

I pazienti cachettici mostrano un aumento dei tassi di morbidità e mortalità rispetto a quelli non affetti da cachessia; ricevono benefici minori dalle terapie antineoplastiche e hanno una scarsa qualità della vita. La cachessia, essendo refrattaria a interventi sia nutrizionali che farmacologici, rappresenta un problema di notevole entità nella clinica oncologica ed è responsabile del 25% circa delle morti per cancro.

L'incidenza della cachessia dipende dalla localizzazione del tumore ed è particolarmente elevata in pazienti con tumori polmonari e gastro-intestinali (Tisdale 2010).

✓ *Perdita di massa muscolare*

La cachessia neoplastica causa una marcata riduzione della massa muscolare scheletrica: quando la perdita di peso corporeo è del 30%, la perdita di proteine muscolari è del 75%, mentre il compartimento delle proteine non muscolari è relativamente preservato.

L'atrofia muscolare è dovuta a diminuzione della sintesi proteica e contemporaneo aumento della degradazione. Uno studio *in vitro* su miotubi murini trattati con due fattori catabolici per il muscolo scheletrico, il fattore inducente proteolisi PIF e l'angiotensina II, ha dimostrato che sintesi e degradazione proteica sono entrambe controllate attraverso l'attivazione per auto-fosforilazione della proteina chinasi dipendente da RNA (PKR). Essa attiva il fattore di trascrizione NF- κ B, il quale, controllando l'espressione della Ub-ligasi MuRF1 e di alcune subunità del proteasoma, porta ad un aumento dell'attività della via proteolitica mediata dal sistema ubiquitin-proteasoma, ritenuto il principale meccanismo di degradazione proteica nella cachessia neoplastica. I livelli della forma fosforilata di PKR sono significativamente aumentati nel muscolo scheletrico di pazienti con cancro gastro-esofageo e perdita di peso corporeo, suggerendo che un simile meccanismo possa essere responsabile dell'atrofia muscolare (Eley H.L. et al., 2008).

Nell'aumento dell'espressione delle due Ub-ligasi Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 nella cachessia svolge un ruolo anche la regolazione mediata dai fattori FOXO. Infatti, il blocco di FOXO1 in topi cachettici per mezzo di uno specifico oligonucleotide di RNA provoca un aumento della massa muscolare scheletrica, con aumento dei livelli di MyoD e soppressione dell'azione negativa sulla massa muscolare esercitata dalla miostatina (Liu. et al., 2007).

L'espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 nel muscolo scheletrico è aumentata in presenza di agenti che provocano la produzione di specie reattive dell'ossigeno (ROS). La diversa produzione di ROS e di ossido nitrico da parte di fibre muscolari ossidative e glicolitiche è una possibile spiegazione della diversa sensibilità che hanno i due tipi di fibre all'atrofia in condizioni di cachessia, con le fibre ossidative più resistenti delle glicolitiche. Infatti, la somministrazione di LPS nei topi provoca aumento dei livelli di ROS e espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 in modo più marcato nel muscolo vasto laterale, formato prevalentemente da fibre glicolitiche, che nel muscolo *Soleus*, in cui prevalgono le fibre ossidative. Inoltre, la produzione di ossido nitrico e l'espressione della sintetasi inducibile dell'ossido nitrico (iNos) e di geni codificanti per prodotti antiossidanti, sono più elevati nei muscoli ossidativi che in quelli glicolitici, suggerendo che l'ossido nitrico abbia funzioni protettive contro l'atrofia muscolare (Yu et al., 2008).

✓ *Carcinoma del colon C26: un modello di cachessia*

Nel 1975, nel tentativo di trovare un modello animale di tumore del colon utilizzabile per studi biologici e di chemioterapia, tumori del colon furono indotti e trapiantati in diversi ceppi di topi inbred. Tra i quattro tumori che superarono il primo trapianto c'era il tumore del colon 26 (C26), descritto come un carcinoma indifferenziato di grado IV che metastatizza soprattutto nei polmoni. Nel 1981 il tumore C26 fu ulteriormente caratterizzato in vivo attraverso l'inoculazione di cellule tumorali in topi singenici BalB/C. La linea C26 era altamente tumorigenica e mostrava una bassa tendenza a metastatizzare; la mortalità dei topi inoculati era comunque elevata. Nel 1990 è stato riportato che i topi impiantati con il tumore C26 mostrano una perdita del 40% circa di peso corporeo rispetto ai controlli e presentano ipoglicemia e ipercortisolismo, senza variazioni nell'assunzione di cibo.

Il tumore C26 causa disordini della funzionalità epatica e perdita di tessuto adiposo e muscolare scheletrico, fornendo quindi un modello appropriato per

lo studio dei meccanismi alla base della cachessia (da notare però che la cachessia indotta dal tumore C26 varia in base al sito di inoculazione) (Aulino et al.,2010).

Nel recente studio di Aulino e collaboratori, topi BalB/C trapiantati con un frammento di tumore C26 sono stati caratterizzati dal punto di vista sia molecolare che fisiologico. Il tumore C26 induce la morte del 90% dei topi entro 32 giorni dal trapianto, con un tempo di sopravvivenza medio di 25 giorni. La caratteristica principale della risposta dell'ospite al trapianto è la cachessia. Nelle prime due settimane successive al trapianto il peso corporeo rimane inalterato, ma nella terza settimana la perdita di peso raggiunge il 30%. La perdita di peso corporeo è per la maggior parte dovuta ad atrofia muscolare, accompagnata da diminuzione dei depositi di grasso sottocutanei. Il tumore C26 provoca diminuzione del diametro delle fibre muscolari, sia glicolitiche che ossidative (**Figura 4**). Inoltre, nei muscoli cachettici i sarcomeri risultano distrutti, con perdita quasi completa dell'organizzazione dei filamenti.

Nei topi cachettici si ha una significativa up-regolazione della Ub-ligasi specifica del muscolo Atrogin-1/MAFbx. In altri studi sono stati trovati aumentati anche i livelli di espressione dell'altra Ub-ligasi specifica del muscolo, MuRF1 (Anthony 2016) ed un aumento dell'ubiquitinazione delle proteine. Questi dati suggeriscono che il tumore sia in grado di indurre un aumento della degradazione proteica mediata dalla via ubiquitina-proteasoma. Il tumore C26, provocando atrofia muscolare e perdita dell'organizzazione sarcomerica, influisce negativamente anche sulla funzionalità muscolare, diminuendo in particolare la resistenza alla fatica. Questo effetto si osserva però solo in alcuni muscoli, come il muscolo EDL (*Extensor Digitorum Longus*), che presenta una predominanza di fibre rapide glicolitiche, mentre non è presente in muscoli come il *Soleus*, che è invece arricchito di fibre lente ossidative. La forza isometrica massima (o forza assoluta) è minore nei muscoli cachettici rispetto ai controlli. La forza specifica, cioè la forza assoluta normalizzata in funzione della massa del muscolo, però non varia in modo

significativo tra topi cachettici e controlli. Ciò suggerisce che la diminuzione della forza assoluta sia dovuta all'atrofia del muscolo e non ad alterazioni delle proprietà contrattili intrinseche delle miofibre (Gorselink et al., 2006).

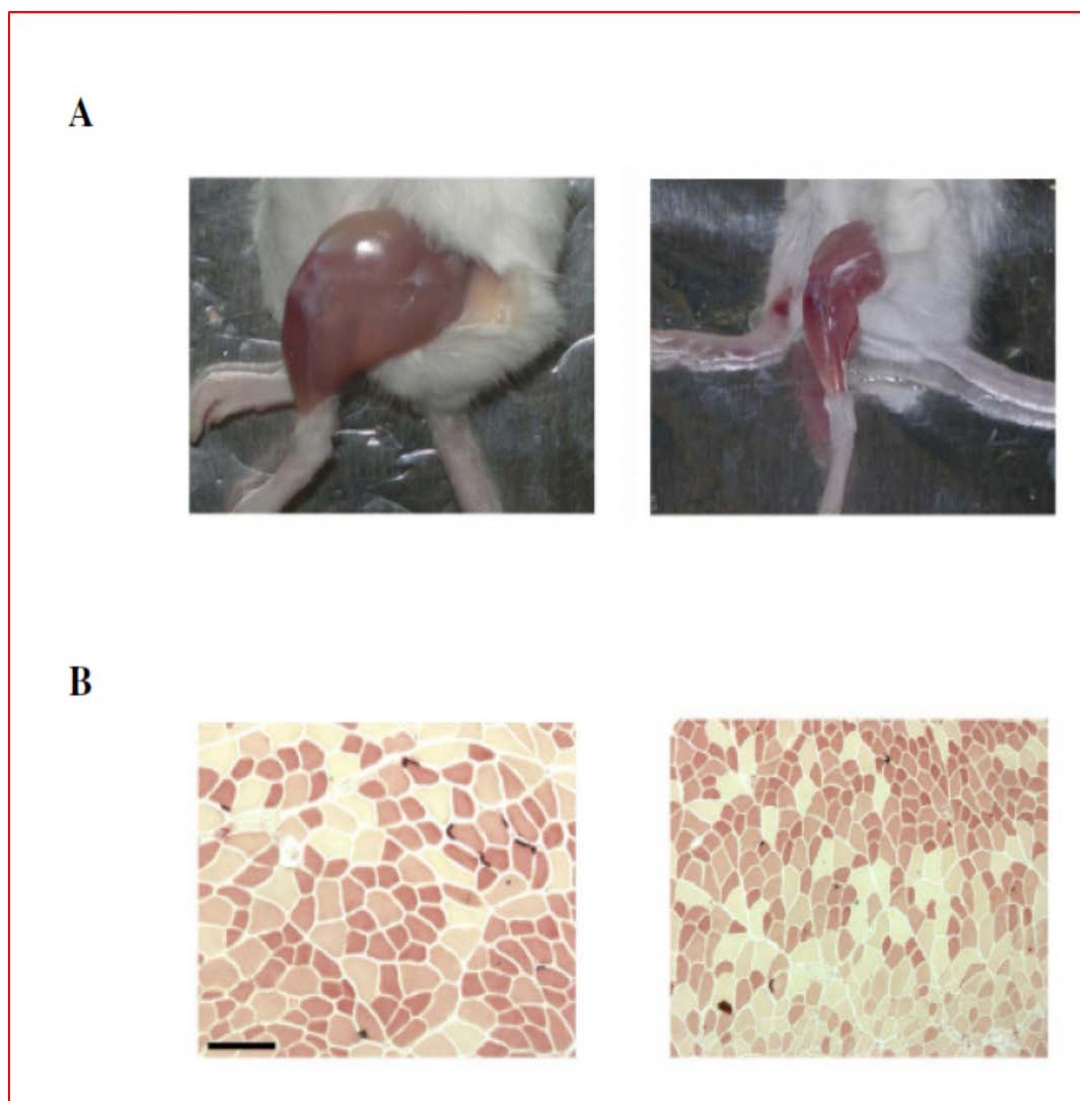


Figura 4. A) Atrofia muscolare dell'arto inferiore di un topo cachettico a 3 settimane dall'inoculazione del carcinoma C26 (destra), confrontato con un topo sano (sinistra). **B)** Colorazione esterasi di sezioni trasversali del tibiale anteriore di topi di controllo (sinistra) e portatori di carcinoma C26 (destra). L'atrofia è evidente nella diminuzione della CSA (cross sectional area) dei vari tipi di fibre (barra = 30 μ m) (da Aulino et al., 2010).

L'atrofia muscolare è un effetto diretto delle citochine sul metabolismo del muscolo scheletrico e non può essere associata all'anoressia dovuta al cancro, poiché l'assunzione di cibo da parte dei topi trapiantati con il tumore C26 non sempre differisce da quella dei controlli (Konishi et al., 2016).

E' stato dimostrato che IL-6 è una delle citochine che media l'atrofia muscolare indotta dal tumore C26, mentre il trattamento con IL-27 riduce l'atrofia negli animali cachettici (Aulino et al., 2010).

Nonostante in molti modelli di atrofia muscolare sia stata riscontrata un'inibizione della via di segnalazione di IGF-1, questo non si verifica nei topi trapiantati con il tumore C26, nei quali non si osservano né diminuzione dello stato di fosforilazione di Akt, né aumento dell'espressione dei fattori FOXO (Penna et al., 2010). Ciò implica che la segnalazione responsabile dell'aumento dei livelli delle Ub-ligasi Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 non sia quella mediata dai fattori FOXO.

Vista l'importanza dei fattori pro-infiammatori nel mediare l'atrofia muscolare, l'attenzione si è focalizzata sulle vie di segnalazione dipendenti da citochine, in particolare su quelle attivate dalle MAPK. In effetti, in uno studio successivo di Penna e collaboratori, è stato osservato che nei muscoli di topi trapiantati con il tumore C26 si ha un livello di fosforilazione della proteina ERK 1/2 maggiore del 50% rispetto ai controlli.

Inoltre, la somministrazione quotidiana, nei topi trapiantati con il tumore C26, di un inibitore della chinasi MEK, che ha il ruolo di fosforilare e attivare ERK1/2, riduce la perdita di peso corporeo, diminuisce l'atrofia dei muscoli e contrasta l'aumento dei livelli di Atrogin-1/MAFbx. Ciò suggerisce che l'attivazione di ERK sia almeno in parte responsabile dell'over-espressione della Ub-ligasi Atrogin-1/MAFbx nei muscoli dei topi cachettici.

Nello stesso studio è stato osservato che nel muscolo dei topi cachettici si ha un aumento dell'espressione della proteina Pax-7, un marcatore di cellule indifferenziate, mentre i livelli del regolatore miogenico miogenina sono ridotti.

L'overespressione di Pax-7 è stata associata in lavori precedenti (Olguin et al., 2004) a inibizione della miogenesi, la quale può contribuire all'instaurarsi dell'atrofia muscolare nella cachessia neoplastica. Infatti, il pattern di espressione di Pax-7 e miogenina nel muscolo cachettico è compatibile con un processo rigenerativo inefficiente e suggerisce la possibilità che le cellule satelliti attivate possano accumularsi nel muscolo dei topi cachettici a causa della loro aumentata proliferazione e/o della loro incapacità di differenziare. Poiché l'inibizione di ERK1/2 nei topi trapiantati con tumore C26 riporta i livelli di Pax-7 e miogenina ai valori dei controlli, è probabile che l'attivazione di ERK1/2, che può portare a fosforilazione ed inibizione di miogenina, contribuisca a mantenere le cellule satelliti in uno stato indifferenziato.

SFINGOLIPIDI

La componente lipidica delle membrane cellulari eucariotiche è costituita da tre grandi classi di molecole anfipatiche:

- i glicerofosfolipidi, in cui il glicerolo è esterificato con due molecole di acidi grassi ed una di acido fosforico, il quale può a sua volta essere esterificato con un alcol a basso peso molecolare;
- gli steroli, composti caratterizzati da un sistema rigido di 4 anelli idrocarburici fusi tra loro;
- gli sfingolipidi (SLs), in cui una molecola di acido grasso è unita a una base sfingoide a lunga catena.

Gli sfingolipidi rappresentano la componente lipidica più cospicua delle membrane cellulari e, oltre alla funzione strutturale, possono anche avere un ruolo nella segnalazione cellulare (Rao et al, 2013). Gli acidi grassi presenti negli sfingolipidi sono di solito saturi o monoinsaturi e contengono 16, 18, 22 o 24 atomi di carbonio. La base sfingoide a lunga catena è un aminoalcol e presenta due varianti più comuni: la sfinganina e la sfingosina (Sph). La differenza tra le due è la presenza di un doppio legame in configurazione *trans* 4-5 nella sfingosina. L'unità fondamentale comune a tutti gli sfingolipidi è rappresentata dal ceramide (Cer), molecola costituita dalla sfingosina e da un acido grasso Nacetilato in posizione C-2 (**Figura 5**). Dal ceramide derivano tre sottoclassi di sfingolipidi, che differiscono per la natura chimica della testa polare legata in posizione C-1. Le tre sottoclassi sono:

- le sfingomieline, che, contenendo fosfocolina o fosfoetanolamina come testa polare, possono essere classificate come fosfolipidi;
- i glicosfingolipidi, che hanno la testa polare costituita da uno o più zuccheri legati direttamente al gruppo ossidrilico del carbonio 1 del ceramide e non contengono fosfato;

- i gangliosidi, le cui teste polari sono oligosaccaridi complessi che terminano con uno o più residui di acido sialico.

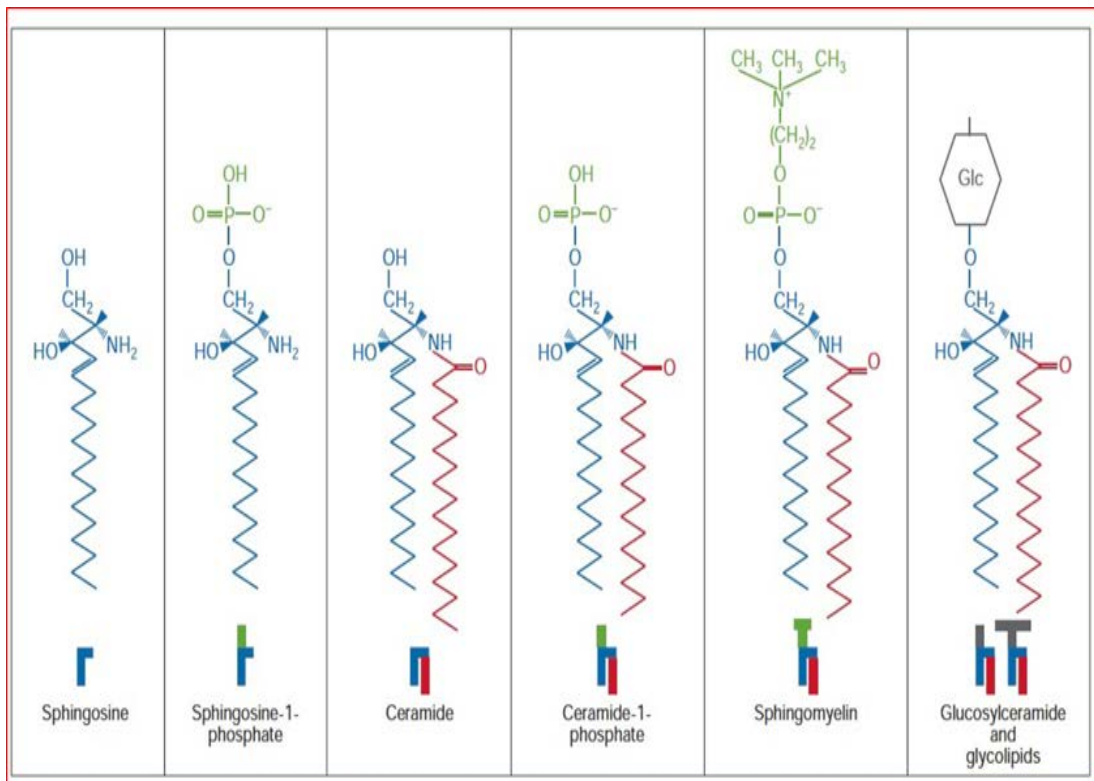


Figura 5. Struttura dei principali sfingolipidi (da Futerman et al., 2004)

✓ *Metabolismo degli sfingolipidi*

Il metabolismo degli SLs prevede una via principale d'entrata, cioè la via di sintesi de novo, una via di recupero e una via di uscita. Ognuna di esse è regolata da una serie di enzimi con una ben definita localizzazione subcellulare. Questo è importante perché, data la loro natura lipidica, gli sfingolipidi non possono muoversi liberamente nel citoplasma, quindi tendono a rimanere nel sito della loro sintesi, a meno che non vengano trasportati da apposite proteine o vescicole. La sintesi de novo inizia a livello del versante citosolico del reticolo endoplasmatico, con la condensazione dell'aminoacido serina con l'acido grasso attivato palmitoilcoenzima A (palmitoil-CoA) grazie all'enzima serina palmitoil transferasi (SPT), a formare 3- chetosfinganina (3- chetodiidrosfingosina). Questa è ridotta a sfinganina (diidrosfingosina) grazie alla 3-chetosfinganina reduttasi NADPH dipendente (3-KSR). Successivamente avviene l'acilazione della sfinganina ad opera di una famiglia di enzimi, noti come ceramide sintasi (CerS), che catalizzano la formazione di diidrocераmide (se il substrato è sfinganina), oppure ceramide (se il substrato è sfingosina, nella via di recupero). Sono note sei isoforme di CerS, che hanno come substrati acidi grassi attivati diversi, rendendo così possibile la formazione di molecole di ceramide che si differenziano per la lunghezza del gruppo N-acilico legato.

CerS1 produce C18-ceramide;

CerS2 produce C22 e C24-ceramide;

CerS3 produce C26-ceramide;

CerS4 produce C18, C20 e C22-ceramide;

CerS5 produce C16-ceramide;

CerS6 produce C14 e C16-ceramide.

Il ceramide viene prodotto a partire da diidroceramide, per azione dell'enzima diidroceramide reduttasi (DhCerDes1/2) (o desaturasi). Esso può essere:

- *fosforilato dall'enzima ceramide chinasi (CerK)*, a formare ceramide 1-fosfato (C1P), metabolita biologicamente attivo;
- *trasferito al complesso del Golgi*. Se il trasporto avviene per mezzo della proteina di trasferimento del ceramide (CerT) si ha produzione di sfingomielina (SM) ad opera dell'enzima sfingomielina sintasi (SMS), che catalizza il trasferimento della fosfocolina da fosfatidilcolina a ceramide, con formazione di diacilglicerolo (DAG) come prodotto collaterale. Se il trasporto del ceramide al Golgi è invece mediato da vescicole si ha produzione di glucosilceramide, ad opera dell'enzima glucosilceramide sintasi (Aguilera-Romero et al., 2014). Il glucosilceramide, che si forma nel versante citosolico del Golgi, viene successivamente trasferito nel versante interno, dove avviene la sintesi di glicosfingolipidi (GSL) complessi, ad opera di enzimi specifici. Sia la SM che i GSL possono raggiungere la membrana attraverso trasporto mediato da vescicole;
- *deacetilato a formare sfingosina e un acido grasso libero dalla ceramidasi (CDasi)*. Di questo enzima sono note diverse isoforme, attive a pH acido (localizzate a livello lisosomiale), basico (in corrispondenza del complesso ER/Golgi) e neutro (a livello della membrana plasmatica).

La SM e i GSL possono essere portati dalla membrana plasmatica ai lisosomi, tramite trasporto vescicolare endocitico. Nei lisosomi agiscono diversi enzimi, come la sfingomielinasi acida (SMasi acida), che catalizza la degradazione di SM in ceramide, oltre a diversi enzimi in grado di ridurre anche i GSL in ceramide. A questo punto una ceramidasi acida (CDasi acida) può trasformare il ceramide in sfingosina, che può uscire dal lisosoma.

Due isoforme dell'enzima SMasi sono presenti anche a livello della membrana plasmatica e possono quindi agire sulla SM presente. In particolare, se la molecola si trova sul foglietto esterno della membrana agirà una SMasi acida, se si trova invece sul foglietto interno agirà una SMasi neutra; in entrambi i

casi si avrà formazione di ceramide, che sarà poi degradato a sfingosina tramite l'azione di una CDasi neutra.

Una volta che la sfingosina è formata possono agire su di essa due tipi di enzimi:

- le *CerS*, che possono riformare ceramide a partire da uno dei componenti della sua degradazione; questa è quindi la via di recupero (Sanllehí et al., 2016);

- l'enzima *sfingosina chinasi* (SphK), presente in due isoforme (SphK1 e SphK2), che porta alla formazione della molecola biologicamente attiva sfingosina 1-fosfato (S1P), implicata in numerose vie di segnalazione.

La S1P può infine essere demolita irreversibilmente dall'enzima S1P liasi, con formazione di due molecole di natura non sfingolipidica: palmitoilaldeide e fosfoetanolamina. Questa è l'unica via di uscita definitiva dal metabolismo degli sfingolipidi (**Figura 6**).

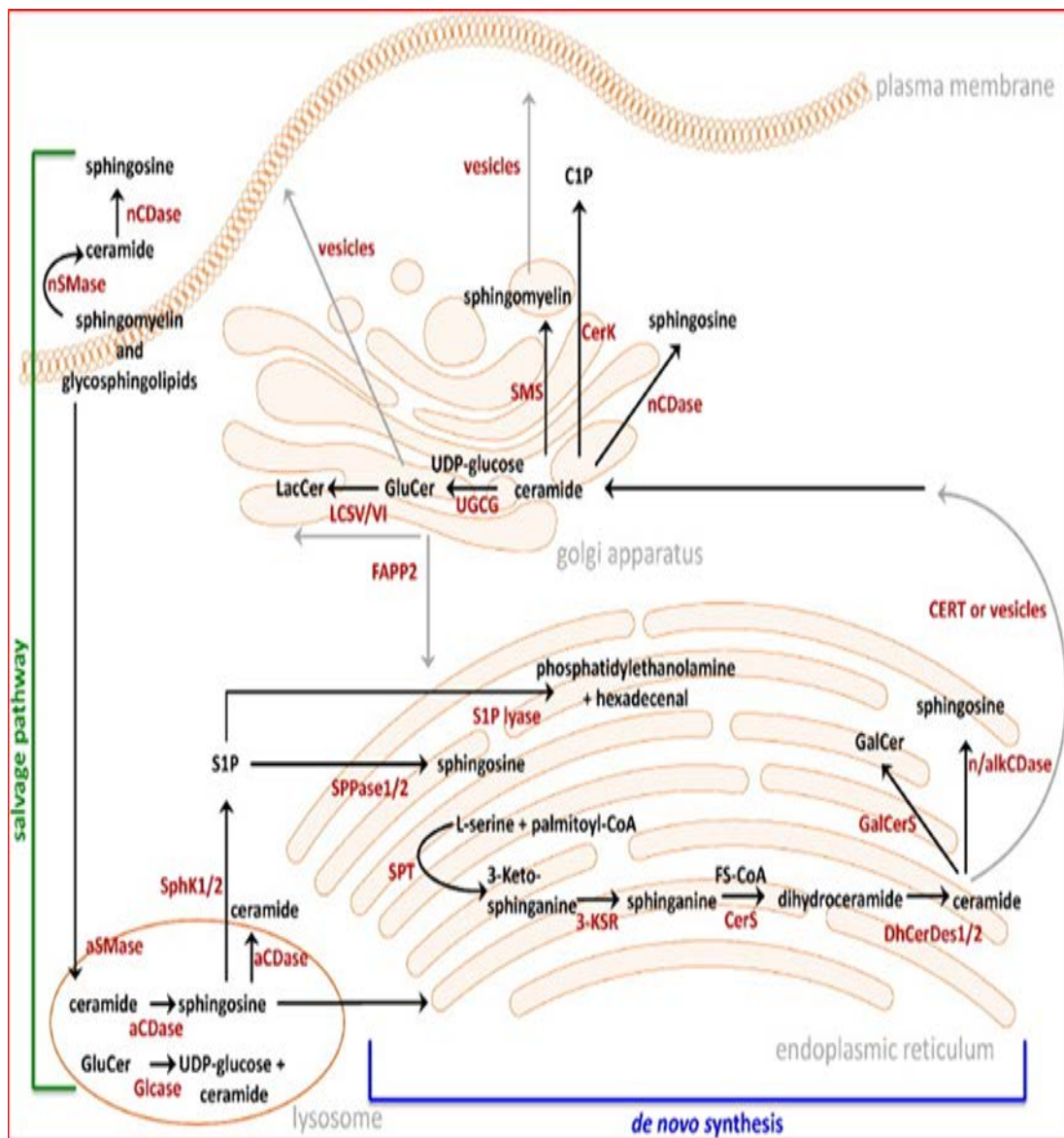


Figura 6. Compartimentalizzazione del metabolismo degli sfingolipidi (da Wegner et al., 2013)

✓ *Sfingosina chinasi e ceramide chinasi*

Sono note due isoforme dell'enzima sfingosina chinasi, SphK1 e SphK2. Hanno entrambe cinque domini conservati (C1-C5), con un unico dominio catalitico compreso tra C1 e C3 (Alemany et al., 2007). Il sito di legame per l'ATP è localizzato nel dominio C2. SphK1 non possiede nessun dominio idrofobico transmembranario, mentre nella sequenza di SphK2 sono stati identificati 4 domini putativi transmembranari. Inoltre, le due isoforme, nonostante siano omologhe e abbiano lo stesso prodotto di reazione, differiscono nelle proprietà catalitiche, nella localizzazione subcellulare, nella distribuzione tissutale e nel pattern di espressione temporale durante lo sviluppo. Mentre SphK1 preferisce come substrato la D-eritro-sfingosina, SphK2 è in grado di fosforilare un'ampia varietà di basi sfingoidi, comprese la fitosfingosina e la diidrosfingosina (Takabe et al., 2008).

L' up-regolazione di SphK1 favorisce la sopravvivenza cellulare, per quel che riguarda SphK2 invece, sia la sua overespressione che la sua down-regolazione (Hannun et al., 2008, Pyne et al., 2010) determinano blocco della crescita cellulare e apoptosi.

Topi knock-out per una sola delle isoforme dell'enzima hanno sviluppo e riproduzione normali; al contrario, il doppio knock-out, in cui si ha la completa eliminazione della S1P, è letale allo stadio embrionale, in quanto si ha grave compromissione della neurogenesi e dell'angiogenesi (Mizugishi et al., 2005). Queste osservazioni suggeriscono che ogni isoforma della SphK possa almeno in parte compensare la mancanza dell'altra, ma che la S1P sia fondamentale per un corretto sviluppo embrionale.

SphK1 è l'enzima maggiormente responsabile della produzione di S1P e la sua espressione è altamente regolata attraverso una combinazione di meccanismi epigenetici, trascrizionali e post-traduzionali. SphK1 può essere stimolata da numerosi fattori di crescita, inclusi PDGF (platelet-derived growth factor), VEGF (vascular endothelial growth factor), EGF (epidermal growth

factor), HGF (hepatocyte growth factor), citochine come TNF- α , ormoni steroidei come l'estradiolo, ligandi dei recettori accoppiati a proteine G come l'acetilcolina, S1P stessa (Takabe et al., 2008).

SphK1 può essere attivata da vari meccanismi:

- *fosforilazione e traslocazione alla membrana plasmatica*, che permette l'avvicinamento dell'enzima al suo substrato, sfingosina; la fosforilazione su Ser225 ad opera di ERK2 è essenziale per aumentare l'affinità per la membrana (Stahelin et al., 2005);
- *interazione con fosfolipidi acidi*;
- *interazione con altre proteine*.

SphK2 media anche effetti indipendenti dalla produzione di S1P. Per esempio, può indurre apoptosi attraverso l'interazione, mediante il suo dominio BH3, con la proteina Bcl-xl (Chipuk et al, 2012). Inoltre, uno studio di qualche anno fa condotto su cellule di mammifero ha dimostrato che SphK2 e il suo prodotto S1P si assemblano a complessi co-repressori dell'espressione genica, contenenti HDAC1 e 2 (Histone deacetylase 1 e 2). La presenza di S1P previene la deacetilazione dei residui di lisina della coda istonica, compromettendone così il legame al DNA, con conseguente aumento della trascrizione di *p21* (noto inibitore della chinasi ciclina-dipendente CKI) e arresto del ciclo cellulare (Hait et al., 2009).

Dal momento che SphK1 è overespressa in vari tipi di tumore ed ha un ruolo fondamentale nell'aumentare la proliferazione delle cellule tumorali e nel promuovere la tumorigenesi in modelli animali, suscita un grande interesse la ricerca di inibitori specifici di questo isoenzima. Tra i primi composti ad essere identificati come inibitori competitivi della SphK troviamo la diidrosfingosina (Saphingol) (Buehrer et al., 1992) e la dimetilsfingosina (Yatomi et al., 1996). Non si tratta però di inibitori specifici, infatti inibiscono in egual misura SphK1 e 2. Un inibitore selettivo non competitivo della SphK1 è il composto II (iSK)

(French et al., 2003). Esso riduce i livelli di S1P, inibisce la proliferazione e induce apoptosi in varie linee di cellule tumorali.

L'enzima ceramide chinasi (CerK) è stato clonato nel 2002 da librerie di cDNA di leucemia umana e tessuto cerebrale murino (Sugiura M. et al., 2002). Basandosi sull'omologia con il dominio catalitico della diacilglicerolo chinasi (DAGK), con l'identificazione di CerK è stata introdotta una nuova sottoclasse nella famiglia DAGK, distinta da quella della SphK. L'analisi della sequenza primaria di CerK ha identificato un sito putativo di miristilazione all'N-terminale. L'enzima presenta un dominio PH (Pleckstrin Homology), richiesto per la localizzazione nelle membrane e per l'attività enzimatica e un dominio di legame alla Ca^{2+} /calmodulina. La calmodulina si lega direttamente a questo sito, in modo Ca^{2+} -dipendente, agendo come un sensore del calcio per l'enzima. Inoltre l'attività catalitica di CerK può essere regolata anche per fosforilazione (Bornancin 2010).

CerK si trova principalmente in tre compartimenti subcellulari: il complesso del Golgi, la membrana plasmatica e le vescicole citoplasmiche; può trovarsi anche nel compartimento endosomiale/esosomiale e nei mitocondri (Bornancin 2010).

L'espressione di CerK è ubiquitaria, più elevata in timo, leucociti del sangue periferico, cervello, cuore, muscolo scheletrico, rene, fegato e intestino tenue (Bornancin 2010).

E' stato riportato che le cellule ematopoietiche hanno livelli particolarmente elevati dell'mRNA di CerK. In accordo con ciò, CerK è altamente espresso nelle cellule T quiescenti CD4⁺ e CD8⁺ e nelle cellule B CD19⁺; la sua espressione è fortemente ridotta in seguito all'attivazione di queste cellule (Yokota et al., 2004).

I livelli dell'mRNA di CerK sono down-regolati nel tessuto adiposo bianco del ratto in risposta alla somministrazione di leptina (Bonzon-Kulichenko et al., 2009).

Nella linea cellulare di neuroblastoma umano SH-SY5Y, i livelli di CerK diminuiscono durante il differenziamento indotto da ATRA (all-trans retinoic acid), il quale agisce a livello del promotore del gene *CerK* (Murakami et al., 2010).

Questo enzima, per il suo ruolo nell'infiammazione e nel controllo della crescita cellulare, suscita un interesse crescente come bersaglio farmacologico. Un inibitore di CerK è K1, isomero di un già noto inibitore di SphK, che agisce in modo non competitivo inibendo parzialmente l'attività dell'enzima e la produzione di Ceramide 1-Fosfato (C1P) (Kumada H. et al., 2007).

L'inibitore noto più potente è il derivato diamino-benzotiazolico NVP-231, che compete con il ceramide per il legame all'enzima ed è attivo a concentrazioni nanomolari ($IC_{50} = 12nM$). Alla concentrazione 100nM, NVP-231 inibisce CerK dell'80% (Graf et al., 2008).

Ceramide, sfingosina, Sfingosina 1-Fosfato (S1P) e C1P risultano essere mediatori bioattivi chiave nella biologia degli sfingolipidi. Diverse ricerche hanno dimostrato che la sfingosina e, soprattutto, il ceramide sono implicati nella regolazione di eventi quali l'apoptosi, l'arresto della crescita, la senescenza e il differenziamento cellulare. S1P e C1P sono invece coinvolti in processi di proliferazione cellulare, migrazione e sopravvivenza a situazioni di stress (Van Brocklyn et al., 2012).

La scoperta dell'effetto opposto sui processi di proliferazione e sopravvivenza cellulare esercitato da ceramide e da S1P e C1P ha dato origine al modello del reostato degli sfingolipidi (Newton et al., 2015) (**Figura 7**). Secondo questo modello il destino cellulare e l'omeostasi tissutale sarebbero determinati dal rapporto tra i livelli di S1P e C1P da un lato e ceramide dall'altro. In quest'ottica, l'espressione e l'attivazione di CerK potrebbe avere un notevole impatto sul reostato, sia per l'azione pro-sopravvivenza esercitata dal suo prodotto, sia perché l'attività di CerK provoca consumo di ceramide.

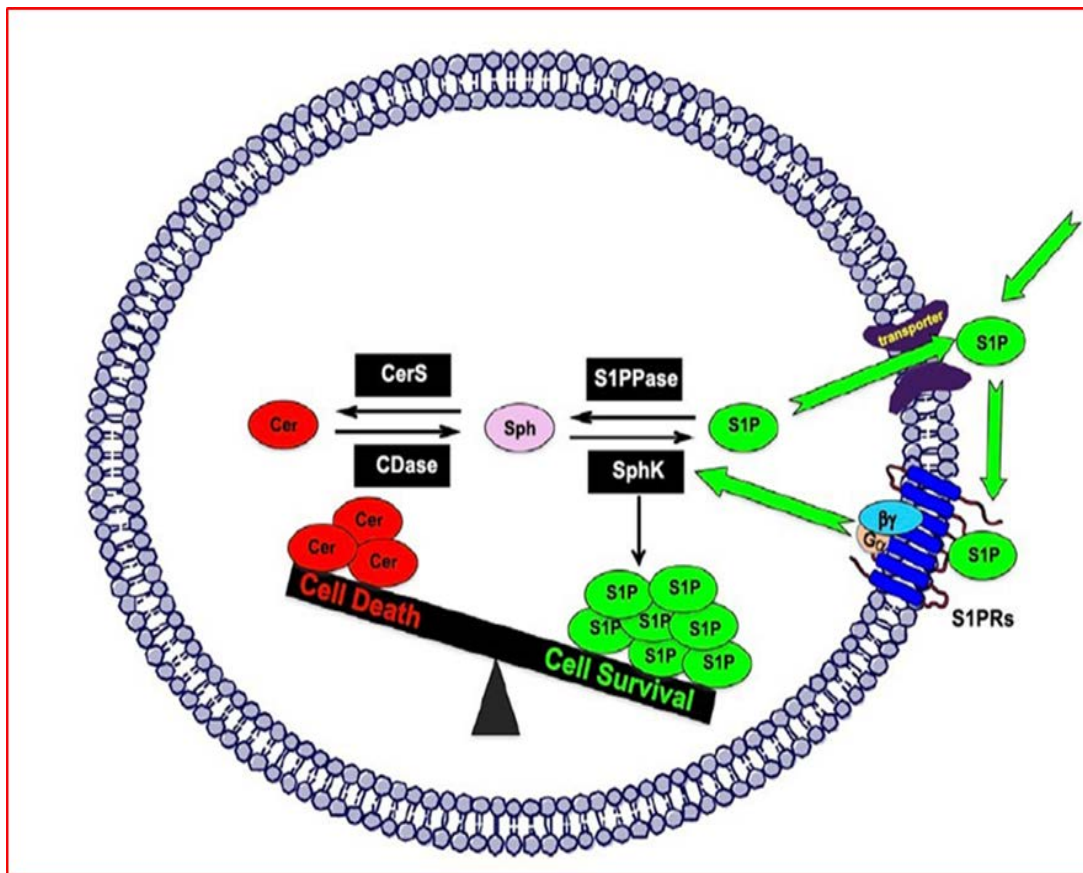


Figura 7. Rappresentazione schematica del reostato degli sfingolipidi (da Newton et al., 2015).

✓ *Ceramide*

Oltre al suo ruolo di precursore degli sfingolipidi complessi, il ceramide regola funzioni cellulari vitali come apoptosi, crescita cellulare, differenziamento, senescenza, diabete, insulino-resistenza, infiammazione, disordini neurodegenerativi e aterosclerosi (Arana et al., 2010).

I livelli intracellulari del ceramide aumentano in risposta a numerosi segnali extracellulari, quali shock termico, radiazioni ionizzanti, stress ossidativo, progesterone, vitamina D3, TNF- α , IL-1 α , IL-1 β , interferone- γ (INF- γ), ligando del Fas, agenti chemoterapici (Arana L. et al., 2010). In risposta a tali segnali il ceramide media l'apoptosi, attraverso tre probabili meccanismi:

- *agendo come messaggero secondario*, attraverso l'interazione diretta e la regolazione di proteine come CAPK (ceramide activated protein kinase), CAPP (ceramide activated protein phosphatase), proteina chinasi C ζ e catepsina D (Venkatamaran et al., 2000);
- *formando piattaforme di membrana ricche in ceramide*, in grado di concentrare e avvicinare diverse proteine di segnalazione. Questo potrebbe permettere l'attivazione o l'amplificazione di segnali, favorendo così l'interazione e l'oligomerizzazione di particolari recettori.

Questo effetto è stato osservato per i recettori Fas, i quali si concentrano in questi macrodomini e possono di conseguenza interagire con proteine effettrici come FADD (Fas-associated death domain) e caspasi (Bollinger et al., 2005);

- *modificando direttamente la funzionalità dei mitocondri*; ad esempio, il ceramide può formare canali nella membrana esterna del mitocondrio, attraverso i quali si può avere fuoriuscita del citocromo c e di altre proteine portando all'attivazione della via apoptotica caspasi-dipendente (Mencarelli et al., 2013).

Il ceramide è in grado di modulare anche l'autofagia, attraverso due meccanismi non mutuamente esclusivi: l'interferenza con la via di

segnalazione inibitoria della PI3K di classe 1 e la stimolazione dell'espressione del gene autofagico beclina 1 (Morales et al., 2007).

Un altro bersaglio cellulare del ceramide è la fosfolipasi D (PLD), che è l'enzima responsabile della formazione di acido fosfatidico, un potente agente mitogenico e un precursore di secondi messaggeri importanti, come l'acido lisofosfatidico e il DAG. Il ceramide è in grado di inibire la PLD, ma la funzione fisiologica di questa inibizione non è nota (De Larichaudy et al., 2012).

Recentemente molti studi sono incentrati a chiarire come ceramidi sintetizzati dalle diverse isoforme di CerS, possano avere funzioni diverse all'interno della cellula a seconda della lunghezza della loro catena N-acilica. L'overespressione delle diverse isoforme di CerS in cellule MCF-7 (cancro alla mammella) e HCT-116 (carcinoma del colon) ha dimostrato che l'aumento di C16 e C20-ceramide, ottenuto overesprimendo CerS4 e 6, provoca arresto della proliferazione e apoptosi; al contrario, un aumento della produzione di C24-ceramide ad opera di CerS2, sembra favorire la proliferazione cellulare (Hartmann et al., 2012). Successivamente è stato dimostrato, tramite esperimenti di cotransfezione di CerS in cellule HCT-116, che il bilancio all'interno della cellula tra ceramidi a catena lunga (C16-C20) e ceramidi a catena molto lunga (C24-C26) è fondamentale per la sopravvivenza cellulare e che un disequilibrio tra queste forme di ceramidi a favore di quelli a catena lunga, può essere determinante nell'innescarsi dei processi apoptotici (Hartmann et al., 2012).

✓ *Ceramide 1-fosfato*

Il C1P è un potente inibitore dell'apoptosi. Il suo effetto antiapoptotico è dovuto a due meccanismi: l'inibizione della SMasi acida e la stimolazione della PI3K. L'attivazione di PI3K genera PIP3, il quale può a sua volta inibire la SMasi acida. Entrambi questi processi concorrono a bloccare l'attività enzimatica della SMasi acida, che non sarà quindi in grado di produrre ceramide. Questa

mancata sintesi di ceramide è alla base del blocco dell'apoptosi (Arana et al., 2012; Gangoiti et al., 2011).

Il C1P esercita anche effetti mitogenici, attraverso la stimolazione delle vie di MEK/ERK1/2, PI3K/Akt e JNK (c-Jun terminal kinase). Inoltre, C1P attiva la capacità di legare il DNA del fattore di trascrizione NF-kB e aumenta l'espressione della chinasi 3b della glicogeno sintasi (GSK-3b), portando ad una up-regolazione della ciclina D1 e di c-Myc, che sono importanti marcatori della proliferazione cellulare (Arana et al., 2010) **(Figura 8)**.

E' stato dimostrato che C1P ha effetti pro-infiammatori. Nella linea cellulare A549 di adenocarcinoma polmonare C1P stimola in modo potente e specifico il rilascio di acido arachidonico e la sintesi di prostanoidi, attraverso l'attivazione diretta della fosfolipasi A2 citosolica (cPLA2) (Gaveglione et al., 2013).

Il C1P è implicato anche in altri processi infiammatori, come la fagocitosi nei neutrofili, l'attivazione della degranulazione dei mastociti e la stimolazione della migrazione dei macrofagi. In particolare, quest'ultimo effetto si ha in seguito all'aumento del C1P esogeno, ma non del C1P generato all'interno della cellula (Gomez-Muñoz et al., 2016). Bloccando inoltre il pathway di Akt e delle chinasi 1 e 2 si ha l'inibizione degli effetti indotti da C1P esogeno. Questi dati hanno portato a ipotizzare l'esistenza di un recettore accoppiato a proteine G_i in grado di fosforilare le proteine chinasi 1 e 2 e Akt quando attivato da C1P.

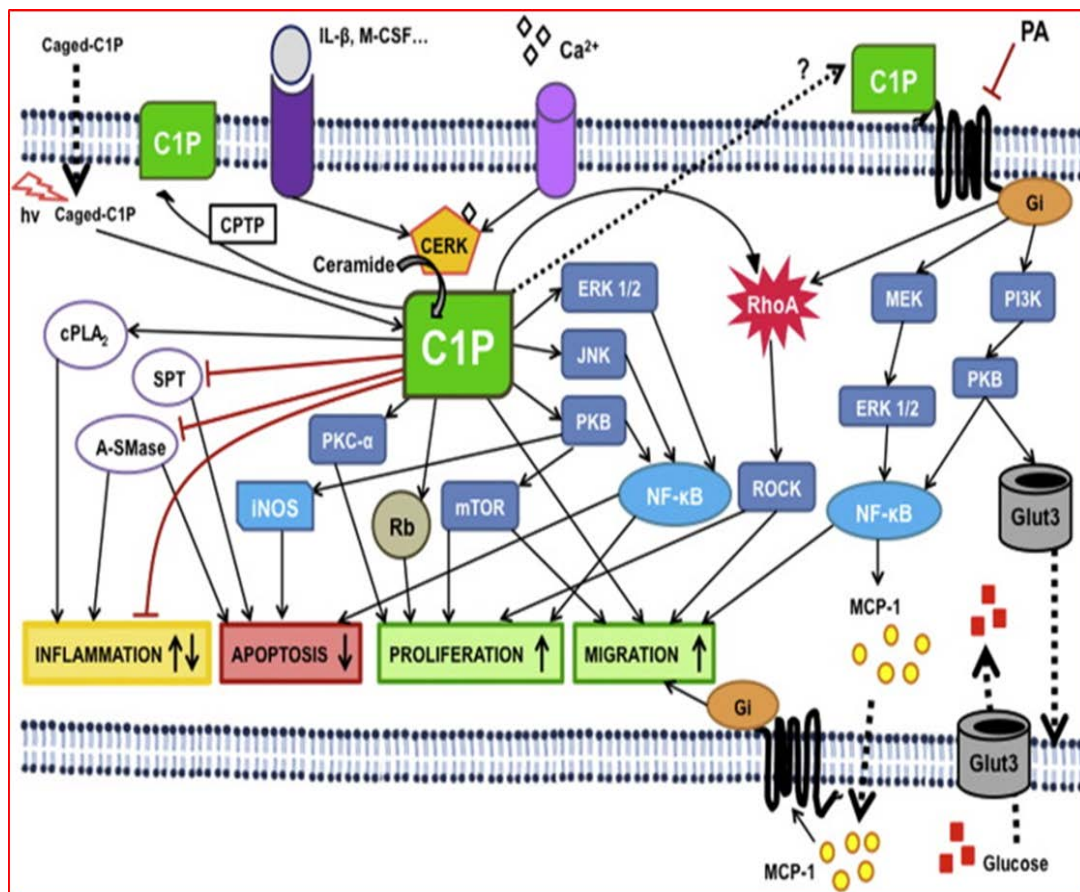


Figura 8. Rappresentazione schematica delle vie di segnalazione indotte da C1P nelle cellule di mammifero (da Gomez-Muñoz et al., 2016).

✓ Sfingosina

La prima attività biologica descritta per la sfingosina è stata quella di inibitore fisiologico della proteina chinasi C (PKC) (Hannun et al., 1986). La sfingosina può controllare anche l'attività di altri enzimi chiave della regolazione di vie metaboliche e di segnalazione, come la forma della fosfatidato fosfolipasi dipendente da Mg²⁺, la PLD e la DAGK (Arana et al., 2010). Inoltre, è stato scoperto che la sfingosina può essere il ligando del recettore del fattore steroidogenico 1, un recettore nucleare che ha un ruolo critico nello sviluppo endocrino del differenziamento sessuale (Liu et al., 2000).

SEGNALAZIONE “INSIDE-OUT” DI S1P TRAMITE S1PRS

S1P è implicata in meccanismi come proliferazione e sopravvivenza cellulare. Le sue proprietà antiapoptotiche hanno suscitato molto interesse verso questo sfingolipide e numerosi studi si propongono di analizzarne le funzioni come mediatore bioattivo. Questo ha permesso di scoprire che S1P è coinvolta in un elevato numero di processi biologici fondamentali, inclusi, ad esempio, riarrangiamenti citoscheletrici e motilità cellulare.

Una delle ragioni per cui S1P è in grado di mediare tanti meccanismi è che essa non agisce solo dall'interno della cellula, ma, una volta secreta nello spazio extracellulare, può interagire con recettori di membrana (Aoki et al., 2016).

Studi di delezioni geniche e studi farmacologici hanno dimostrato che molti degli effetti biologici di S1P sono mediati da cinque tipi di recettori di membrana accoppiati a proteine G eterotrimeriche leganti il GTP. Questi sono stati nominati S1P1, S1P2, S1P3, S1P4 e S1P5 (Chun et al., 2010; Sanchez et al., 2004).

E' stata ipotizzata l'esistenza di una relazione funzionale tra l'enzima SphK1 e i recettori di S1P, nominata segnalazione “inside out”. Questo modello prevede che S1P, prodotta all'interno della cellula dalla SphK1, venga rilasciata nell'ambiente extracellulare in stretta vicinanza ai propri recettori, così da aumentare l'efficienza del legame (**Figura 9**).

S1P può agire quindi in maniera autocrina e paracrina, legandosi a recettori poco distanti dal suo sito di produzione. In questo tipo di segnalazione, il rilascio di S1P all'esterno della cellula avviene per mezzo di proteine appartenenti alla famiglia dei trasportatori ABC (ATP-binding cassette), in particolare ABCC1, ABCA1 e ABCG2; tuttavia, topi knock-out per ABCA1 o ABCC1 presentano livelli plasmatici di S1P analoghi a quelli dei topi wild-type (WT), suggerendo che questi trasportatori non siano responsabili del mantenimento dei livelli plasmatici di S1P o che possano subentrare

meccanismi di trasporto compensatori (Pyne N.J. et al., 2010). Successivamente è stato infatti dimostrato che un altro trasportatore, Spns2 (Spinster 2), è in grado di effettuare il trasporto transmembranario di S1P. Spns2 è un trasportatore ATP indipendente che trasporta attraverso la cellula basi sfingoidi fosforilate, tra cui S1P e diidro-S1P. Utilizzando topi knock-out per questo gene, è stato dimostrato che Spns2 è fondamentale nella regolazione dei livelli plasmatici di S1P e dei livelli linfatici e linfonodali di questo lipide in grado di regolare il traffico dei linfociti e la risposta immunitaria (Aoki et al., 2016).

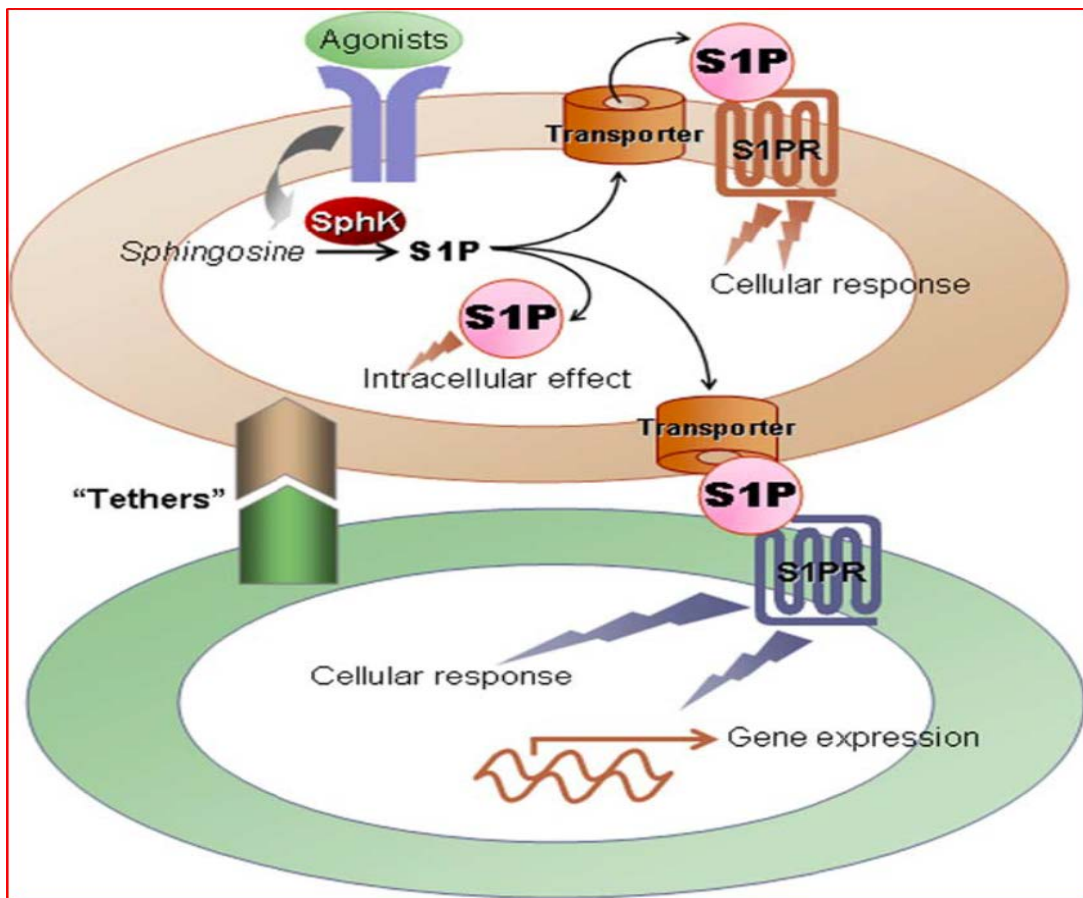


Figura 9. Meccanismo d'azione di S1P (da Xia et al., 2011)

I recettori di S1P sono ubiquitari, ma espressi in proporzioni differenti nei diversi tipi cellulari; questo, insieme al fatto che ognuno di essi interagisce con proteine G eterotrimeriche diverse, rende conto della capacità di S1P di regolare processi fisiologici differenti in maniera altamente specifica.

Il segnale può estinguersi per azione di fosfatasi agenti su S1P extracellulare (l'abbassamento della sua concentrazione determina una minor disponibilità nel legame con i recettori), o per desensitizzazione del recettore, causata dalla fosforilazione dello stesso da parte di chinasi specifiche: ciò determina un disaccoppiamento dalle proteine G e quindi una ridotta capacità di rispondere al proprio ligando.

Strutturalmente, questi recettori sono costituiti da 7 α eliche transmembranarie (TM 1-7), estremità N-terminale extracellulare recante siti di glicosilazione, porzione C-terminale intracellulare. Si osservano inoltre 3 loops rivolti verso l'esterno (ECL 1-3) e altrettanti verso l'interno (ICL 1-3) (Delgado et al., 2016).

S1P1 è ubiquitariamente espresso; topi knock-out per questo recettore hanno permesso di dimostrare che esso è coinvolto in eventi quali angiogenesi, maturazione vascolare, migrazione delle cellule immunitarie, funzionalità della barriera endoteliale e tono vascolare (Blaho et al., 2014); questi topi muoiono in fase di sviluppo embrionale a causa di disfunzioni gravi del sistema circolatorio.

S1P1 è accoppiato a proteine G_i e, quando lega S1P, è in grado di attivare diverse vie di segnalazione agendo su numerosi effettori a valle, fra cui adenilato ciclasi (AC), PLC, Akt, ERK1/2 e la GTPasi monomerica Rac (Kihara A. et al., 2007). Inoltre, il legame di S1P a S1P1 può portare alla transattivazione di recettori tirosino-chinasici di fattori di crescita (RTKs), quali i recettori di VEGF, EGF e PDGF (**Figura 10**).

Tutto questo media nella cellula meccanismi di proliferazione e sopravvivenza, riorganizzazione citoscheletrica e migrazione.

Il potente farmaco immunomodulatore FTY720 (Fingolimod) lega tutti i recettori di S1P, escluso S1P2. Trattandosi di un profarmaco, per ottenere la forma biologicamente attiva è necessaria la fosforilazione da parte di SphK2. FTY720 è un agonista del recettore S1P1, di cui induce internalizzazione e degradazione. Dal punto di vista clinico, il trattamento con FTY720 provoca sequestro dei linfociti, soprattutto T, nei tessuti linfoidi secondari (Sobel et al., 2015). Questo lo rende un possibile farmaco per il trattamento di malattie quali la sclerosi multipla (Takabe et al., 2008).

E' stato sviluppato un agonista altamente selettivo del recettore S1P1, il composto SEW2871. Come la S1P endogena, SEW2871 attiva il recettore S1P1 e ne induce la successiva internalizzazione e il riciclo (Blaho et al., 2014; Sammani et al., 2011; Xiao et al., 2016).

Ad oggi, l'unico antagonista disponibile altamente selettivo per il recettore S1P1 è il composto W146/ML056. In diversi studi viene utilizzato anche il composto VPC23019, antagonista sia di S1P1 che di S1P3 (ma l'effetto è circa dieci volte maggiore su S1P1 che su S1P3), il quale è in grado di revertire alcuni degli effetti mediati dal trattamento con SEW2871 (Huwiler et al., 2008).

S1P2 è espresso in molti tipi cellulari ed è il recettore più rappresentato dei cinque nelle cellule della muscolatura vascolare liscia. Topi knock-out per questo recettore non mostrano alla nascita difetti anatomici o fisiologici, ma in alcuni casi vanno incontro a morte tra la terza e la settima settimana di vita.

A livello cellulare, la mancanza di S1P2 causa aumento dell'eccitabilità dei neuroni piramidali neocorticali, dimostrando così che questo recettore è implicato nella regolazione dell'eccitabilità di membrana a livello neuronale (Blanc et al., 2015).

S1P2 inoltre, in combinazione con S1P3, tramite l'attivazione di Akt è in grado di regolare la sopravvivenza dei cardiomiociti in seguito a danno ischemico (Means et al., 2007).

Questo recettore può essere accoppiato a diversi tipi di proteine G, come G_i , $G_{12/13}$, e G_q (Skoura et al., 2009). La sua attivazione è quindi in grado di regolare diverse vie di segnalazione: attraverso le subunità " $\beta\gamma$ " di G_i , S1P2 attiva la MAP chinasi ERK1/2, mentre attraverso la subunità " α " di G_q attiva la PLC. S1P2 è un attivatore più efficiente della via di segnalazione PLC/IP3/ Ca^{2+} rispetto a S1P1, ma non rispetto all' isoforma S1P3 (**Figura 10**). Attraverso $G_{12/13}$ può portare all'attivazione della GTPasi monomerica Rho; infatti, in cellule che over-esprimono S1P2 trattate con S1P si ha la formazione di fibre da stress in modo Rho-dipendente (Takata et al., 2008). Questo effetto è stato osservato principalmente a livello delle fibre muscolari lisce (Takashima et al., 2008), dove il recettore S1P2 promuove anche l'espressione dei geni coinvolti nei meccanismi di differenziamento (Adada et al., 2013).

Il composto sintetico JTE-013 è stato caratterizzato come antagonista competitivo del recettore S1P2, privo di effetti sugli altri recettori (Osada et al., 2002).

S1P3 è espresso a livelli elevati in cuore, fegato, milza, rene, intestino, diaframma e cartilagine, ma la sua delezione genica non risulta in un fenotipo particolare. Si può trovare associato a tre tipologie di proteine G: G_i , $G_{12/13}$ e G_q ; l'associazione con G_q è la più frequente. In seguito al legame con S1P si ha l'attivazione della via PLC/IP3/ Ca^{2+} , con formazione di IP3 e DAG, che portano ad un aumento di Ca^{2+} intracellulare e all'attivazione della PKC (Kihara et al., 2007) (**Figura 10**).

S1P può inoltre stimolare la migrazione in linee cellulari che overesprimono S1P3 tramite la via attivata da G_i : bloccando infatti G_i con la tossina della pertosse, S1P3 inibisce l'attivazione di Rac e la migrazione cellulare, suggerendo che la via di G_i sia dominante su quella di $G_{12/13}$ (Kihara A. et al., 2007).

È stato associato un ruolo ad S1P3 anche nella tumorigenesi: esso, infatti, risulta upregolato in cellule di adenocarcinoma polmonare e attraverso il pathway della Rho chinasi aumenta l'espressione del recettore di EGF. Tale effetto è stato correlato con un aumento della proliferazione e dell'invasività delle cellule tumorali (Hsu et al., 2012).

S1P4 ha un'espressione molto limitata; si può trovare a livello delle cellule del sistema immunitario e dei leucociti (Delgrado et al., 2016; Dillmann et al., 2016). Non ne sono stati descritti gli effetti su topi knock-out, ma è stato ipotizzato che questo recettore abbia un ruolo nella regolazione della produzione di citochine da parte delle cellule T (Mahajan-Thakur et al., 2015). S1P4 attiva PLC, ERK e Cdc42 in un modo sensibile alla tossina della pertosse, per questo si pensa che sia accoppiato a proteine G_i (Kihara et al., 2007) (**Figura 10**).

S1P5 è espresso principalmente in zone della sostanza bianca del sistema nervoso centrale, in particolare negli oligodendrociti (Brinkmann, 2007). E' inoltre espresso a livello delle cellule NK (natural killer) del sistema immunitario (Walzer et al., 2007), regolandone la fuoriuscita dai vasi linfatici (Mayol et al., 2011).

S1P5 è accoppiato a proteine G_i e G_{12} . La via mediata da G_i inibisce l'AC e stimola l'aumento dei livelli di Ca^{2+} intracellulare. Inoltre, questo recettore è in grado di inibire ERK, ma in modo indipendente da G_i (**Figura 10**).

Alcuni studi, inoltre, ne ipotizzano un ruolo nella tumorigenesi (Adada et al., 2013). Tuttavia, i risultati ottenuti in tal senso sono scarsi e contrastanti; ulteriori indagini sono richieste, poiché il recettore potrebbe essere un target per farmaci chemioterapici.

A livello degli oligodendrociti e dei loro precursori, la conseguenza funzionale dell'attivazione di questo recettore dipende dal loro stadio di sviluppo. Attraverso il pathway che porta all'attivazione della Rho chinasi, impedisce la

migrazione degli oligodendrociti immaturi (Novgordov et al., 2007), mentre media la sopravvivenza di quelli maturi, attraverso un pathway AKT-dipendente.

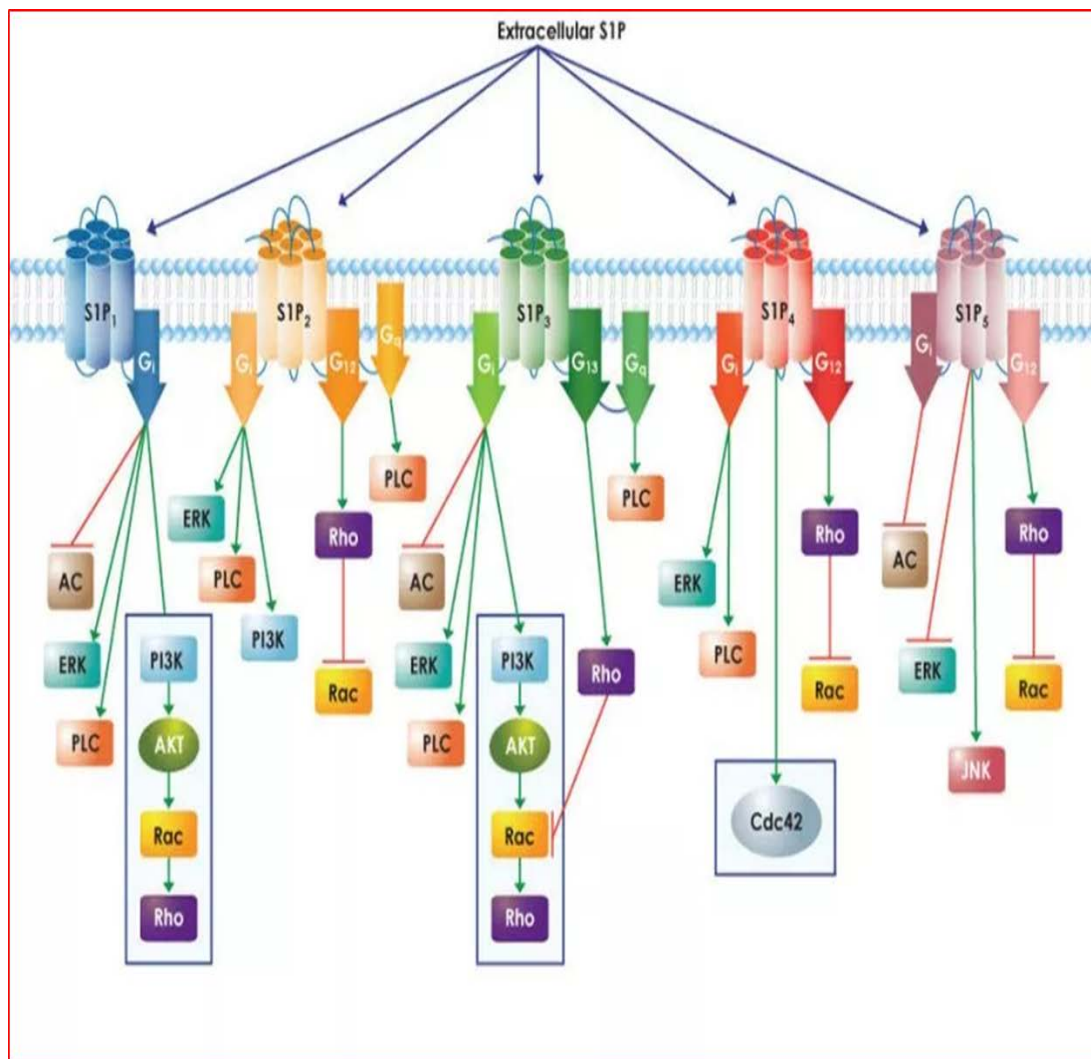


Figura 10. Rappresentazione schematica delle principali vie di segnalazione a valle dei recettori specifici per S1P (da SPHINGOLIPIDS: THE SPHINX OF LIPIDS Tom Brock, PhD Research Project)

SFINGOLIPIDI E MUSCOLO SCHELETRICO

È stato ormai ampiamente dimostrato che sfingolipidi bioattivi come ceramide, sfingosina e S1P hanno un ruolo importante nella regolazione dei processi biologici del muscolo scheletrico. In particolare, queste molecole sono implicate nell'attivazione delle cellule staminali residenti nel muscolo scheletrico, nella loro proliferazione e nel differenziamento, finalizzato alla rigenerazione del tessuto. Inoltre, gli sfingolipidi sono coinvolti nella regolazione delle proprietà contrattili, nella risposta del tessuto a ormoni come l'insulina (Strackowski et al., 2007), nel controllo della fatica (Cowart 2010) e nel trofismo delle fibre muscolari.

✓ *Regolazione di crescita e differenziamento del muscolo scheletrico*

Molti studi su crescita e differenziamento delle cellule muscolari scheletriche sono condotti *in vitro*, utilizzando linee cellulari come i mioblasti di topo C2C12, derivati da cellule satelliti murine, e le cellule muscolari L6 di ratto. Il lipide bioattivo S1P innesca nei mioblasti C2C12 numerose vie di segnalazione, attivando la PLD e la GTPasi monomeriche RhoA (Meacci et al., 2001) e aumentando i livelli citosolici di Ca^{2+} (Meacci et al., 2005).

I recettori della S1P espressi sul sarcolemma mioblasti sono S1P1, S1P2 e S1P3. I livelli di espressione di questi recettori variano durante il differenziamento miogenico delle cellule C2C12; in particolare l'espressione di S1P2 diminuisce progressivamente durante il differenziamento, fino ad essere quasi nulla nei miotubi formati (Meacci et al., 2003).

Studi successivi hanno dimostrato che S1P è un regolatore negativo della proliferazione indotta da siero ed un potente attivatore del differenziamento delle cellule C2C12. Questo effetto è mediato dall'attivazione delle vie di ERK 1/2 e di p38 MAPK, conseguente al legame di S1P proprio al recettore S1P2 (Donati et al., 2004).

Tra gli eventi a valle implicati nell'effetto promiogenico di S1P sono stati identificati la regolazione della proteina delle gap junction connessina-43 (Cx-43) (Meacci et al., 2010; Squecco et al., 2006) e il rimodellamento dell'actina, con formazione di fibre da stress (Formigli et al., 2007).

La proteina Cx-43 ha un ruolo fondamentale nel sincronizzare il differenziamento dei mioblasti e nel renderli competenti per la fusione. L'upregolazione di questa proteina mediata da S1P raggiunge un massimo a 48 ore dall'inizio del differenziamento.

E' stato dimostrato che per questo processo è richiesta l'attività del canale del Ca^{2+} TRPC1, l'isoforma più espressa nei mioblasti C2C12 dei canali della famiglia TRPC (transient receptor potential canonical) (Formigli et al., 2009). In particolare, è noto che il collegamento funzionale tra TRPC1 e Cx-43 nel differenziamento indotto da S1P è costituito dall'asse *m*-calpaina/PKC α .

La PKC α è un noto regolatore negativo della miogenesi ed il suo calo fisiologico durante il differenziamento è associato con l'up-regolazione della Cx-43, indotta da S1P. E' chiaro inoltre che la fosforilazione delle connesine dipendente dalla PKC α è in grado di modificare la loro capacità di interagire con altre proteine della membrana plasmatica.

Dal momento che la diminuzione della PKC α è annullata dal silenziamento e dalla inibizione della *m*-calpaina, è stato ipotizzato che la chinasi sia un substrato dell'attività proteolitica della *m*-calpaina stessa. In conclusione, è stato osservato che i canali TRPC1 sono coinvolti nell'espressione della Cx-43 in mioblasti indotti al differenziamento da S1P, attraverso l'attivazione della *m*-calpaina, la conseguente riduzione della PKC α e la stabilizzazione della localizzazione della Cx-43 alla membrana plasmatica (Meacci et al., 2010).

Sono state trovate evidenze di un ruolo fisiologico dell'enzima SphK1 nella proliferazione e nel differenziamento dei mioblasti. La quantità di proteina SphK1 e la formazione di S1P sono aumentati sia in mioblasti che raggiungono la confluenza che in cellule in differenziamento (Meacci et al., 2008). Un'aumentata espressione di SphK1 riduce la proliferazione dei

mioblasti, aumenta l'espressione di marcatori del differenziamento miogenico e anticipa il raggiungimento di un fenotipo differenziato. La down-regolazione di SphK1, invece, aumenta significativamente la crescita cellulare e ritarda l'inizio della miogenesi.

Il ruolo biologico della SphK1 nei mioblasti appare quindi diverso da quello esercitato nella maggioranza degli altri tipi cellulari, nei quali promuove la proliferazione. Inoltre, la stimolazione della miogenesi in mioblasti over-esprimenti SphK1 è annullata dal silenziamento di S1P2 (Meacci E. et al., 2008). Ciò indica che l'asse SphK1/S1P2 è una parte del meccanismo molecolare che regola la miogenesi indotta da agonisti.

Anche il ceramide è implicato nella regolazione del differenziamento miogenico. Il contenuto cellulare di ceramide durante il differenziamento miogenico mostra una diminuzione precoce, compatibile con la formazione di altri sfingolipidi, seguita da un aumento marcato e sostenuto. L'inibizione della sintesi de novo del ceramide ne diminuisce i livelli cellulari e anticipa il raggiungimento di un fenotipo differenziato (Mebarek et al., 2007). E' stato proposto che l'effetto promiogenico esercitato dall'inibizione della sintesi di ceramide dipenda dal fatto che questo sfingolipide regola negativamente la PLD, dal momento che la segnalazione mediata dall'acido fosfatidico è richiesta per la miogenesi (Jaafar et al., 2013).

✓ *Effetto della S1P sulla rigenerazione e sull'atrofia del muscolo scheletrico*

In uno studio di Danieli-Betto e collaboratori del 2010 è stato valutato l'effetto di S1P nella rigenerazione del muscolo scheletrico (in questo caso, muscolo *Soleus* di topi adulti). La somministrazione esogena di S1P stimola la crescita delle miofibre in rigenerazione, mentre la diminuzione dei livelli circolanti di questo sfingolipide produce l'effetto opposto. L'aumento della crescita delle miofibre stimolato da S1P si accompagna ad una aumentata espressione dei fattori miogenici MyoD e miogenina.

Inoltre, in uno studio di Nagata e collaboratori del 2014 è stato dimostrato che la somministrazione di S1P provoca un aumento del numero di cellule satelliti che entrano nel ciclo cellulare in risposta al danno, mentre l'inibizione della produzione di S1P ne riduce l'attivazione e diminuisce la rigenerazione del muscolo danneggiato.

In colture primarie di cellule satelliti sembra che l'azione proliferativa di S1P sia mediata dal legame dello sfingolipide bioattivo con i recettori S1P1 ed S1P3 (Calise et al., 2012), e, curiosamente, quando le cellule sono in coltura da 4 giorni ed iniziano a differenziare, si ha una variazione nel pattern di espressione dei sottotipi recettoriali di S1P.

La constatazione che S1P evoca azioni biologiche diverse nelle cellule satelliti e nei mioblasti, essendo pro-mitogenica nel primo caso e prodifferenziante nel secondo, non solo conferma il ruolo centrale che l'asse SphK1/S1P riveste nella biologia del muscolo scheletrico, ma rafforza anche l'idea che le vie di segnalazione a valle dei recettori specifici per S1P vengono attivate differenzialmente durante la miogenesi.

S1P1 e S1P3 sono infatti i due sottotipi recettoriali più espressi nelle cellule satelliti quiescenti, mentre S1P2 è assente nelle cellule quiescenti, ma si trova espresso nelle cellule satelliti attivate ed in proliferazione. Nel muscolo adulto si trovano poi espressi S1P1 e S1P3 (a livelli più elevati), localizzati sulla membrana plasmatica e a livello dei tubuli T (Zanin et al., 2008).

È importante sottolineare che, il ruolo di S1P2 è stato studiato in vivo, durante la rigenerazione del muscolo soleo in seguito agli effetti tossici indotti dalla somministrazione di una neurotossina: la rigenerazione tissutale, infatti, è tardiva in topi in cui l'espressione genica di S1P2 è stata silenziata e/o in animali trattati con l'antagonista selettivo per S1P2, JTE-013 (Germinario et al., 2012).

Tra i processi biologici regolati da S1P nei mioblasti, è stato riportato che lo sfingolipide bioattivo esercita un'azione anti-migratoria in cellule C2C12,

riducendone la motilità e inibendo la chemiotassi indotta da IGF-1 (Becciolini et al., 2006).

Questi risultati, inizialmente possono sembrare in contrasto con l'azione promigratoria di S1P osservata nelle cellule satelliti (Calise et al, 2012): in realtà tutto ciò suggerisce che la motilità cellulare deve essere favorita nel momento in cui le cellule satelliti vengono reclutate nel sito di danno muscolare e successivamente deve essere regolata negativamente per stabilire i contatti adeguati cellula-cellula e per permettere la fusione con le fibre preesistenti.

A questo proposito, il duplice ruolo svolto da S1P nel controllo della migrazione delle cellule satelliti e nel successivo differenziamento in mioblasti, sottolinea ulteriormente la sua critica azione pleiotropica durante la miogenesi e la riparazione del muscolo scheletrico.

L'aggiunta di S1P esogena inoltre controbilancia la perdita di massa muscolare indotta da denervazione e, regolando l'espressione del gene codificante per la catena pesante della miosina (Myosin Heavy Chain, MHC), impedisce il rallentamento della contrazione delle fibre veloci a causa del disuso (Zanin et al., 2008). Gli stessi effetti si ottengono somministrando sfingosina, che viene convertita a S1P dalla SphK1 presente sulla superficie extracellulare delle fibre muscolari scheletriche.

Durante la denervazione si ha anche un aumento del numero di nuclei apoptotici, che non viene diminuito dalla somministrazione di S1P o di sfingosina. Ciò suggerisce che la S1P non protegga il muscolo dall'apoptosi indotta da denervazione, ma eserciti la sua azione protettiva attraverso altri meccanismi, che coinvolgono probabilmente effetti trofici.

Poiché durante un esercizio intenso il muscolo genera sfingosina, è possibile che S1P eserciti effetti trofici autocrini/paracrini sulle fibre muscolari scheletriche, contribuendo a mantenere la massa muscolare adeguata al livello di attività. Nel muscolo reso inattivo dalla denervazione, questo effetto autocrino è probabilmente ridotto, sia perché non si ha più produzione di

sfingosina, sia perché la denervazione è associata a down-regolazione dei recettori S1P1 ed S1P3 (Zanin et al.,2008).

S1P è quindi un mediatore chiave in grado di dirigere molti processi biologici coinvolti nella biologia del muscolo scheletrico: la proliferazione, la migrazione, il differenziamento miogenico e la rigenerazione tissutale. Una singola molecola ma una moltitudine di funzioni.

MATERIALI E METODI

MODELLO ANIMALE

Le biopsie di muscolo EDL di topi Balb/C su cui sono state condotte le analisi sono state gentilmente fornite dalla Prof.ssa Costelli (Università degli Studi di Torino). Gli animali sono stati mantenuti su un normale ciclo luce-buio (luce 8:00-20:00), con libero accesso al cibo e all'acqua durante tutto il periodo sperimentale, compresa la notte prima del sacrificio. Essi sono stati curati in conformità con le linee guida del Ministero della Salute italiano (n°86609 EEC) e con la politica sulla cura e l'uso di animali da laboratorio. Il protocollo sperimentale è stato approvato dal Comitato di Bioetica dell'Università degli Studi di Torino. I topi utilizzati come modello di cachessia pesavano all'incirca 17 g e sono stati inoculati per via sottocutanea dorsale con 5×10^5 cellule di adenocarcinoma del colon C26. Gli animali sani, usati come controlli, pesavano circa 23 g. Il peso, l'assunzione di cibo e la perdita di massa muscolare venivano registrati tutti i giorni. Entrambi i gruppi di animali (C26 e controlli) sono stati sacrificati sotto anestesia circa dopo 12 giorni dal trapianto del tumore nei soggetti C26. Da questi, successivamente, sono state escisse le biopsie di muscolo EDL, le quali sono state pesate, congelate in azoto liquido e successivamente conservate a -80°C in attesa di analisi istologiche e molecolari (Penna F. et al., 2009).

✓ *Trasfezione delle fibre muscolari EDL tramite elettroporazione*

Gli esperimenti di elettroporazione sono stati condotti anch'essi nel laboratorio della Prof.ssa Costelli sul muscolo tibiale di topi cachettici C26 e dei corrispettivi controlli. Sono stati utilizzati plasmidi pLKO.1 (Clontech, Palo Alto, CA) codificanti per una corta sequenza disordinata "scrambled" di RNA a doppio filamento (SCR-shRNA) non omologa ad alcun gene e per questo

utilizzata come controllo negativo ed una mix di tre plasmidi codificanti per short hairpin RNA disegnati in tre regioni diverse dell'mRNA codificante per CerK (CerK-shRNA).

Il vettore plasmidico pLKO.1 è così costituito: sequenze retrovirali murine LTR (Long Terminal Repeats), gene per la resistenza all'antibiotico ampicillina e promotore U6 che controlla l'espressione dello shRNA.

I plasmidi d'interesse sono stati purificati mediante kit NucleoBond Xtra Maxi (Macherey-Nagel GmbH, Duren, Germania), in accordo con le istruzioni fornite da protocollo.

Un minuto dopo l'iniezione di 25 µl di DNA plasmidico purificato, sono stati applicati alle zampe anteriori di entrambi i gruppi di animali (C26 e controlli) 2 elettrodi collegati a una piastra in acciaio inox e sono stati inviati tre impulsi sottocutanei di 20 ms ciascuno ad un voltaggio di 75V. L'elettroporazione è stata effettuata dieci giorni prima del sacrificio dell'animale, a 2 giorni dall'inoculazione sottocutanea di cellule di adenocarcinoma del colon C26 nei topi cachettici, seguendo un protocollo tale da limitare i danni tissutali e da evitare risposte infiammatorie in loco.

COLTURE CELLULARI

Le linee cellulari utilizzate in questo progetto di tesi sono le seguenti:

A) linea immortalizzata di mioblasti murini C2C12

B) linea immortalizzata di mesenchimali stromali murine derivate da midollo osseo (BM-MSCs).

A) Le cellule sono state mantenute in coltura in piastre di Petri di 100 mm di diametro, in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) addizionato con siero fetale bovino (FBS, Sigma) al 10%, con aggiunta di una soluzione di penicillina e streptomina (10000 unità di penicillina e 10 mg di streptomina per ml, Sigma) all'1% e di L-glutamina (Sigma) all'1%. Le piastre sono state mantenute in incubatore a 37°C in atmosfera umidificata contenente il 5% di CO₂. Una volta raggiunta una confluenza del 70%, le cellule sono state lavate con la soluzione fisiologica Phosphate Buffered Saline (PBS, Sigma) + 1% mix di antibiotici (sopra descritta), staccate dalla piastra con tripsina 1X (Sigma), contate nella camera di Burker e piastrate in piastre multi-well da sei pozzetti con terreno fresco, alla densità richiesta per gli esperimenti.

Ad una confluenza del 95%, sono state indotte a differenziare sostituendo il DMEM con 10% FBS con un terreno di differenziamento (DM), costituito da DMEM addizionato con siero di cavallo HS (Horse Serum) al 2% (Sigma). Le cellule sono state mantenute in queste condizioni per circa 7 giorni (normalmente necessari per ottenere un completo differenziamento) ed in questo periodo il terreno è stato cambiato ogni 24-48 h.

Una volta ottenuti miotubi completamente differenziati, si procedeva agli esperimenti. Il terreno è stato aspirato e, dopo aver lavato le cellule in PBS, sostituito con DMEM addizionato con l'1% di FBS. Nei vari esperimenti, nel mezzo di coltura sono stati aggiunti i seguenti composti:

- sfingosina 1-fosfato (S1P, Tocris), utilizzata alla concentrazione 2 μ M (da una soluzione stock 2 mM);
- composto II, inibitore di SphK1 (iSK, Calbiochem), utilizzato alla concentrazione 5 μ M (da una soluzione stock 20 mM);
- K1, inibitore non competitivo di CerK (iCK, Calbiochem), utilizzato alla concentrazione 5 μ M (da una soluzione stock 10 mM);
- NVP-231, inibitore competitivo di CerK (Sigma), utilizzato alla concentrazione 100 nM (da una soluzione stock 30 mM);
- SEW2871, agonista specifico di S1P1 (Tocris), utilizzato alla concentrazione 1 μ M (da una soluzione stock 20 mM);
- W146/ML056 antagonista specifico di S1P1 (Sigma): utilizzato alla concentrazione 2 μ M (da una soluzione stock 600 μ M);
- JTE-013 antagonista specifico di S1P2 (Tocris), utilizzato alla concentrazione 1 μ M (da una soluzione stock 10 mM);
- CYM5541 agonista specifico di S1P3 (Sigma): utilizzato alla concentrazione 2 μ M (da una soluzione stock 15 mM);
- VPC23019 antagonista non specifico di S1P1/S1P3 (Avanti Polar Lipids), utilizzato alla concentrazione 1 μ M (da una soluzione stock 10 mM).

Negli esperimenti che prevedevano di valutare l'effetto di queste sostanze nel prevenire o meno l'atrofia muscolare indotta da desametasone, quest'ultimo è stato aggiunto al mezzo di coltura 1 h dopo la sostanza stessa, alla concentrazione di 100 μ M (da una soluzione stock Tocris 100 mM).

Le cellule sono state raccolte dopo 24 o 48 h dal trattamento.

B) La linea immortalizzata di BM-MSCs è stata mantenuta in coltura nelle stesse condizioni dei mioblasti C2C12, solo aggiungendo al DMEM il 20% di

FCS. Raggiunta una confluenza del 100%, è stato loro sostituito il terreno di coltura con il terreno di differenziamento (DM) delle C2C12 o con il terreno di colture primarie di cellule satelliti in attiva proliferazione (PM) in assenza (MSC-DM; MSC-PM) o in presenza dell'inibitore di SphK1 (iSK, 5 μ M) (MSC-DM+iSK; MSC-PM + iSK). Il mezzo condizionato è stato raccolto da tutte le piastre di BM-MSCs dopo 48h, centrifugato a 1000 g x 5 min per rimuovere i detriti cellulari e successivamente aggiunto in coltura a C2C12 e cellule satelliti per valutare gli eventuali effetti paracrini che il terreno condizionato raccolto dalle MSCs avesse indotto su entrambe le linee cellulari.

Una parte dell'attività di ricerca, infine, è stata condotta utilizzando colture primarie di cardiomiociti preparate dai ventricoli di topi neonati (1-2 giorni di vita) (Harlan) e mantenute in coltura secondo il protocollo riportato in Formigli et al.,2007. I cardiomiociti isolati sono stati usati per le prime due settimane (passaggi 0-1). Sono stati inoltre utilizzati per gli stessi esperimenti cardiomioblasti immortalizzati di ratto H9C2 (American Type Culture Collection, ATCC).

Entrambe le popolazioni sono state mantenute in coltura secondo il protocollo dei mioblasti C2C12 e, raggiunta una confluenza del 70%, sono state lasciate overnight in terreno privo di siero prima del trattamento con diverse concentrazioni di H2-RLX (50 ng/ml) (ConneticsCo).

✓ *Trasfezione di mioblasti C2C12 mediante Lipofectamine*

Per inibire l'espressione di CerK, i mioblasti C1C12 al 70% di confluenza (che si raggiungeva seminando 100000 cellule in multi-well da sei pozzetti 48h prima) sono stati trasfettati con una mix di plasmidi pLKO.1 (Clontech, Palo Alto, CA) con le stesse caratteristiche precedentemente descritte.

La trasfezione è stata effettuata mediante lipofectamine (Lipofectamine™ 2000, Invitrogen).

Per ottimizzare l'efficienza del protocollo è stato necessario determinare la corretta quantità di DNA plasmidico e lipofectamine da utilizzare in relazione allo specifico tipo cellulare da trasfettare; in questo caso sono stati utilizzati 20µl di DNA e 1mg/mL di Lipofectamine che sono stati opportunamente diluiti in DMEM senza siero. Affinchè lo shRNA venisse complessato dalle lipofectamine, le due soluzioni diluite sono state miscelate in un volume totale di 100 µl e mantenute a temperatura ambiente per 20 min. Successivamente, è stato cambiato il terreno di coltura dei mioblasti C2C12 con DMEM al 10% FBS senza antibiotici (per evitare che vi fosse interferenza con la trasfezione) ed è stata aggiunta la soluzione trasfettante al monostrato cellulare. Le piastre sono state poste in incubatore a 37 °C per 6 ore ed in seguito è stato rimosso il terreno sostituendolo con del terreno fresco per evitare effetti di tossicità cellulare dovuti alla permanenza delle lipofectamine in coltura. Le cellule sono state raccolte dopo 24-72 h dalla trasfezione. L'efficacia di trasfezione nel downregolare l'espressione di CerK (circa il 60%) è stata valutata in Western Blotting e confermata mediante Real Time PCR.

RETROTRASCRIZIONE E REAL TIME PCR

L'RNA totale sia dalle biopsie muscolari EDL che dalle colture cellulari è stato estratto in TRI Reagent® (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) seguendo le istruzioni fornite da protocollo. La concentrazione e la purezza dell'RNA estratto è stata valutata misurando l'assorbanza alle lunghezze d'onda 260 e 280 nm e l'assenza di degradazione è stata confermata con elettroforesi su gel d'agarosio con l'aggiunta di bromuro d'etidio. Per evitare contaminazioni da DNA genomico, l'RNA estratto (0,5-1µg) è stato sottoposto ad un pretrattamento con 2-10 U di desossiribonucleasi (DNASI) (Roche Diagnostics or Invitrogen). In seguito, è stata allestita una reazione di retrotrascrizione usando il kit commerciale High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Life Technologies), in un volume totale di 20 µl, in accordo con le istruzioni fornite da protocollo. I campioni sono stati incubati a 25°C for 10 min, 37°C for 120 min ed infine a 85°C per 5 min in un termociclatore (PerkinElmer). Successivamente, sono stati conservati a -20°C.

I livelli di espressione dei geni target sono stati quantificati mediante Real Time PCR utilizzando 7500 Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, CA, USA). Ciascun campione è stato caricato in duplicato e ad ogni mix di reazione sono stati aggiunti controlli negativi. La mix di reazione, allestita in 25 µl totali, era così composta: 200 ng di cDNA, 0,25 µM di ciascun primer (forward e reverse) e 2X Power Sybr Green PCR Master Mix (Life Technologies). Per l'amplificazione dei geni target sono state utilizzate le seguenti coppie di primers (i primers sono stati disegnati in regioni che presentavano alta omologia di sequenza tra le tre specie Homo Sapiens, Mus Musculus e Rattus Norvegicus):

Atrogin-1/MAFbx: Forward 5'-GCAGCCAAGAAGAGAAAGAA-3'

Reverse 5'-CTGTGACTTTGCTATCAGC-3'

CerK:	Forward 5'-GGACTTAATCAAGGACAGTGA-3'
	Reverse 5'-AGGACAGTGTCCTTCATAG-3'
S1P1:	Forward 5'-CCGCAAGAA CATCTCCAAGG-3'
	Reverse 5'-GGCAATGAAGACACTCAGGA-3'
S1P2:	Forward 5'-CATCGTGGTGGAGAATCTTCTG-3'
	Reverse 5'-CAGGTTGCCAAGGAACAGGTA-3'
S1P3:	Forward 5'-CCACCTGCAGCTTATGGCC-3'
	Reverse 5'-GGCAATTAGCCAGCACATCCC-3'
Spns2:	Forward 5'-GGCCATCACTGCAGACATCC-3'
	Reverse 5'-AAAGCCAATGAGGTAGGGGC-3'
SphK1:	Forward 5'-CTGGCAGCTTCTGTGAACCA-3'
	Reverse 5'-TGTGCAGGGACAGCAGGTTCA-3'

L' amplificazione dei geni target è stata condotta parallelamente a quella del gene housekeeping GAPDH per cui sono stati utilizzati i seguenti primers:

GAPDH:	Forward 5'-GGCAAATTCAACGGCACAGTC-3'
	Reverse 5'-TCGCTCCTGGAAGATGGTG-3'

Per ciascuna reazione è stato utilizzato il seguente profilo termico: 95°C per 10 min, seguiti da 40 cicli a 95°C per 30s, 50°-55°C per 30s e 72°C per 45s (l'emissione in fluorescenza è stata acquisita durante lo step di elongazione). Infine è stato impostato il seguente profilo di dissociazione: 95°C per 15s, 60°C per 60s, 95°C per 15s e 60°C per 15s.

I risultati sono stati analizzati tramite il metodo di quantificazione comparativa $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak & Schmittgen, 2001) e i valori ottenuti sono stati normalizzati in base all'espressione del gene housekeeping GAPDH.

ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE E WESTERN BLOTTING

Le cellule e le biopsie muscolari sono state lisate per 30 min a 4°C in un tampone contenente 50 mM TrisHCl pH 7.5, 120 mM NaCl, 1 mM EDTA, 6 mM EGTA, 15 mM Na₄P₂O₇, 20 mM NaF, 1% Nonidet P 40 ed una combinazione di inibitori delle proteasi: 1.04 mM 4-2-aminoetil benzenesulfonil fluoride idrocloride (AEBSF) F, 0.08 mM aprotinina, 0.02 mM leupeptina, 0.04 mM bestatina, 15 mM pepstatina A e 14 mM E-64. I lisati ottenuti sono stati centrifugati a 600gX5 min e le proteine sono state dosate usando il metodo colorimetrico di Bradford (Biorad, Hercules,CA).

I campioni (20-30 µg) sono stati sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilammide (SDS-PAGE) per 2h a 150V e successivamente le proteine sono state trasferite su una membrana di Polivinilidenfluoruro (PVDF) (GE Helthcare, Buckinghamshire, UK). Le membrane sono state poi lavate in PBS tre volte per 10 min e sono state incubate per 1h a temperatura ambiente in una soluzione di "blocking", costituita da PBST (PBS contenente lo 0,1% di Tween 20) con il 5% di non-fat dry milk (Bio-Rad). Dopo ulteriori tre lavaggi in PBST di 10 min, le membrane sono state incubate overnight a 4°C con gli anticorpi primari anti-Atrogin-1/MAFbx e anti-MuRF1 (ECM biosciences); anti-CerK (abcam); anti-SphK1 e anti-fosfo-SphK1 (ECM biosciences); anti-S1P1 (Sigma); anti-S1P3 (Cayman Chemical Company); anti-Spns2 (Sigma); anti-Connessina-43 (Cx43, Sigma), anti-β-actina (Santa Cruz) e anti-β-tubulina (Sigma). L'anticorpo primario è stato diluito in PBS-T con lo 0,2% di non-fat dry milk. Il giorno seguente, dopo tre lavaggi in PBST di 10 min a temperatura ambiente, le membrane sono state incubate per 1 h con un anticorpo secondario specie-specifico, diretto contro la porzione costante delle IgG della specie in cui è stato prodotto l'anticorpo primario (nel nostro caso, topo, coniglio o capra) e coniugato all'enzima perossidasi di rafano (HRP). L'anticorpo secondario è stato diluito in PBS-T con lo 0,2% di non-fat dry milk.

Dopo ulteriori lavaggi in PBST e PBS, le membrane sono state bagnate con ECL (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) e i segnali sono stati rilevati in chemiluminescenza attraverso l'uso di lastre fotografiche (GE Healthcare, Chalfont St. Giles, UK). L'analisi densitometrica delle bande d'interesse è stata effettuata utilizzando il software NIH IMAGE (ImageJ software, Bethesda, MD, USA). I risultati ottenuti sono stati normalizzati sul contenuto di β -actina o di β -tubulina presenti in ciascun campione e sono stati riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo.

SEPARAZIONE DEGLI SFINGOLIPIDI E DETERMINAZIONE DEL CONTENUTO DI S1P

Allo scopo di marcare gli sfingolipidi sintetizzati dalle cellule, le cellule mesenchimali stromali (BM-MSCs) sono state mantenute in coltura in piastre multi-well da sei pozzetti con terreno fresco, alla densità richiesta per gli esperimenti. All' 80% di confluenza, le cellule sono state marcate con $^3\text{[H]}$ Sfingosina ($^3\text{[H]}$ Sph) (0,6 mCi/ml) per 2 ore. In altri esperimenti le BM-MSCs sono state trattate con $^3\text{[H]}$ serina (10 mCi/ml) e incubate con il terreno di differenziamento (DM) di cellule C2C12 o con il terreno di colture primarie di cellule satelliti in attiva proliferazione (PM) in assenza o in presenza dell' inibitore di SphK1. Dopo 48h, le cellule e il terreno condizionato sono stati raccolti e da questi sono stati estratti i lipidi marcati aggiungendo ai campioni 50 μl di cloroformio, 100 μl di metanolo e 2 μl di HCl. Sono stati aggiunti in seguito 100 μl di cloroformio e, infine, 100 μl di KCl. I campioni sono stati poi centrifugati, in modo da aumentare la separazione tra fase organica e fase inorganica. La fase contenente gli sfingolipidi marcati, compresi $^3\text{[H]}$ S1P o $^3\text{[H]}$ ceramide, è stata lasciata evaporare sotto corrente di azoto. Le frazioni contenenti $^3\text{[H]}$ S1P intracellulare ed extracellulare sono state sottoposte a cromatografia su strato sottile (TLC) su piastre di gel di silice (Merck, Darmstadt, Germania), precedentemente attivate a 100°C per un'ora. Per ottenere la separazione degli sfingolipidi, la lastra di silice è stata immersa in una soluzione contenente n-butanolo / acido acetico / acqua (3: 1: 1, v / v / v). S1P fredda è stata aggiunta alla miscela di estrazione dei lipidi ed è stata usata come standard interno. Alla fine della TLC, la lastra di silice è stata poi tagliata e la radioattività associata a ciascuna zona è stata determinata dopo aggiunta di liquido di scintillazione (Optiphase Supermix, Perkin Elmer) e lettura allo scintillatore (Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer). I picchi corrispondenti a Sph e S1P sono stati riconosciuti in base al loro Rf (fattore di ritenzione, determinato mediante l'uso di standards specifici) e quantificati.

ANALISI DELLA PROLIFERAZIONE CELLULARE

Conteggio cellulare e saggi di incorporazione di $^3\text{[H]}$ timidina e EdU (5-etinil-29-deossiuridina) sono stati utilizzati per determinare la proliferazione delle C2C12 e delle cellule satelliti.

-Conteggio cellulare: le cellule sono state incubate per 24 h nel mezzo di coltura specifico (DM per i mioblasti C2C12 e PM per le cellule satelliti) o esposte al terreno condizionato delle MSCs (C2C12: MSC-DM e MSC-DMiSK; cellule satelliti: MSC-PM e MSC-PMiSK). Dopo 24 h, le cellule sono state tripsinizzate e contate in una camera di Burker da due diversi operatori in seguito all'incubazione con Trypan Blue (0,2%, Sigma).

-Incorporazione di $^3\text{[H]}$ timidina: allo scopo di marcare il DNA sintetizzato dalle cellule, i campioni di C2C12 e di cellule satelliti sono stati incubati per almeno 2 ore con metil $^3\text{[H]}$ timidina (1-2 mCi/ml) (Perkin Elmer, Monza, Italia) e poi trattate con acido tricloroacetico (TCA). Le cellule sono state successivamente raccolte e incubate per 30 min in TAE 5% a 4°C per consentire il fissaggio degli acidi nucleici. Il TCA è stato poi rimosso e le cellule sono state lavate con etanolo 70% e lasciate asciugare. Sono stati infine aggiunti 100µl di Na-OH e le cellule sono state lasciate 1 h a 37°C per consentirne la lisi. 10µl del lisato cellulare sono stati messi in un vial assieme a 2 ml di liquido di scintillazione (Optiphase Supermix, Perkin Elmer) e la radioattività emessa (dpm/min) è stata misurata tramite scintillatore (Tri-Carb 2800TR, Perkin Elmer).

-Incorporazione di EdU (5-etinil-29-deossiuridina): il saggio di incorporazione di EdU è stato eseguito utilizzando il kit Click-iT EdU Cell Proliferation Assay (Life Technologies, Grand Island, NY, USA) seguendo le istruzioni fornite da protocollo. Brevemente, le cellule cresciute su vetrini sono state incubate con EdU 10 mM per 24 h. Dopo di che, le cellule sono state lavate con PBS, fissate con paraformaldeide 0,5% (PFA) per 10 min a temperatura ambiente, permeabilizzate con acetone freddo per 3 min e poi incubate con la soluzione

di emissione Alexa Fluor 488 EdU per 30 min, protette dalla luce. Dopo un lavaggio, i vetrini contenenti le cellule marcate sono state montati (Biomeda Gel, Scienze di microscopia elettronica, Foster City, CA) e osservati ad un microscopio confocale SP5 Leica TCS (Leica Microsystems, Mannheim, Germania) dotato di una sorgente laser HeNe/Ar. Il numero delle cellule con nuclei EdU positivi in ciascun preparato cellulare è stato valutato su 10 campi microscopici casuali ($200 \times 200 \mu\text{m}^2$ con ingrandimento 63X) ed è stato espresso come percentuale sul numero totale di cellule valutate mediante marcatura nucleare con ioduro di propidio (PI).

IMMUNOFLUORESCENZA CONFOCALE

Sia i mioblasti C2C12 che le cellule satelliti, coltivate su vetrini, sono stati fissati con 0,5% PFA per 10 min a temperatura ambiente. Dopo l'aggiunta di acetone freddo per 3 min, le cellule fissate sono state poste per 20 min in una soluzione di "blocking" costituita da PBS con 0,5% di albumina di siero bovino (BSA; Sigma) e con il 3% di glicerolo e poi incubate overnight a 4°C con un anticorpo policlonale di coniglio anti-Ki67 (1:100; Santa Cruz Biotechnology). Le cellule satelliti fissate sono state incubate durante la notte a 4°C con un anticorpo monoclonale di topo anti-Pax7 (1: 100; Santa Cruz Biotechnology) e con un anticorpo policlonale di capra anti-vimentina (1:40; Sigma); mentre i mioblasti C2C12 sono stati incubati con un anticorpo monoclonale di topo anti-miogenina (1: 100; Santa Cruz Biotechnology). L'immunofluorescenza è stata rivelata mediante incubazione per 1 h a temperatura ambiente con anticorpi secondari specie-specifici, diretti contro la porzione costante delle IgG della specie in cui sono stati prodotti gli anticorpi primari (in questo caso anti-coniglio o anti-capra Alexa Fluor488 o anti-topo Alexa Fluor568, diluiti 1: 200; Molecular Probes, Eugene, OR, USA). In alcuni esperimenti, le cellule sono state incubate con ioduro di propidio (PI 1:30; Molecular Probes) per rilevare i nuclei. I controlli negativi sono stati ottenuti sostituendo l'anticorpo primario con siero non immune; la cross-reattività degli anticorpi secondari è stata testata in esperimenti di controllo in cui sono stati omessi gli anticorpi primari. Dopo un lavaggio, i vetrini contenenti le cellule immuno-marcate sono stati montati e osservati ad un microscopio confocale Leica TCS SP5 (Leica Microsystems). Le osservazioni sono state effettuate utilizzando un obiettivo ad immersione Leica Plan Apo 63X/1.43NA. Le immagini sono state poi proiettate su una singola immagine di "messa a fuoco estesa". Il numero delle cellule con nuclei positivi per Ki67 è stato valutato su 10 campi microscopici casuali (200X200 μm^2 con ingrandimento 63X) in ogni preparato cellulare ed è stato espresso come percentuale sul totale di cellule.

ANALISI STATISTICA

I dati inseriti nei grafici sono stati calcolati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati riportati come variazione sul controllo, settato a 1. L'analisi statistica è stata effettuata usando il test t di Student fra due gruppi e il test d'analisi della varianza a una via (ANOVA) seguito dal test post-hoc di Bonferroni per gruppi superiori a due. Gli asterischi indicano la significatività statistica: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; \$ $p < 0.05$, \$\$ $p < 0.01$ e § $p < 0.05$.

SCOPO DELLA RICERCA

L'atrofia muscolare scheletrica, caratterizzata dalla diminuzione della massa e della funzione muscolare (Aguera et al.,2016; Cruz-Jentoft et al.,2010;Vandervoort et al.,2002) insorge come conseguenza fisiologica (invecchiamento, stile di vita sedentario) (Murton et al., 2008; Powers et al., 2016; Stephens et al., 2010) o come conseguenza di patologie (insufficienza cardiaca cronica, HIV, sepsi, tumore) (Bacurau et al., 2016; Cohen et al.,2015; Pinto et al.,2016;Thomas et al.,2007).

Prescindendo dall'evento scatenante, che implica sempre una multifattorialità, l'atrofia muscolare è caratterizzata, dal punto di vista biochimico e molecolare, dalla drastica riduzione del contenuto proteico per diminuzione della velocità di sintesi e dall'aumento della degradazione proteica regolata da specifici geni definiti “*atrogeni*” (Baumann et al., 2016; Bilodeau et al.,2016; Dedkov et al.,2003; Rudrappa et al.,2016). Tra questi, due *atrogeni* codificano per Muscle Ring Finger1 (MuRF1) e Atrogin-1/MAFbx, ubiquitine ligasi (Ub-ligasi) presenti specificatamente nel muscolo scheletrico, la cui espressione risulta aumentata in vari modelli di atrofia muscolare (Bodine et al.,2014; Gomes et al., 2001; Yuan et al.,2015).

Scopo della presente tesi è stato quello di valutare se alterazioni del metabolismo degli sfingolipidi (SLs), importanti regolatori della funzionalità e vitalità delle fibre muscolari (Coward L.A., 2010; Strackowski M. et al., 2007) fossero coinvolte nella comparsa di un fenotipo atrofico. Di questi, in particolare, sfingosina 1-fosfato (S1P) svolge un'azione protettiva in fibre muscolari isolate danneggiate [per es. da denervazione (Ieronimakis et al., 2013; Zanin et al., 2008) o da contrazione eccentrica (Sassoli et al., 2011)] e nell'attivazione delle cellule staminali residenti nel muscolo (cellule satelliti) in seguito a danno (Danieli-Betto et al.,2010; Fortier et al., 2013; Germinario et al.,2012; Nagata et al.,2006; Sassoli et al., 2014).

Al momento non sono disponibili in letteratura dati riguardanti il ruolo funzionale degli assi SphK1/S1P e CerK/ceramide 1-fosfato (C1P) nel mantenimento del fenotipo di cellule muscolari differenziate.

Lo studio è stato condotto su un modello animale *in vivo* rappresentato da topi BalB/C a cui è stata indotta cachessia mediante inoculazione sottocutanea di un frammento del tumore solido carcinoma C26 (Gorselink et al., 2006) e, per caratterizzare gli aspetti più molecolari, in un modello cellulare *in vitro* rappresentato da cellule muscolari scheletriche differenziate della linea murina C2C12, sottoposte al trattamento con desametasone (Dexa), un glucocorticoide in grado di indurre il passaggio ad un fenotipo atrofico (Nakashima et al., 2016).

In prima fase, sono stati correlati i livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 con quelli di SphK1 e CerK. Successivamente, dato il ruolo di S1P in qualità di ligando extracellulare di specifici recettori (S1PR), i livelli di Atrogin-1/MAFbx sono stati correlati con i livelli di espressione dei sottotipi S1PR espressi nella fibra muscolare, essenzialmente S1P1, S1P2 e S1P3 (Ebenezer et al., 2016; Meacci et al., 2003; Pulkoski-Gross et al., 2015; Rosen et al., 2009).

Con lo scopo di identificare possibili bersagli farmacologici, grazie all'uso di agonisti ed antagonisti specifici dei vari sottotipi recettoriali, la comparsa del fenotipo atrofico è stata correlata alla funzionalità delle vie a valle dei vari S1PR.

Infine, tra le varie strategie descritte per contrastare l'instaurarsi di un fenotipo atrofico, la terapia cellulare con cellule mesenchimali stromali derivate da midollo osseo (BM-MSCs) appare promettente (Costamagna et al., 2015; de la Garza-Rodea et al., 2011; Natsu et al., 2004; von Roth et al., 2012). Pertanto, è stata valutata la capacità delle BM-MSCs di secernere S1P insieme ad altri fattori noti in grado di promuovere meccanismi endogeni di riparazione tissutale

in seguito a danno (Rose et al.,2008; Salem et al., 2010; Sassoli et al., 2012; Uccelli et al.,2008) e di contrastare la comparsa di atrofia muscolare.

A sua volta le potenzialità degli SLs in qualità di bersagli/effettori per contrastare il danno cellulare sono state valutate in cardiomiociti neonatali ed in cardiomioblasti H9C2.

Infine, data l'importanza di molti fattori contenuti naturalmente negli alimenti, la presenza di tocoferoli e polifenoli in estratti di *Castanea sativa* è stata testata per valutare la capacità di contrastare la perdita di massa muscolare.

I dati presentati in questa tesi di dottorato, oggetto di tre pubblicazioni e di altri due manoscritti in preparazione, mettono in evidenza il ruolo degli assi SphK1/S1P e CerK/C1P come circuiti molecolari di regolazione del fenotipo della cellula muscolare scheletrica differenziata e delle potenziali vie di regolazione del microambiente cellulare con un particolare sguardo all'interazione funzionale tra cellule muscolari scheletriche e cellule mesenchimali staminali. I dati sul coinvolgimento delle vie a valle dei vari sottotipi recettoriali di S1P aprono inoltre buone prospettive per lo sviluppo di approcci terapeutici orientati a limitare la comparsa di un fenotipo atrofico.

RISULTATI

MODELLO SPERIMENTALE DI CACHESSIA *IN VIVO*: TOPI BALB/C CACHETTICI PER L'INOCULAZIONE SOTTOCUTANEA DEL TUMORE SOLIDO CARCINOMA C26

✓ *Livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 nel muscolo EDL di topi cachettici portatori di carcinoma del colon C26*

La ricerca nel campo dell'atrofia muscolare scheletrica, si è incentrata negli ultimi anni sui meccanismi molecolari responsabili del mantenimento del giusto equilibrio tra sintesi e degradazione proteica, al fine di preservare inalterata l'omeostasi tissutale e di individuare i potenziali bersagli per il trattamento della perdita della massa muscolare nella cachessia e in alcuni disordini neuromuscolari.

Inizialmente, abbiamo confermato che l'espressione dei due noti marcatori proteici di atrofia, le Ub-ligasi Atrogin-1/MAFbx e MuRF1, fosse alterata in biopsie di muscolo EDL (*Extensor Digitorum Longus*) (gentilmente concesse dalla Prof.ssa P. Costelli, Università degli Studi di Torino) provenienti da topi BalB/C a cui è stata indotta cachessia mediante inoculazione sottocutanea di un frammento del tumore solido carcinoma C26 (Gorselink M. et al., 2006).

Come si può osservare in **Tabella 1**, nei topi cachettici (C26) rispetto a quelli di controllo si ha una significativa riduzione del peso corporeo e dell'assunzione di cibo unite a una diminuzione della massa muscolare pari al 30% (Penna et al., 2010).

	Controlli (g)	C26 (g)
Peso corporeo	23 ± 0,5	17 ± 0,2**
Assunzione di cibo	40,4 ± 2,1	28,6 ± 2,9 ***
Perdita di massa muscolare		-30 %

Tabella 1. Perdita di peso corporeo e massa muscolare e diminuzione nell'assunzione di cibo in topi BalB/C portatori di carcinoma C26 (sacrificati a 12 giorni dall'impianto del tumore) rispetto a topi wt (controlli). (test t di Student: ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$) (da Penna et al., 2010).

A questi peculiari aspetti morfologici corrispondono livelli di espressione diversi delle due Ub-ligasi Atrogin-1/MAFbx e MuRF1. Nel Western Blotting riportato in **Figura 11 A-B**, infatti, i livelli di Atrogin-1/MAFbx risultano significativamente aumentati di circa tre volte nei lisati corrispondenti al muscolo EDL di $n=8$ topi cachettici portatori di C26 (C26) rispetto a quelli dei topi di controllo ($n=7$). E' da notare che la variabilità interna ai due gruppi di animali (controlli e portatori di C26) risulta maggiore nel gruppo dei controlli piuttosto che nel gruppo degli animali cachettici. Questa osservazione suggerisce che nei controlli Atrogin-1/MAFbx possa essere marcatore di uno stato di degenerazione tissutale legato a condizioni individuali specifiche, mentre nei muscoli dei topi cachettici la ridotta variabilità dei dati indica una tendenza significativa all'acquisizione di un determinato e specifico fenotipo.

Tale risultato è stato confermato, dopo aver estratto da ciascun campione l'RNA totale, averlo retrotrascritto a cDNA e averlo amplificato mediante real time PCR. L'analisi è stata condotta utilizzando una coppia specifica di primers. Le variazioni nei livelli di espressione del marcatore di atrofia sono state valutate tramite calcolo del fold col metodo del $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tenendo conto che i dati

relativi all'mRNA dei controlli rappresentano il riferimento e sono stati posti uguali a 1.

Come si evince dal grafico riportato in **Figura 11 C**, i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx aumentano drasticamente e in maniera statisticamente significativa nei topi cachettici portatori di C26 (C26) rispetto al gruppo dei controlli. Tali valori sono stati ottenuti confrontando in media almeno n=5 topi cachettici rispetto ai loro controlli sani. Pertanto alla perdita di peso corporeo si accompagna nella cachessia l'aumento di espressione di questa Ub-ligasi tessuto specifica (Malavaki et al.,2015).

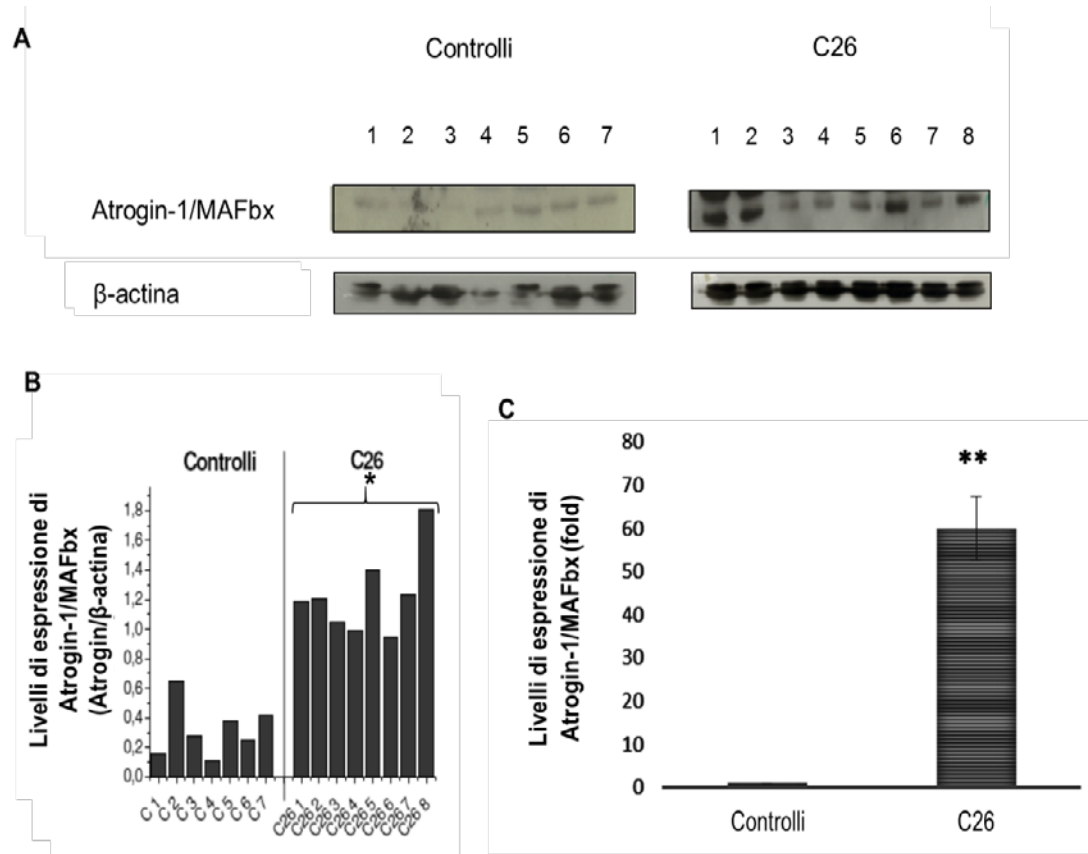


Figura 11. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli), usando un anticorpo specifico anti-Atrogin-1/MAFbx. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda dei controlli settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei soggetti C26 è statisticamente significativo (test t di Student $*p < 0.05$ vs Controlli) **(C)** Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA proveniente dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore dei controlli settato a 1. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei soggetti C26 è statisticamente significativo (test t di Student $**P < 0.01$ vs controlli).

Nelle stesse condizioni, il livello proteico di MuRF1, Ub-ligasi prevalentemente coinvolta nella regolazione della sintesi proteica (Perry et al.,2016), risulta significativamente minore (circa il 50%) nei muscoli EDL di topi portatori di C26 (C26) rispetto ai controlli (**Figura 12 A-B**).

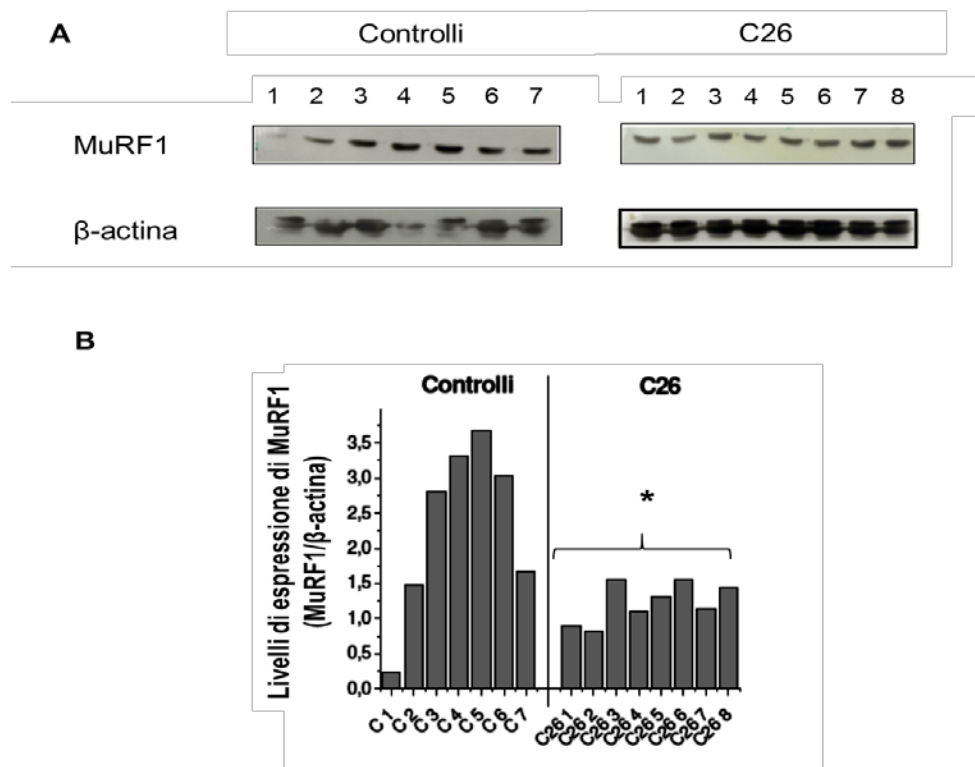


Figura 12. Variazione dei livelli di espressione di MuRF1 in biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 µg) ottenuti da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli), usando un anticorpo specifico anti-MuRF1. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β-actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda dei controlli ed espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di MuRF1 nei soggetti C26 è statisticamente significativa (test t di Student *P < 0.05 vs Controlli).

MODELLO SPERIMENTALE DI ATROFIA MUSCOLARE *IN VITRO*: CELLULE MUSCOLARI SCHELETRICHE MURINE C2C12 IN COLTURA

✓ *Livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 in miotubi C2C12 con fenotipo atrofico*

Per poter analizzare più approfonditamente i possibili meccanismi molecolari alla base dell'atrofia muscolare scheletrica, è stato necessario passare da un modello animale *in vivo* di cachessia neoplastica a un modello sperimentale *in vitro* che mimasse la riduzione di massa cellulare rappresentato da colture di cellule muscolari (mioblasti) della linea murina C2C12 indotte al differenziamento e poi trattate con Dexa. Questa linea cellulare è la più comunemente utilizzata per lo studio della biologia del muscolo scheletrico *in vitro*. Essa infatti fornisce un eccellente modello per lo studio del differenziamento miogenico, in quanto i mioblasti sono in grado di fondersi fino a formare un sincizio multinucleato (miotubi), acquisendo caratteristiche tipiche della fibra muscolare. Questo processo è facilmente inducibile, modificando la composizione del terreno di coltura dei mioblasti C2C12 a confluenza, sostituendo loro il siero fetale bovino (FBS 10%), normalmente presente nel medium, con siero di cavallo (Horse Serum, HS 2%) avente un contenuto inferiore di mitogeni. Le cellule, pertanto, smettono di proliferare, si allineano e si fondono le une alle altre per formare miotubi maturi in circa 5-7 giorni (**Figura 13 A**).

In **Figura 13 B**, sono stati riportati i blots rappresentativi di tre marcatori cruciali del differenziamento miogenico: l'actina sarcomerica, la caveolina-3 e la forma attiva fosforilata della MAP chinasi p38 (P-p38 MAPK). I livelli di espressione di queste tre proteine aumentano infatti a 72h dall'aggiunta del 2%HS ai mioblasti C2C12 in coltura. È stato inoltre osservato, a 48h dalla somministrazione di 2%HS, un aumento a livello nucleare della miogenina,

fattore trascrizionale che trasloca nel nucleo dopo la fusione dei mioblasti ed è responsabile del differenziamento in miotubi (**Figura 13 C**).

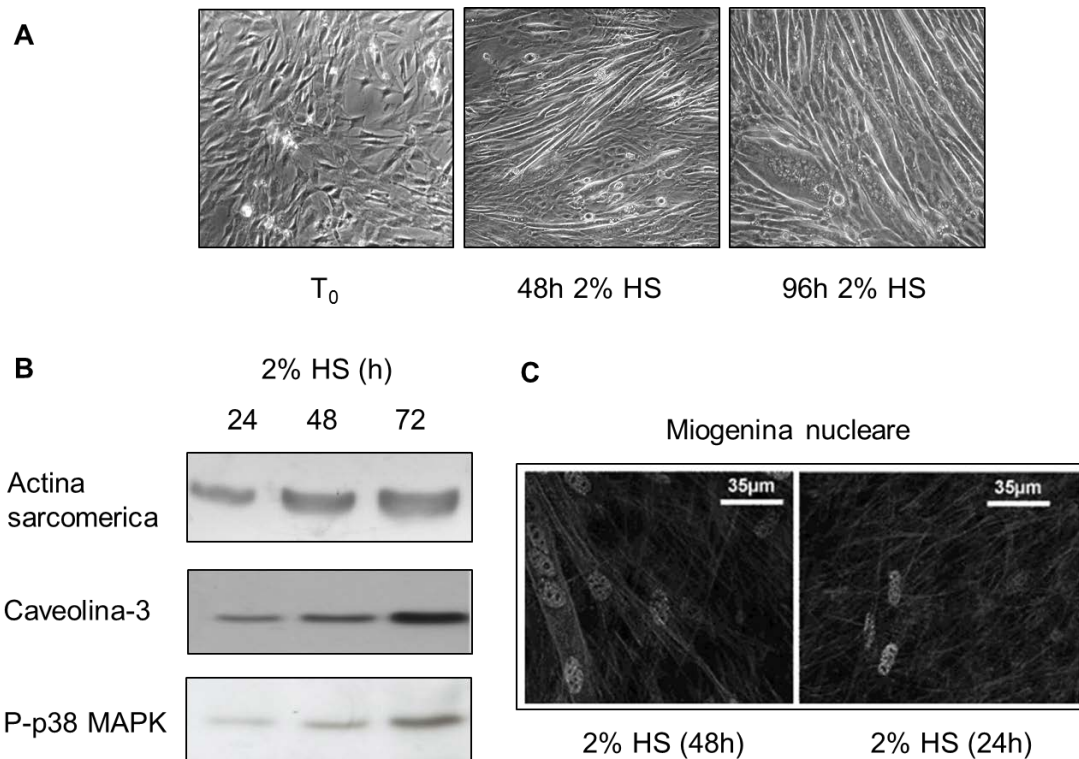


Figura 13. Variazione dei parametri morfologici e molecolari durante il differenziamento miogenico. **(A)** Aspetto morfologico di mioblasti C2C12 subconfluenti coltivati in DMEM con 10% FBS (T_0) e durante il differenziamento miogenico (48 e 96h dall'incubazione in terreno differenziante, DMEM contenente 2% di siero di cavallo HS). **(B)** Western Blotting. Livelli di espressione di tre marcatori tipici del differenziamento miogenico: Actina sarcomerica, Caveolina-3 e fosfo-p38 MAPK in mioblasti C2C12 a 24,48 e 72h dall'inizio del differenziamento. **(C)** Immagini ottenute al microscopio confocale a fluorescenza di mioblasti C2C12 a tempi diversi di differenziamento, fissati e immunocolorati con anticorpi diretti contro la miogenina nucleare.

Per riprodurre *in vitro* la condizione di atrofia, i miotubi sono stati sottoposti al trattamento con desametasone (Dexa 100 μ M), glucocorticoide in grado di indurre il passaggio ad un fenotipo atrofico, accelerando la degradazione proteica.

L'atrofia intesa come perdita di massa muscolare si manifesta in una coltura cellulare come riduzione del volume e del numero di mionuclei; per cui, inizialmente, è stato verificato se in seguito al trattamento con Dexa si riprodussero le alterazioni morfologiche sopracitate e già precedentemente riportate in letteratura (Menconi M. et al., 2008; Oelkrug et al., 2015; Stevenson E.J. et al., 2005). Come mostrato in **Figura 14 A-C**, il diametro dei miotubi, misurato mediante osservazione al microscopio a contrasto di fase di 3-4 quadranti con almeno 10-20 cellule per ciascuno, risulta minore del 30-45% dopo il trattamento con Dexa (100 μ M, per 24-48h). In maniera analoga, considerando il numero di mionuclei, i miotubi trattati con Dexa mostrano una riduzione di questo parametro di circa il 45% rispetto ai miotubi di controllo.

Basandosi su queste evidenti alterazioni morfologiche indotte in seguito alla somministrazione del Dexa, è stato determinato nelle culture in nostro possesso se venissero riprodotte le stesse variazioni nell'espressione di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1 precedentemente osservate nei topi cachettici. In **Figura 15 A-B**, in accordo con quanto riportato in letteratura (Nakashima et al., 2016), il contenuto proteico di Atrogin-1/MAFbx, analizzato in Western Blotting, aumenta significativamente di circa dieci volte nei miotubi Dexa rispetto ai controlli. Tale risultato è stato confermato anche in Real Time PCR (**Figura 15 C**), con livelli di Atrogin-1/MAFbx decisamente maggiori nei miotubi atrofici.

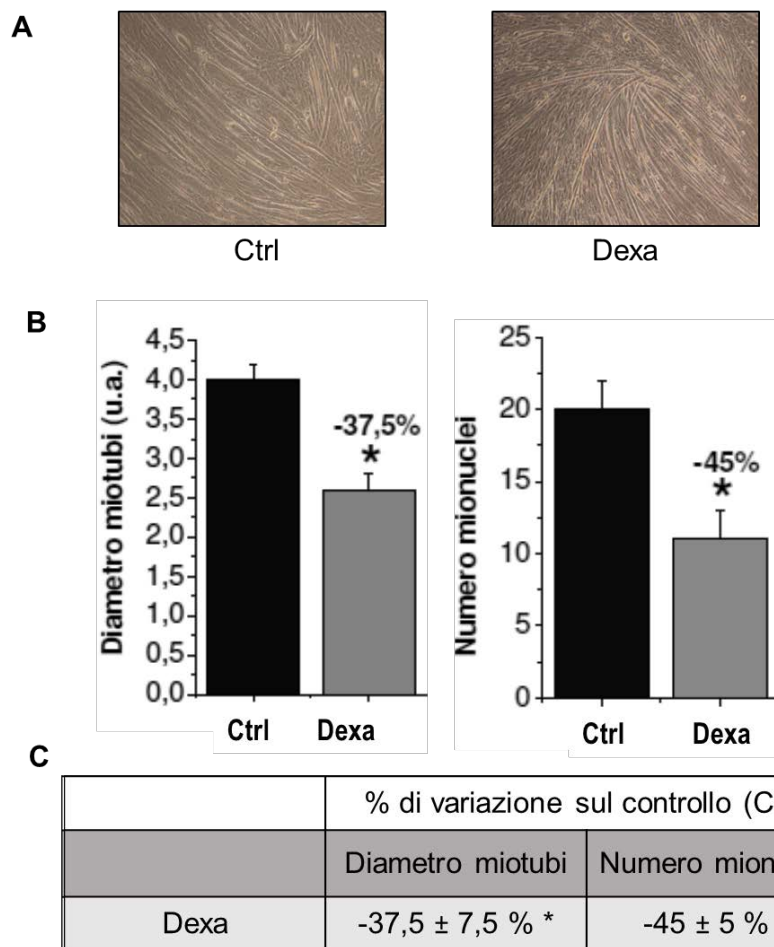


Figura 14. Analisi morfologica di miotubi C2C12 indotti all'atrofia mediante trattamento con desametasone. **(A)** Immagini rappresentative al microscopio a contrasto di fase. **(B)** Grafico a barre relativo al diametro dei miotubi e al numero dei mionuclei in cellule non trattate (Ctrl) e cellule trattate con Dexa 100 μ M (Dexa). Sono stati misurati i suddetti parametri in $n=20$ cellule presenti in 3-4 quadranti. **(C)** Le variazioni nel diametro dei miotubi e nel numero dei mionuclei sono riportate come percentuali sul controllo e sono statisticamente significative (test t di Student * $p<0.05$ vs Ctrl).

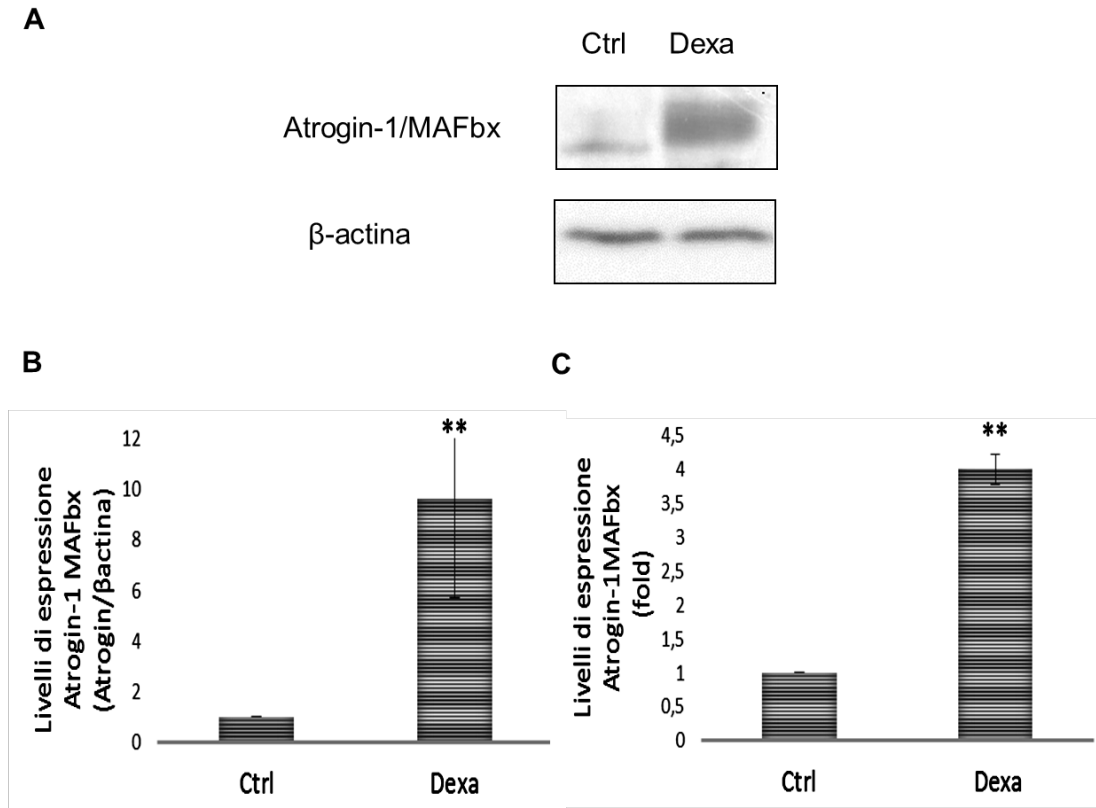


Figura 15. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12 indotti all'atrofia. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) provenienti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100 μ M usando un anticorpo specifico anti-Atrogin-1/MAFbx **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei miotubi Dexa è statisticamente significativo (test t di Student, **p < 0.01 vs Ctrl). **(C)** Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA provenienti dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore del controllo settato a 1. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei miotubi Dexa è statisticamente significativo (test t di Student **p < 0.01 vs Ctrl).

Il livello di espressione di MuRF1 analizzato in Western Blotting risulta, invece, significativamente ridotto del 50 % circa in presenza di Dexa, in accordo con quanto osservato nei topi cachettici (**Figura 16 A-B**).

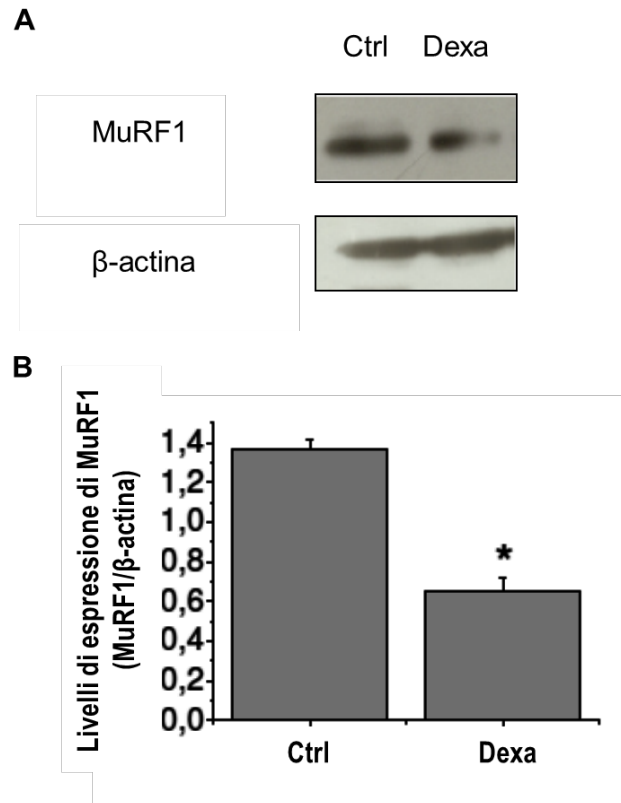


Figura 16. Variazione dei livelli di espressione di MuRF1 in miotubi C2C12 indotti all'atrofia. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 µg) provenienti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100 µM usando un anticorpo specifico anti-MuRF1. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β-actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo ed espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di MuRF1 nei miotubi dexa è statisticamente significativa (test t di Student, *p < 0.05 vs Ctrl).

I dati finora riportati indicano l'esistenza di una stretta correlazione tra il modello animale di cachessia (topi portatori di carcinoma C26), ed il modello cellulare (miotubi C2C12 trattati con Dexa): in entrambi i casi, infatti, si osserva un aumento dei livelli di Atrogin-1/MAFbx ed una diminuzione di MuRF1 in accordo con quanto mostrato in letteratura (Johns. et al.,2013).

Negli ultimi dieci anni, è stato ampiamente indagato il ruolo degli sfingolipidi (SLs) nella biologia del tessuto muscolare scheletrico: è stato attribuito, infatti, un ruolo critico all'espressione di Sfingosina chinasi-1 (SphK1), enzima responsabile della sintesi di Sfingosina 1-fosfato (S1P) a partire da Sfingosina (Sph), per il differenziamento miogenico e presumibilmente per il mantenimento del fenotipo della cellula muscolare differenziata (Meacci et al.,2008).

Al momento della stesura di questa tesi non è disponibile in letteratura nessun dato relativo al ruolo nel mantenimento del differenziamento miogenico di S1P e dell'altro importante mediatore bioattivo il Ceramide 1-fosfato (C1P) formato per attivazione di Ceramide chinasi (CerK), l'enzima responsabile della sintesi di C1P a partire da Ceramide (Cer). In primo luogo è stato quindi valutato se l'atrofia osservata nei topi cachettici e nelle cellule trattate con Dexa si accompagnasse a una variazione del metabolismo degli SLs, valutando la correlazione tra i livelli di espressione di SphK1 e CerK ed i loro prodotti bioattivi, S1P e C1P, con il contenuto cellulare di Atrogin-1/MAFbx e MuRF1.

ALTERAZIONI DEL METABOLISMO DEGLI SFINGOLIPIDI IN UN MODELLO *IN VIVO* DI CACHESSIA NEOPLASTICA ED IN UN MODELLO CELLULARE DI ATROFIA MUSCOLARE

✓ *Livelli di espressione di SphK1 nel muscolo EDL di topi cachettici portatori di carcinoma del colon C26*

I lisati ottenuti dalle biopsie muscolari EDL dei topi portatori di C26 (C26) sono stati analizzati mediante Western Blotting per determinare i livelli di espressione di SphK1 e non sono state rilevate differenze statisticamente significative nei soggetti cachettici rispetto ai controlli (**Figura 17 A-B**), suggerendo l'assenza di correlazione tra il fenotipo cachettico e l'espressione dell'enzima SphK1, l'isoforma più rappresentata nei tessuti muscolari.

In Real Time PCR, invece, i livelli di espressione dell'mRNA di SphK1 aumentano in modo statisticamente significativo nei topi portatori di C26 (Δ Act SphK1 C26=13,95 vs Δ Act Controlli=15,2) (dato non mostrato).

✓ *Livelli di espressione e ruolo dell'attività di SphK1 in miotubi C2C12 con fenotipo atrofico*

I livelli di espressione della SphK1 sono stati quantificati in miotubi C2C12 indotti all'atrofia mediante trattamento con desametasone (Dexa, 100 μ M). Come emerge dall'analisi in Western blotting (**Figura 18 A-B**), i livelli di SphK1 nei miotubi atrofici (Dexa) risultano per lo più analoghi a quelli dei controlli non trattati (Ctrl). Similmente ai tessuti, in Real Time PCR, il contenuto di mRNA di SphK1 risulta circa il doppio nelle cellule atrofiche (Δ Act SphK1 Dexa=8,5 vs Δ Act Ctrl=9,5) (dato non mostrato).

Pertanto, sembra non esistere nessuna particolare correlazione tra l'aumento di espressione di Atrogin-1/MAFbx e la SphK1 sia nel modello animale di cachessia che nel modello cellulare di atrofia muscolare.

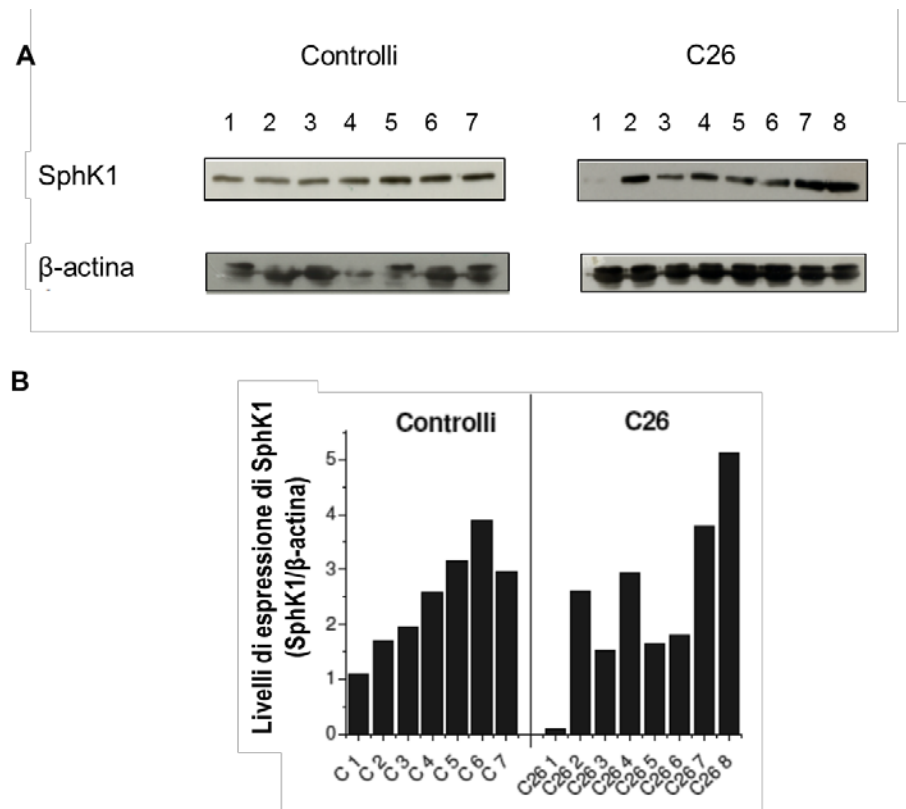


Figura 17. Variazione dei livelli di espressione di SphK1 in biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli), usando un anticorpo specifico anti-SphK1. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda dei controlli ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Le variazioni di SphK1 nei soggetti C26 non sono statisticamente significative (test t di Student, $p > 0.05$ vs controlli).

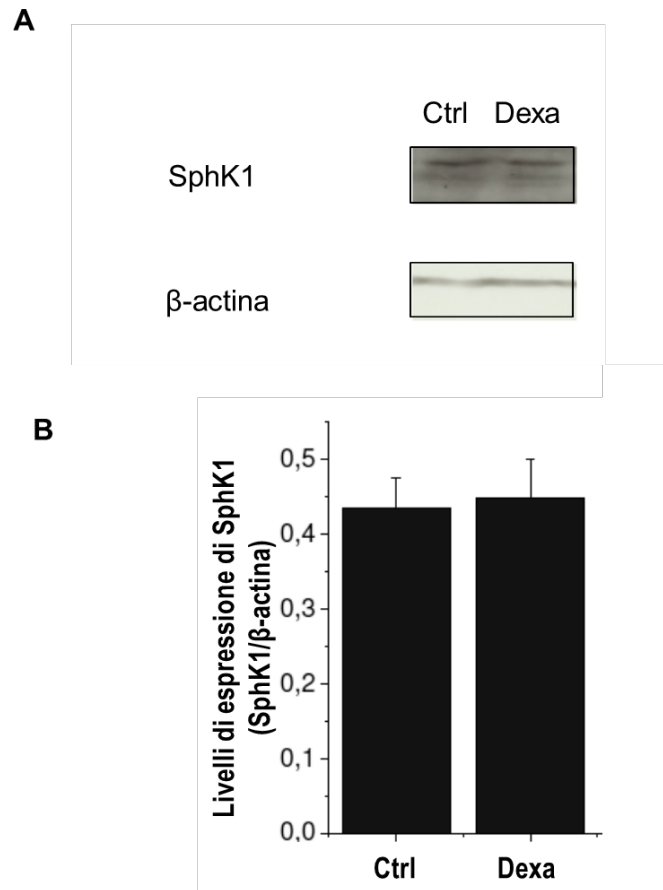


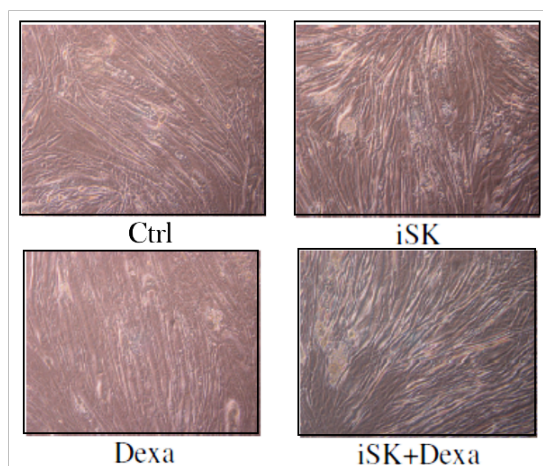
Figura 18. Variazione dei livelli di espressione di SphK1 in miotubi C2C12 indotti all'atrofia. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100 μ M usando un anticorpo specifico anti-SphK1. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Le variazioni di SphK1 nei miotubi dexa non sono statisticamente significative (test t di Student, $p > 0.05$ vs Ctrl).

Oltre all'espressione, è stato poi valutato se l'attività di SphK1 fosse importante per la comparsa di un fenotipo atrofico, trattando i miotubi C2C12 per 24h con l'inibitore specifico di SphK1: il composto II (iSK, 5 μ M) (French K.J. et al., 2003).

Le cellule così trattate sono state valutate per la comparsa di modificazioni morfologiche corrispondenti al fenotipo atrofico (diminuzione della dimensione del miotubo e del numero di mionuclei). I lisati ottenuti dalle cellule trattate nelle varie condizioni sperimentali sono stati poi analizzati in Western Blotting per il contenuto proteico di Atrogin-1/MAFbx.

Come mostrato in **Figura 19 A-B**, l'inibizione di SphK1 (iSK) in cellule muscolari differenziate non indotte all'atrofia da Dexa induce una riduzione significativa del volume cellulare (35% circa) e del numero dei mionuclei (40% circa), compatibile con un effetto trofico della S1P intracellulare nel muscolo scheletrico.

Quando il trattamento con iSK avviene 30 minuti prima dell'incubazione con Dexa (iSK+Dexa) si osserva una lieve ma significativa attenuazione dell'effetto di Dexa sulla dimensione del miotubo, ma non sul numero dei mionuclei, suggerendo un ruolo di S1P a livello dei canali ionici che regolano il volume cellulare.

A**B**

	% di variazione sul controllo (Ctrl)	
	Diametro miotubi	Numero mionuclei
Dexa	-37,5 ± 5 % *	-45 ± 5 % *
iSK	-35 ± 5 % *	-37,5 ± 5 % *
iSK + Dexa	-27,5 ± 7,5 % * \$	-40 ± 5 % *

Figura 19. Analisi morfologica di miotubi C2C12. **(A)** Immagini rappresentative al microscopio a contrasto di fase di cellule non trattate (Ctrl) e trattate con composto II in condizioni basali (iSK) e prima del trattamento con Dexa 100 μ M (iSK+Dexa). **(B)** Le variazioni nel diametro dei miotubi e nel numero dei mionuclei analizzate in n=20 cellule presenti in 3-4 quadranti al microscopio a contrasto di fase, sono riportate come percentuali sul controllo e sono statisticamente significative (test t di Student, * $p < 0,05$ vs Ctrl; \$ $p < 0,05$ vs Dexa).

Analizzando successivamente i lisati ottenuti dalle cellule nelle varie condizioni sperimentali, è stato osservato che il trattamento dei miotubi con iSK comporta un significativo aumento del contenuto intracellulare di Atrogin-1/MAFbx, suggerendo che ogni evento che potenzialmente porta alla riduzione dei livelli di S1P ha un impatto nell'induzione di un fenotipo atrofico.

Quando l'aggiunta dell'inibitore della SphK1 avviene 30 minuti prima dell'incubazione con Dexametasona (iSK+Dexa), si osserva un lieve, ma significativo, aumento dell'espressione di Atrogin-1/MAFbx sia a livello di proteina (**Figura 20 A-B**) che di mRNA ($\Delta\text{ct Atrogin-1/MAFbx iSK+Dexa}=8,05$ vs $\Delta\text{ct Dexa}=8,8$) (dato non mostrato) rispetto al trattamento con solo Dexametasona, indicando che nelle cellule atrofiche una riduzione nella sintesi di S1P potrebbe esserle almeno in parte responsabile delle alterazioni indotte dal trattamento con il glucocorticoide.

SphK1 ha normalmente una localizzazione citoplasmatica, tuttavia la sua fosforilazione su un residuo di Ser225, catalizzata dalla MAP-chinasi ERK1/2, oltre a rendere l'enzima attivo, è essenziale per la sua traslocazione a livello della membrana plasmatica (Kihara et al., 2014; Pitson, 2003., Stahelin et al., 2005) dove trova uno dei suoi substrati, la Sph. Tale localizzazione è essenziale per molti dei ruoli di segnalazione della SphK1 e per la produzione di S1P in sedi cellulari che presentano proteine come il trasportatore Spns2, il quale ne facilita il rilascio nel mezzo extracellulare.

In **Figura 21 A-B**, sono riportati i livelli di espressione della forma fosforilata di SphK1, fosfo-SphK1 (P-SphK1): dall'analisi densitometrica del blot risulta una riduzione significativa nel contenuto dell'enzima associato a membrana nei miotubi atrofici (Dexa) rispetto ai controlli non trattati, suggerendo un deficit nelle vie di segnalazione che portano alla fosforilazione/attivazione della proteina conseguente all'induzione di atrofia.

Pertanto, pur non essendoci variazione nel contenuto proteico di SphK1 sia nel modello animale di cachessia che nel modello cellulare di atrofia, l'attività

dell'enzima risulta ridotta e, quindi, in condizioni normali, la sintesi di S1P via SphK1 è importante per il mantenimento di un fenotipo cellulare differenziato.

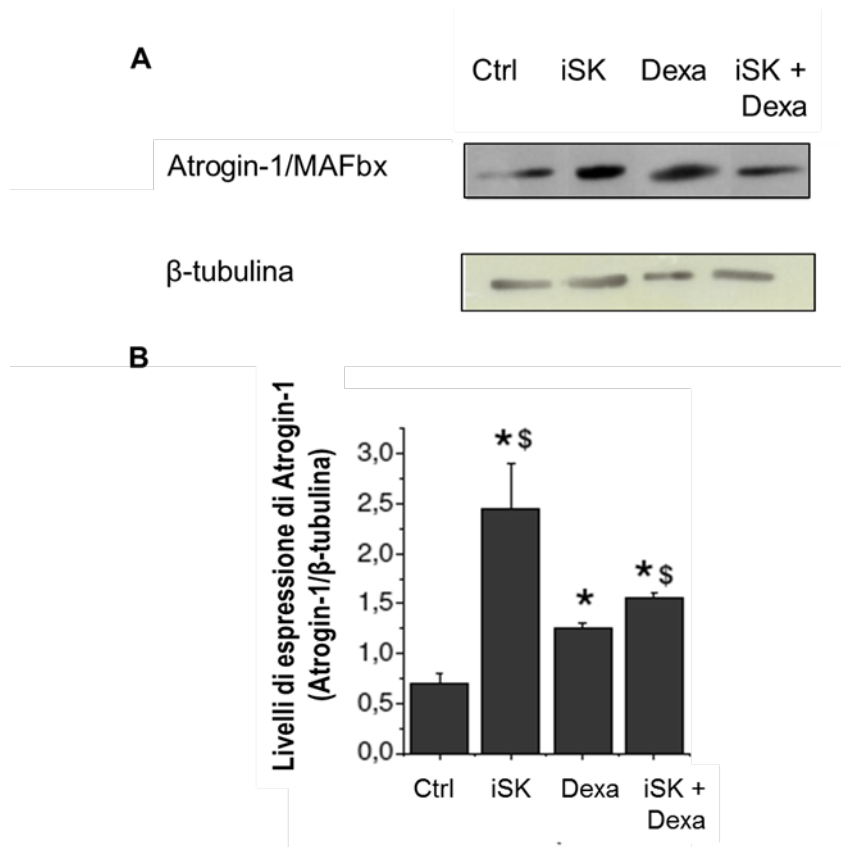


Figura 20. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12 indotti all'atrofia. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con composto II in condizioni basali (iSK) e prima del trattamento con Dexa 100 μ M (iSK+Dexa) usando un anticorpo specifico anti-Atrogin-1/MAFbx. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -tubulina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Le variazioni di Atrogin-1/MAFbx nei miotubi trattati sono statisticamente significative (test t di Student, * $p < 0,05$ vs Ctrl; \$ $p < 0,05$ vs Dexa).

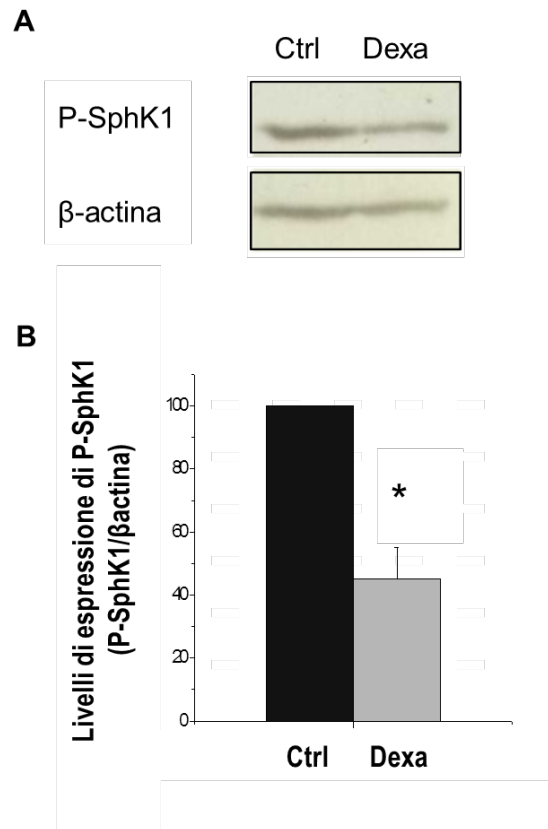


Figura 21. Variazione dei livelli di espressione di fosfo-SphK1 (P-SphK1) in miotubi C2C12 indotti all'atrofia. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su frazioni cellulari di membrana (45 μ g) ottenute da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100 μ M usando un anticorpo specifico anti-SphK1. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 100 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di P-SphK1 nei miotubi dexa è statisticamente significativa (test *t* di Student, **p* < 0.05 vs Ctrl).

✓ *Livelli di espressione di CerK nel muscolo EDL di topi cachettici portatori di carcinoma del colon C26*

Il passo successivo è stato quello di indagare il ruolo dell'altro enzima chiave nel metabolismo degli sfingolipidi, CerK. Infatti, come già accennato precedentemente, al momento della stesura di questa tesi sono assenti dati disponibili in letteratura riguardanti una potenziale correlazione tra l'asse CerK/C1P e i meccanismi molecolari alla base dell'atrofia muscolare scheletrica.

Inizialmente è stato valutato se il livello di espressione di CerK fosse influenzato dal fenotipo cachettico. Dall'analisi densitometrica del Western Blotting riportato in **Figura 22 A-B**, si nota che i livelli intracellulari di CerK sono significativamente ridotti (approssimativamente del 70%) nelle biopsie muscolari ottenute dai topi cachettici portatori di C26 (C26) rispetto ai topi di controllo. Questo dato è stato confermato anche mediante real time PCR (**Figura 22 C**), in cui si osserva una riduzione dell'espressione dell'enzima di circa il 50% nei topi cachettici.

In conclusione, l'acquisizione di un fenotipo cachettico si accompagna all'aumento di Atrogin-1/MAFbx, a riduzione dell'attività di SphK1 e a riduzione dell'espressione di CerK.

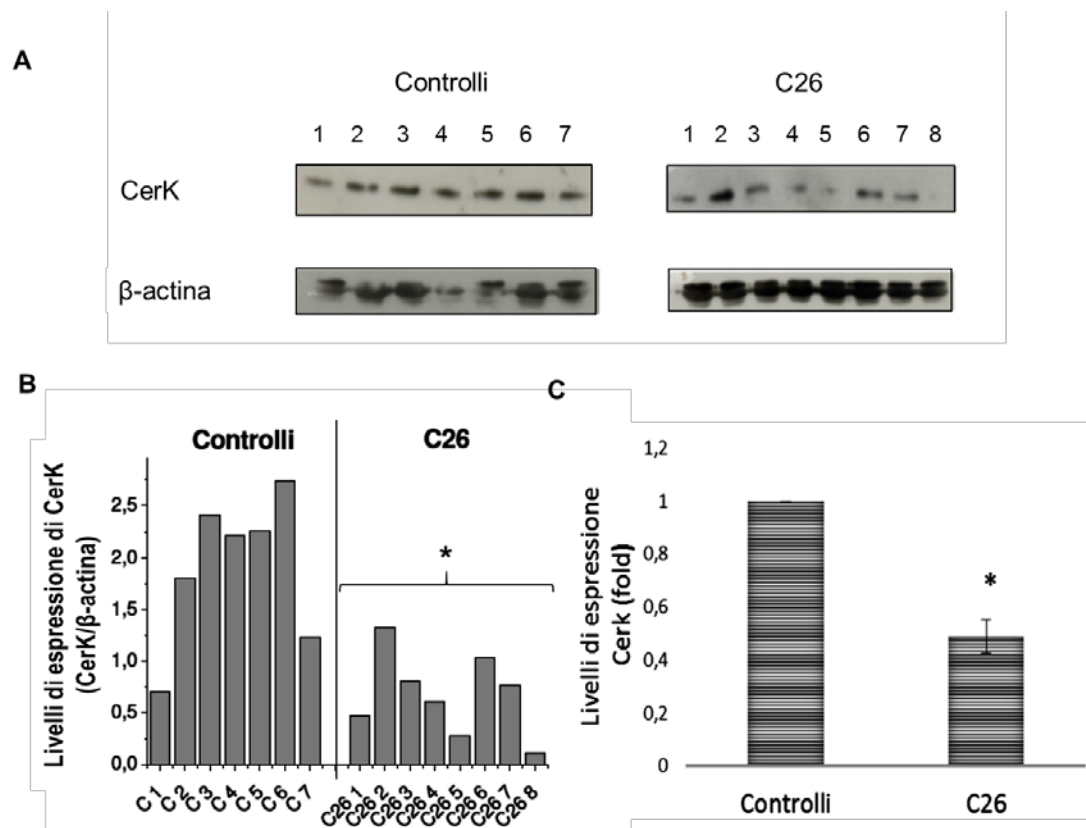


Figura 22. Variazione dei livelli di espressione di CerK in biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli), usando un anticorpo specifico anti-CerK. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda dei controlli ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di CerK nei soggetti C26 è statisticamente significativa (test t di Student, $*p < 0.05$ vs controlli). **(C)** Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA proveniente dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di CerK sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore dei controlli settato a 1. La diminuzione di CerK nei soggetti C26 è statisticamente significativa (test t di Student, $*p < 0.05$ vs controlli).

✓ *Livelli di espressione di CerK in miotubi C2C12 con fenotipo atrofico*

Per analizzare in maggior dettaglio la rilevanza della diminuzione dell'espressione di CerK nell'acquisizione del fenotipo atrofico, è stato necessario passare al modello cellulare.

I risultati ottenuti tramite Western Blotting e mostrati in **Figura 23 A-B**, relativi all'espressione di CerK durante il differenziamento miogenico confermano la potenziale importanza dell'asse CerK/C1P nel mantenimento del fenotipo differenziato. Infatti, il contenuto intracellulare di CerK risulta per lo più costante nei mioblasti C2C12 e nei miotubi completamente differenziati (96 h), senza variazioni significative dei livelli di espressione durante la miogenesi (24-48h dopo l'aggiunta del terreno di differenziamento contenente 2%HS).

Successivamente, è stato verificato il ruolo funzionale dell'enzima, analizzando i parametri morfologici in miotubi C2C12 trattati con due specifici inibitori di CerK: K1 (iCK) e NVP-231, inibitore di tipo non competitivo il primo e competitivo il secondo (Graf C. et al., 2008; Kumada H. et al., 2007).

Come illustrato in **Figura 24 A-B**, il trattamento con iCK (5 μ M per 24h) dei miotubi C2C12 si accompagna ad una diminuzione del volume (circa 20%) e del numero di mionuclei (circa 10%), mentre il trattamento con NVP-231 (100 nM per 24h) sembra avere uno scarso effetto. In entrambi i casi, comunque, le differenze non risultano significative. L'effetto di iCK è stato confermato anche in Real Time PCR, in quanto il livello di espressione di Atrogin-1 MAF/bx risulta maggiore nei miotubi trattati con K1 rispetto ai controlli (Δ ct Atrogin-1/MAFbx K1=10,5 vs Δ ct Ctrl=11,2) (dato non mostrato).

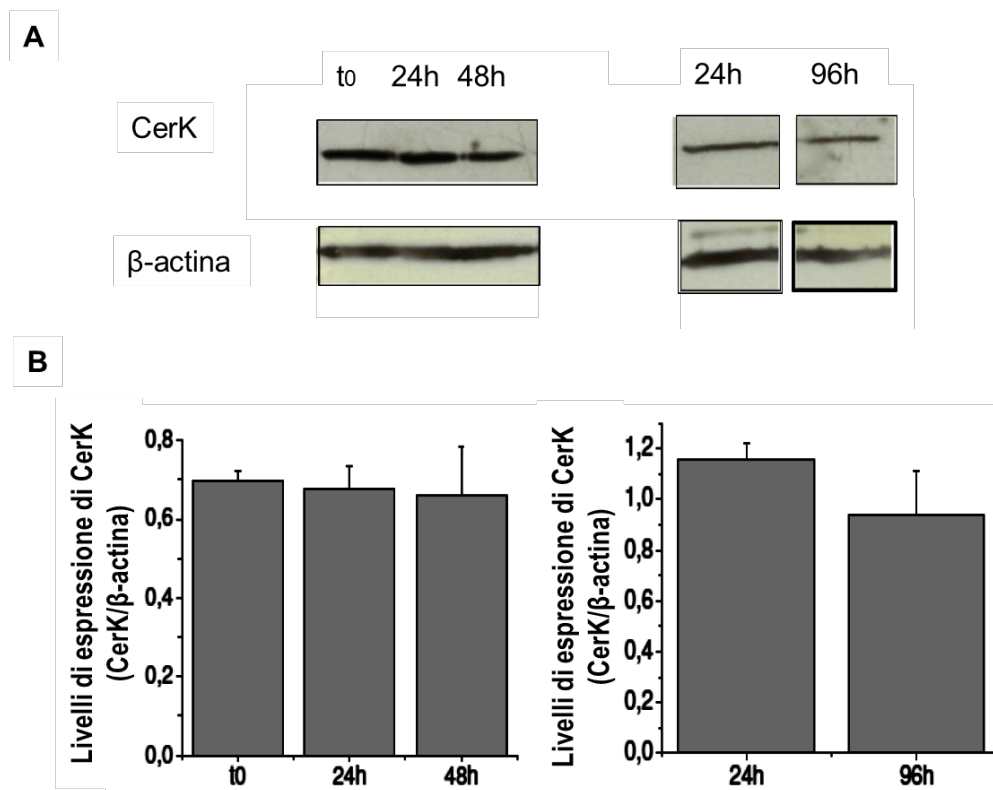
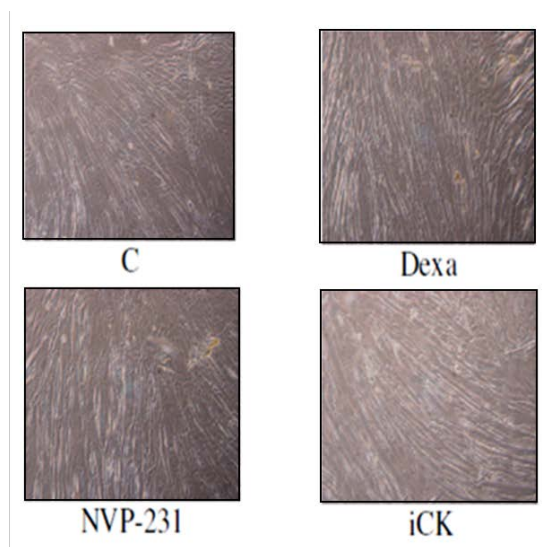


Figura 23. Variazione dei livelli di espressione dell'enzima CerK durante il differenziamento miogenico. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da mioblasti a confluenza (t0), a 24h-48h dall'inizio del differenziamento e da miotubi C2C12 completamente differenziati (96 h), usando un anticorpo specifico anti-CerK. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda dei mioblasti t0 e a 24h ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Le variazioni di CerK nelle popolazioni a confronto (mioblasti/miotubi a diverse percentuali di confluenza) non sono statisticamente significative (test t di Student, $p > 0.05$).

A**B**

	% di variazione sul controllo (C)	
	Diametro miotubi	Numero mionuclei
Dexa	-37,5 ± 7,5 % *	-45 ± 5 % *
iCK	-15 ± 5 %	-5 ± 5 %
NVP-231	+15 ± 5 %	+5 ± 5 %

Figura 24. Analisi morfologica di miotubi C2C12. **(A)** Immagini rappresentative al microscopio a contrasto di fase di cellule non trattate (Ctrl) e trattate con gli inibitori di CerK (iCK; NVP-231). **(B)** Le variazioni nel diametro dei miotubi e nel numero dei mionuclei, analizzate in n=20 cellule presenti in 3-4 quadranti al microscopio a contrasto di fase, sono riportate come percentuali sul controllo e sono statisticamente significative (test t di Student, *p<0,05 vs Ctrl).

Su queste premesse, è stata condotta un'analisi più approfondita dei livelli intracellulari di CerK mediante Western Blotting e Real Time PCR in miotubi C2C12 trattati con Dexa. In **Figura 25 A-B**, è stata osservata una diminuzione statisticamente significativa (circa il 70%) del contenuto di CerK nelle cellule indotte all'atrofia rispetto ai controlli, in accordo con quanto già precedentemente riportato *in vivo* per i tessuti cachettici C26. I dati invece della Real Time (**Figura 25 C**), non indicano differenze statisticamente significative nei livelli di espressione dell'enzima tra i miotubi dexa e i controlli non trattati, suggerendo che CerK sia regolato a livello traduzionale piuttosto che trascrizionale. Esperimenti per valutare il turn over della proteina sono in corso per chiarire i meccanismi alla base della riduzione del contenuto proteico.

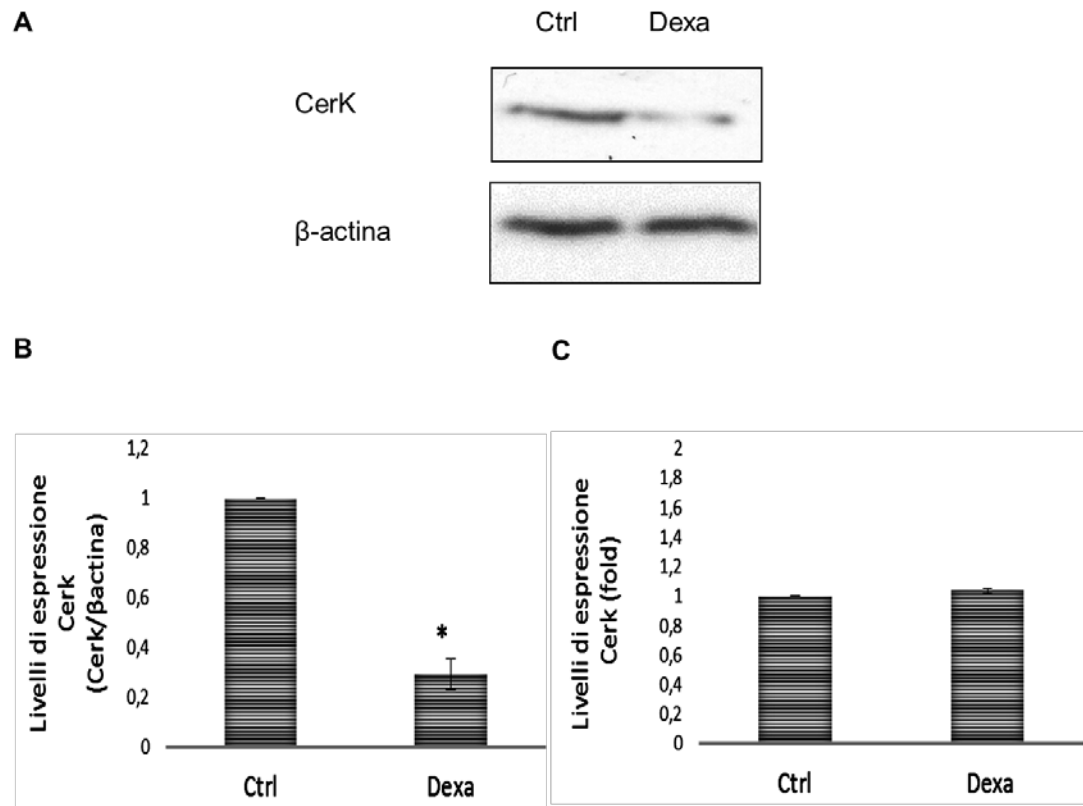


Figura 25. Variazione dei livelli di espressione di CerK in miotubi C2C12 indotti all'atrofia. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) provenienti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100 μ M usando un anticorpo specifico anti-CerK. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di CerK nei miotubi dexa è statisticamente significativa (test di Student, $*p < 0.05$ vs Ctrl). **(C)** Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA provenienti dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di CerK sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore del controllo settato a 1. Le variazioni di CerK nei miotubi Dexa non sono statisticamente significative (test t di Student, $P > 0.05$ vs Ctrl).

✓ *Effetto del silenziamento di CerK nel muscolo EDL di topi cachettici portatori di carcinoma del colon C26*

Per approfondire la correlazione tra l'induzione dell'Ub-ligasi e i livelli di CerK è stata utilizzata la tecnologia del silenziamento genico.

Esperimenti di elettroporazione sono stati condotti nel laboratorio della Prof.ssa Costelli sul muscolo tibiale di topi cachettici C26 e dei corrispettivi controlli. Sono stati utilizzati plasmidi codificanti per una corta sequenza disordinata "scrambled" di RNA a doppio filamento (SCR-shRNA) non omologa ad alcun gene e per questo utilizzata come controllo negativo e una mix di tre plasmidi codificanti per short hairpin RNA disegnati in tre regioni diverse dell'mRNA codificante per CerK (CerK-shRNA).

Porzioni di muscolo tibiale anteriore sinistro trasfettate con SCR-shRNA e porzioni di muscolo tibiale anteriore destro trasfettate con CerK-shRNA sono state utilizzate per la preparazione di lisati cellulari e/o RNA.

Inizialmente è stata valutata l'efficacia dell'elettroporazione nel silenziare l'mRNA codificante per CerK e successivamente, è stato indagato se l'eventuale diminuzione nel contenuto intracellulare della proteina fosse correlata all'induzione di atrofia nei topi Balb/C.

Dall'analisi del Western Blotting riportato in **Figura 26 A-B**, emerge che nelle fibre muscolari dei controlli in cui il gene è stato silenziato (controlli CerK-shRNA) la diminuzione del contenuto proteico di CerK risulta statisticamente significativa (circa il 70% in meno) rispetto ai campioni trasfettati con lo SCR-shRNA (controlli SCR-shRNA) a dimostrazione che lo shRNA funziona in vivo. Inoltre, nei tessuti cachettici in cui la trascrizione genica di CerK non è stata repressa (C26 SCR-shRNA) si osserva come atteso una riduzione statisticamente significativa dei livelli di espressione di questo enzima rispetto ai controlli. La diminuzione di CerK è ancora più accentuata in presenza di un tessuto danneggiato in cui all'effetto dello shRNA (C26 CerK-shRNA) si somma l'alterazione dei normali processi fisiologici conseguente all'instaurarsi di un

fenotipo cachettico. Questi risultati sono stati confermati mediante Real time PCR (**Figura 26C**). In questo caso, i livelli di espressione di CerK nei tessuti cachettici trasfettati con SCR-shRNA (C26 SCR-shRNA) sono circa la metà rispetto ai relativi controlli (controlli SCR-shRNA). Tale riduzione è ancora più marcata quando al tessuto danneggiato si aggiunge l'effetto dello shRNA (C26 CerK-shRNA): nelle fibre tibiali C26, infatti, l'espressione dell'enzima è ridotta di circa il 70%.

In **Figura 27 A-B**, è stato riportato, tramite Real Time PCR, il significativo aumento dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx nei topi cachettici portatori di C26 (C26 SCR-shRNA) rispetto ai controlli (controlli SCR-shRNA) laddove non siano state indotte alterazioni nella trascrizione genica di CerK; un ulteriore aumento dei livelli di espressione dell'Ub-ligasi si osserva nelle fibre muscolari anteriori destre dei topi cachettici C26 in cui è avvenuto il silenziamento dell'enzima (C26 CerK-shRNA).

I dati qui presentati, se analizzati nel loro complesso, confermano che ad un aumento dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx corrisponde una diminuzione dei livelli intracellulari di CerK nei topi cachettici C26 e che questo rapporto tra i contenuti è ancora più esasperato laddove la trascrizione genica della proteina sia stata downregolata tramite silenziamento genico. La riduzione dell'espressione di CerK potrebbe risultare in una diminuzione dei livelli di C1P. Per avvalorare questa ipotesi, dovranno essere condotti ulteriori esperimenti allo scopo di valutare i livelli del prodotto di sintesi C1P tramite separazione cromatografica di lipidi (TLC) in una condizione sperimentale di atrofia muscolare.

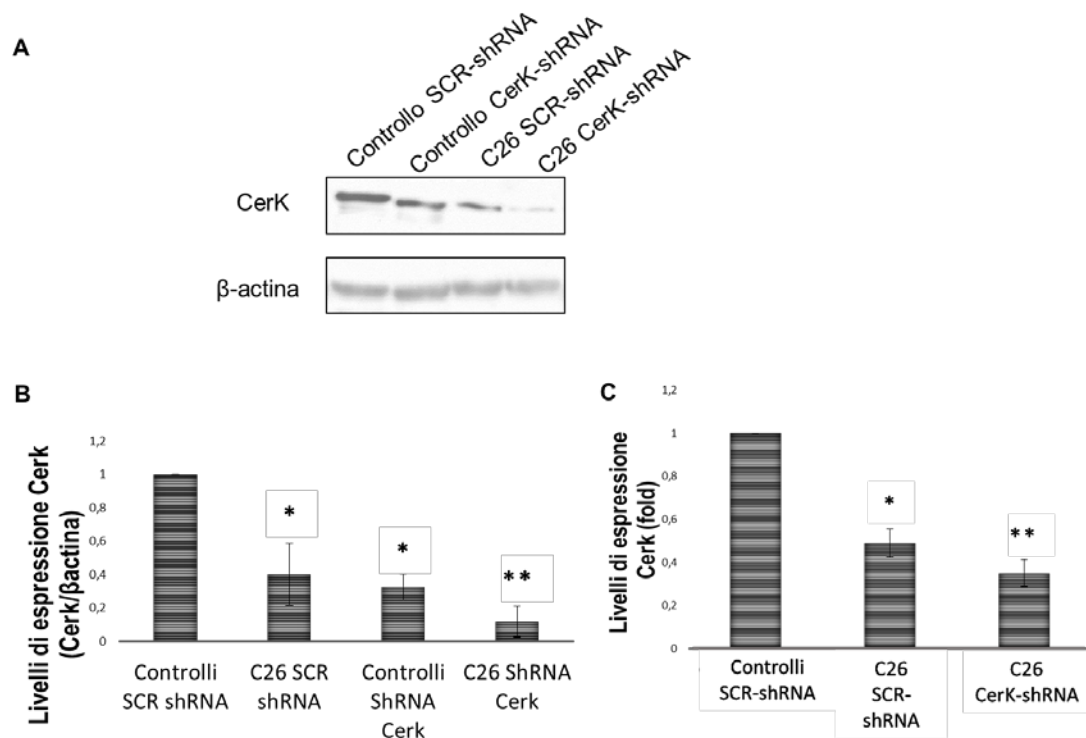


Figura 26. Variazione dei livelli di espressione di CerK in biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (30 µg) ottenuti da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli), trasfettati sia con uno scrambled shRNA (SCR-shRNA) che con una mix di tre plasmidi codificanti per shRNAs specifici per CerK (CerK-shRNA), usando un anticorpo specifico anti-CerK. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β-actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda dei Controlli SCR-shRNA settata a 1 ed espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di CerK nei Controlli-ShRNA CerK, nei soggetti C26 SCR-shRNA e nei C26 CerK-shRNA è statisticamente significativa [test ANOVA ad una via (one way ANOVA) seguito da Tukey-Kramer post hoc test, * $p < 0,05$, ** $P < 0.01$ vs Controlli SCR-shRNA]. **(C)** Real time PCR L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA proveniente dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di CerK sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore dei Controlli SCR-shRNA settato a 1. La diminuzione di CerK nei soggetti C26 SCR-shRNA e C26 CerK-shRNA è statisticamente significativa (test t di Student, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$ vs controlli SCR-shRNA).

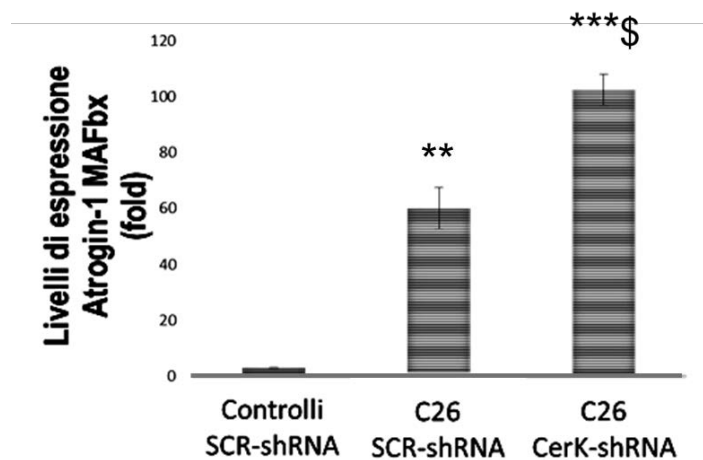


Figura 27. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26. Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli), trasfettati sia con uno scrambled shRNA (SCR-shRNA) che con una mix di tre plasmidi codificanti per shRNAs specifici per CerK (CerK-shRNA). I livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore dei Controlli SCR-shRNA settato a 1. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei soggetti C26 SCR-shRNA e C26 CerK-ShRNA è statisticamente significativo (test t di Student, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ vs controlli SCR-shRNA; \$ $P < 0.05$ vs C26 SCR-shRNA).

✓ *Effetto del silenziamento di CerK in miotubi C2C12 con fenotipo atrofico*

I dati fin'ora riportati fanno presupporre che le colture di cellule muscolari della linea murina C2C12 siano un buon modello sperimentale per riprodurre le condizioni di atrofia. Pertanto, parallelamente ai risultati ottenuti *in vivo* sul modello animale di cachessia mediante silenziamento del gene codificante per CerK, sono state riprodotte tali condizioni trasfettando i mioblasti C2C12 in coltura (SCR-shRNA e CerK-shRNA).

Mediante analisi con Western Blotting è stato osservato che la diminuzione del contenuto proteico di CerK è di circa il 30% nelle cellule trasfettate (CerK-shRNA) (**Figura 28 A-B**) con una riduzione più netta (circa l'80% in meno) osservata in real time PCR (**Figura 28 C**).

Infine, per valutare se la variazione del contenuto intracellulare di CerK indotta da silenziamento possa riprodurre gli effetti conseguenti all'induzione del fenotipo atrofico, sono stati valutati in real time PCR i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx. Nell'istogramma riportato in **Figura 29**, l'aumento dell'ubiquitina ligasi nei campioni in cui il gene codificante per CerK è stato silenziato (CerK-shRNA) è statisticamente significativo rispetto ai controlli negativi (SCR-shRNA) in accordo con quanto osservato nei topi cachettici.

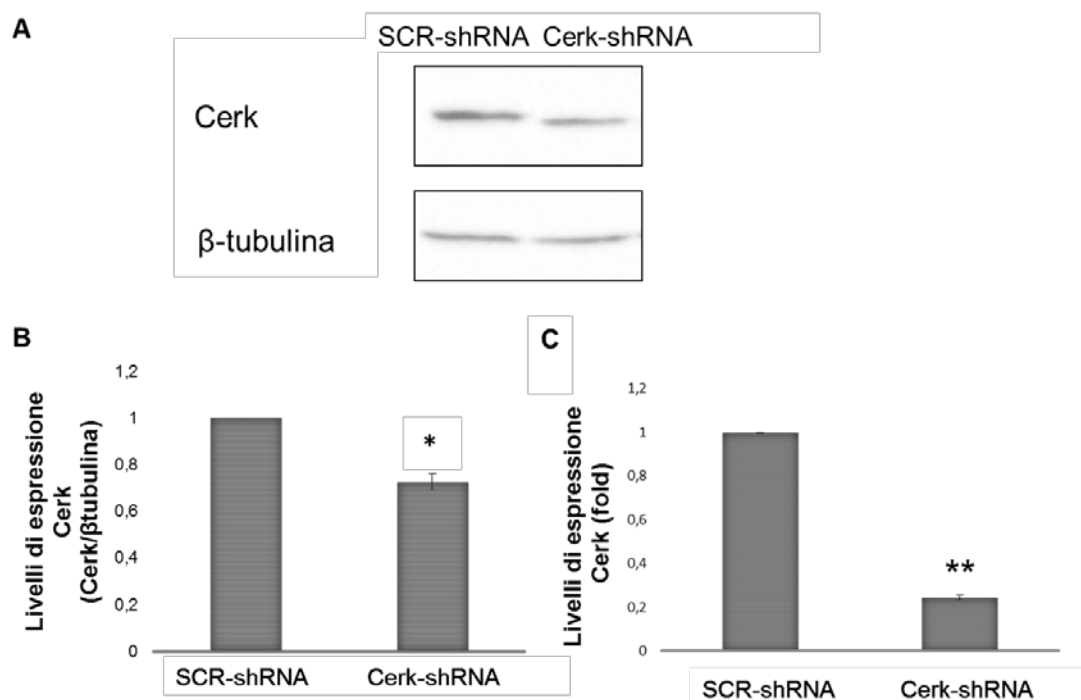


Figura 28. Variazione dei livelli di espressione di CerK in mioblasti C2C12. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da mioblasti C2C12 trasfettati con uno scrambled shRNA (SCR-shRNA) e con una mix di tre plasmidi codificanti per shRNA specifici per CerK (Cerk-shRNA) usando un anticorpo specifico anti-CerK. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo SCR-shRNA settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di CerK nei mioblasti Cerk-shRNA è statisticamente significativa (test t di Student, * $P < 0.05$ vs SCR-shRNA). **(C)** Real time PCR L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA proveniente dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di CerK sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore del controllo SCR-shRNA settato a 1. La diminuzione di CerK nei mioblasti Cerk-shRNA è statisticamente significativa (test t di Student, ** $P < 0.01$ vs SCR-shRNA).

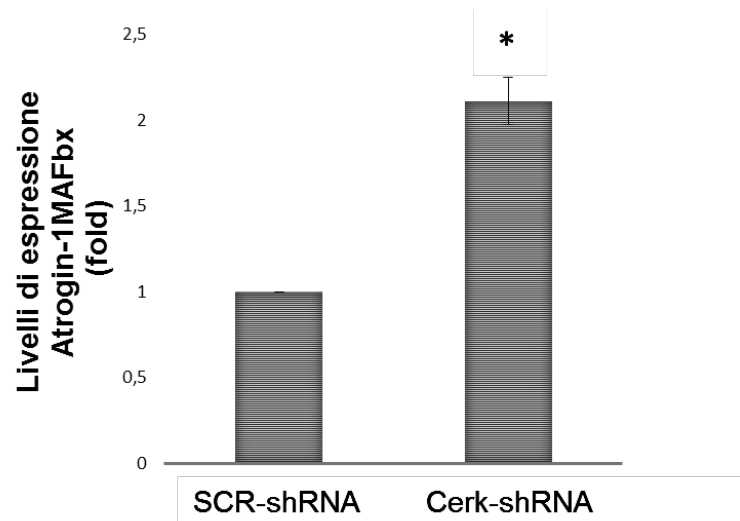


Figura 29. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in mioblasti C2C12. Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da mioblasti C2C12 trasfettati con uno scrambled shRNA (SCR-shRNA) e con una mix di tre plasmidi codificanti per shRNA specifici per CerK (Cerk-shRNA). I livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore del controllo SCR-shRNA settato a 1. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei mioblasti Cerk-shRNA è statisticamente significativo (test di Student, $*P < 0.05$ vs SCR-shRNA).

✓ *Livelli di espressione del trasportatore Spns2 specifico per S1P nel muscolo EDL di topi cachettici portatori di carcinoma del colon C26 e in miotubi C2C12 con fenotipo atrofico*

Come riportato nella parte introduttiva di questa tesi sperimentale, S1P ha una duplice funzione: può agire come secondo messaggero, modulando l'attività di specifici bersagli intracellulari (Spiegel et al., 1996), oppure può funzionare come ligando di specifici recettori localizzati sulla membrana plasmatica della stessa cellula che lo ha prodotto o su cellule vicine, con modalità autocrina o paracrina, rispettivamente (Lee et al., 1998).

L'azione di S1P come agonista di recettori specifici richiede che tale molecola venga rilasciata nell'ambiente extracellulare. È stato ormai ampiamente dimostrato che diversi tipi cellulari siano in grado di rilasciare S1P nel mezzo di coltura, come ad esempio piastrine attivate e eritrociti, ma anche astrociti cerebellari e cellule di glioma (Bassi et al., 2006; Kim et al., 2009; Nishi et al., 2014; O'Sullivan et al., 2013; Riccitelli et al., 2013). Inoltre sono stati recentemente pubblicati dal nostro gruppo di ricerca, coordinato dalla Prof.ssa Meacci, dati sperimentali che mostrano la capacità di secrezione di S1P anche da parte delle cellule mesenchimali stromali derivate da midollo osseo (BM-MSCs) (Sassoli et al., 2014).

Pertanto il passo successivo è stato quello di valutare la capacità di mioblasti e miotubi di rilasciare lo sfingolipide nel mezzo di coltura e se quest'azione fosse soggetta a variazioni durante il differenziamento miogenico ed in caso di danno indotto da Dexa.

Dopo aver marcato le cellule con $^3\text{[H]}$ Sfingosina ($^3\text{[H]}$ Sph), è stato osservato un aumento statisticamente significativo del contenuto di S1P nel terreno di coltura di miotubi differenziati (MT) rispetto a quello di mioblasti (MB) a confluenza (**Figura 30A**).

Sebbene il meccanismo di rilascio di S1P dalle cellule non sia stato ancora ben chiarito, alcune evidenze sperimentali mostrano il coinvolgimento in questo processo di trasportatori appartenenti alla famiglia ABC (Kim et al., 2009). È stata recentemente individuata una proteina transmembrana multipasso responsabile del trasporto di S1P nell'ambiente extracellulare, il trasportatore di membrana Spns2 (spinster homolog 2), i cui livelli di espressione, analizzati in Real Time PCR, risutano analoghi nei miotubi rispetto ai mioblasti (**Figura 30B**).

I dati analizzati in Real Time e riportati in **Figura 31B**, mostrano invece una diminuzione statisticamente significativa dei livelli di espressione del trasportatore nelle cellule trattate con Dexa rispetto ai controlli non trattati.

Al contrario, è stato osservato un leggero aumento, anche se non significativo, nell'espressione dell'mRNA di Spns2 nei tessuti cachettici rispetto ai controlli (**Figura 31A**).

Dati preliminari ottenuti analizzando in Western Blotting i lisati cellulari provenienti dai medesimi esperimenti, mostrano un incremento del contenuto proteico del trasportatore nei miotubi atrofici rispetto alle cellule non trattate (dato non riportato).

Il fatto che Spns2 sia overespresso a livello di proteina ma i livelli di mRNA siano diminuiti, suggerisce che nei miotubi atrofici sia alterato il turnover del trasportatore. Saranno necessari ulteriori esperimenti per identificare qualsiasi i meccanismi di regolazione coinvolti nel controllo dei livelli intracellulari di Spns2 nei tessuti cachettici.

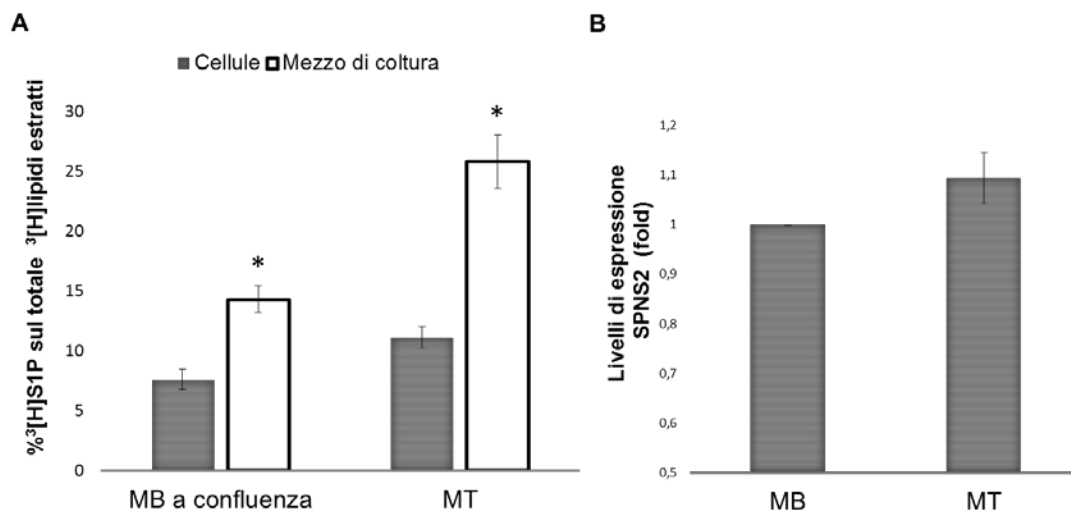


Figura 30. Trasporto e rilascio di S1P nel differenziamento miogenico. **(A)** Contenuto di ^3H Sfingosina1-fosfato (^3H S1P) in mioblasti C2C12 a confluenza (MB) e in miotubi (MT) e nei rispettivi terreni di coltura. I MB sono stati mantenuti in coltura in DMEM addizionato con il 10% di FBS, mentre i MT sono stati coltivati in DMEM addizionato al 2% di HS (terreno di differenziamento) ed entrambe le colture cellulari sono state sottoposte a pulse di ^3H Sfingosina per 2h. I lipidi marcati (S1P, Sph, Cer) sono stati estratti dalle cellule ed è stato raccolto il terreno condizionato ed entrambi sono stati analizzati mediante cromatografia su strato sottile (TLC). I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. L'aumento del contenuto di ^3H S1P nel mezzo di coltura di entrambi i tipi cellulari è statisticamente significativo (test t di Student, $*p < 0.05$ vs cellule). **(B)** Variazione dei livelli di espressione di Spns2 (Spinster homolog 2) in mioblasti C2C12 (MB) e miotubi (MT). Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di Spns2 sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore dei MB settato a 1. Le variazioni di Spns2 nei miotubi non sono statisticamente significative (test t di Student, $P > 0.05$ vs MB).

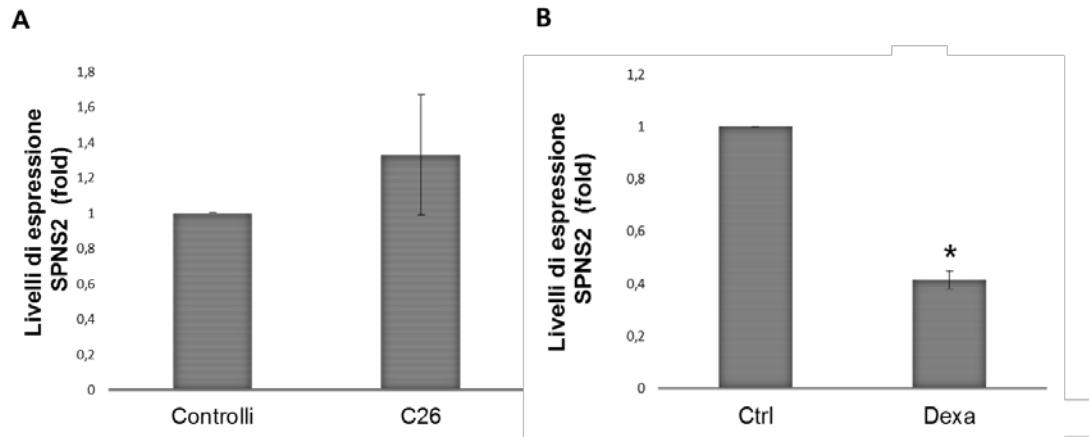


Figura 31. Variazione dei livelli di espressione di *Spns2* nei due modelli di atrofia. **(A)** Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli). I livelli d'espressione del gene target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH presente in ciascun campione. I valori sono la media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato, normalizzati sul valore dei controlli settato a 1. Le variazioni dei livelli di espressione di *Spns2* nei tessuti cachettici (C26) non sono statisticamente significative (test di Student, $P > 0.05$ vs Controlli). **(B)** Real Time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA proveniente da miotubi C2C12 non trattati (Ctrl) e trattati con Dexa 100 μ M. I livelli d'espressione del gene target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH presente in ciascun campione. I valori sono la media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato, normalizzati sul valore del controllo settato a 1. La diminuzione di *Spns2* nei miotubi Dexa è statisticamente significativa (test t di Student, $*P < 0.05$ vs Ctrl).

RUOLO FUNZIONALE DEI RECETTORI SPECIFICI PER S1P IN UN MODELLO CELLULARE DI ATROFIA MUSCOLARE

✓ *La S1P e la stimolazione dei suoi recettori specifici (S1PR) svolgono un ruolo nell'atrofia muscolare*

Per valutare il ruolo funzionale delle vie di segnalazione a valle dei sottotipi recettoriali specifici di S1P, sono stati selettivamente attivati/inibiti i sottotipi recettoriali noti essere espressi nelle cellule muscolari: S1P1, S1P2, S1P3 (Meacci et al., 2003)

Le cellule C2C12 differenziate sono state trattate con agonisti/antagonisti selettivi per S1P1, S1P2 ed S1P3 allo scopo di valutare quale sottotipo recettoriale fosse coinvolto nel mantenimento del fenotipo differenziato e quale spingesse, invece, la cellula ad acquisire un fenotipo atrofico.

Attualmente sono disponibili agonisti ed antagonisti specifici per ciascun sottotipo recettoriale:

- **S1P1:** per questo recettore sono stati utilizzati il composto SEW2871, agonista altamente selettivo che attiva il recettore e ne induce la successiva internalizzazione ed il riciclo (Blaho et al., 2014; Huwiler et al., 2008; Sammani et al., 2011; Xiao et al., 2016) ed composto W146 che agisce, invece, come antagonista specifico.
- **S1P2:** il composto sintetico JTE-013, è stato usato come antagonista competitivo del recettore S1P2, in quanto privo di effetti sugli altri recettori (Fayyaz et al., 2014; Liu et al., 2012; Osada et al., 2002).

Al momento non sono stati sintetizzati agonisti altamente selettivi per questo recettore, per cui per stimolarne l'azione, oltre all'S1P, il composto più utilizzato è il farmaco immunomodulatore FTY720 (Fingolimod) il quale ha affinità per tutti e quattro i sottotipi recettoriali (S1P1,3,4,5) tranne S1P2 (Sobel et al., 2015). Questo composto, quindi, non ha un'azione diretta su S1P2 ma è in

grado di potenziare l'azione degli altri recettori (soprattutto di S1P1), determinandone l'internalizzazione e quindi lo spegnimento dei segnali da essi mediati.

- **S1P3:** per questo sottotipo recettoriale sono stati utilizzati l'agonista selettivo CYM5541 e il composto VPC23019, che agisce come antagonista sia di S1P1 che di S1P3, ma con un'azione che risulta circa dieci volte maggiore su S1P1, essendo in grado di revertire alcuni effetti mediati dal trattamento con SEW2871 (Huwiler et al., 2008).

Per valutare il ruolo funzionale dei singoli sottotipi recettoriali nella comparsa del fenotipo atrofico, inizialmente sono state studiate le alterazioni morfologiche in miotubi C2C12 trattati con i seguenti composti:

- SEW2871 (con il quale si può attribuire una funzione al recettore S1P1);
- JTE-013+S1P (con il quale si può attribuire una funzione al recettore S1P2);
- VPC23019+S1P (con il quale si può attribuire una funzione ai recettori S1P1 e S1P3).

Come riportato in **Figura 32 A-B**, il volume cellulare si riduce significativamente di circa il 20-30% dopo l'incubazione per 24h con S1P esogena (2 μ M) o con JTE-013 (1 μ M)+S1P, mentre non si osserva alcuna variazione in presenza di SEW2871 (1 μ M) o VPC23019 (1 μ M)+S1P. Per quel che riguarda il numero di mionuclei, si ha una riduzione significativa di circa il 25% e il 35% in presenza di S1P e JTE-013+S1P, rispettivamente. Anche in questo caso SEW2871 e VPC23019+S1P non inducono variazioni rispetto al controllo.

Nel caso invece di cellule già indotte all'atrofia con Dexa, si osserva che l'incubazione con S1P, JTE-013+S1P (S1P+Dexa, JTE-013+S1P+ Dexa), contrasta leggermente la riduzione del volume cellulare, ma non del numero di mionuclei, quindi difficilmente possono essere tratte conclusioni sul ruolo che questi due recettori potrebbero avere nel revertire gli effetti indotti dal

glucocorticoide. Al contrario, il trattamento con VPC23019+S1P (VPC23019+S1P + Dexamethasone) blocca l'effetto di diminuzione nel numero dei micronuclei indotta da Dexamethasone, suggerendo un ipotetico ruolo della via di segnalazione a valle di S1P3 nel contrastare l'atrofia.

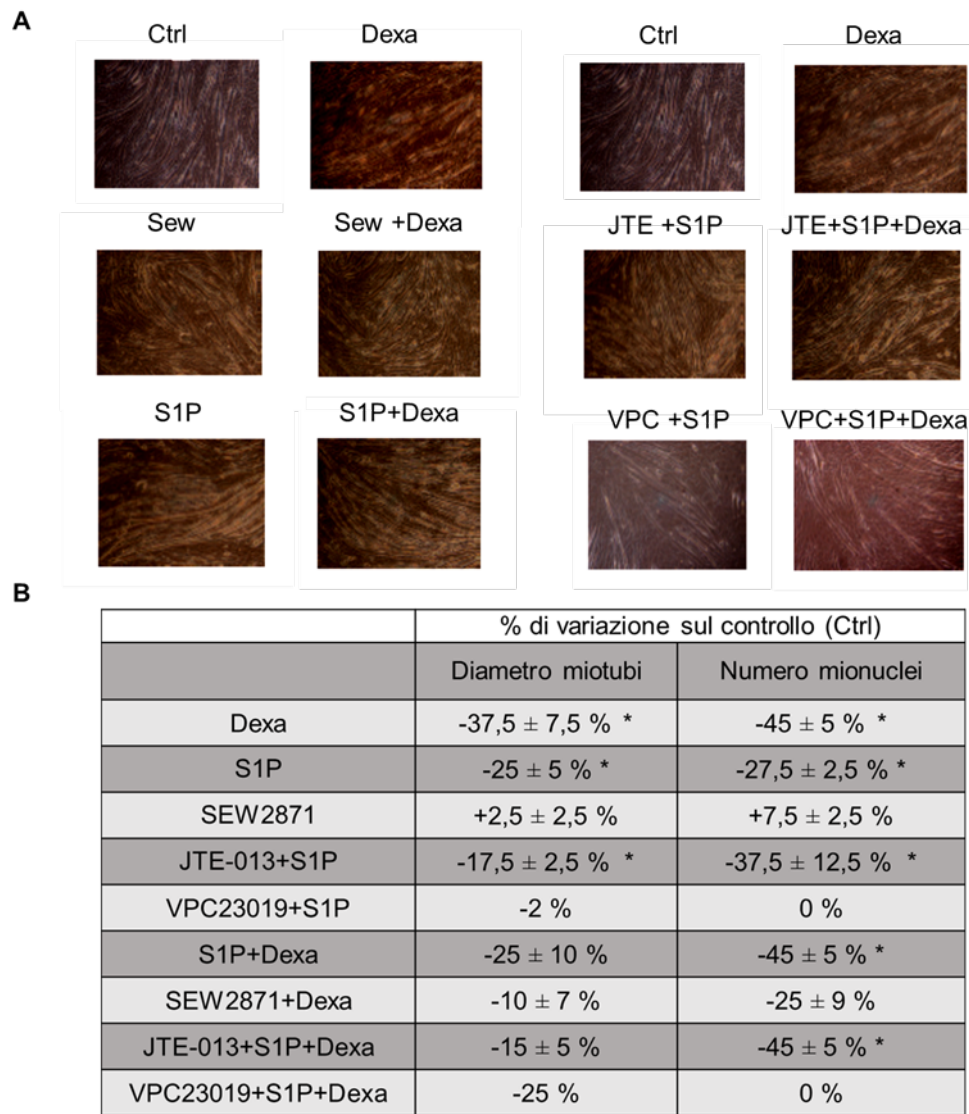


Figura 32. Analisi morfologica di miotubi C2C12. **(A)** Immagini rappresentative al microscopio a contrasto di fase di cellule non trattate (Ctrl) e trattate con agonisti/antagonisti dei tre sottotipi recettoriali S1P1, S1P2 ed S1P3 sia in condizioni basali (S1P, SEW2871, JTE-013+S1P e VPC23019+S1P) che a un'ora prima del trattamento con Dexa 100 μ M (S1P+Dexa, SEW2871+Dexa, JTE-013+S1P+Dexa; VPC23019+S1P+Dexa). **(B)** Le variazioni nel diametro dei miotubi e nel numero dei mionuclei, analizzate in $n=20$ cellule presenti in 3-4 quadranti al microscopio a contrasto di fase, sono riportate come percentuali sul controllo e sono statisticamente significative (test t di Student, * $P<0.05$ vs Ctrl).

Successivamente, è stata condotta un'analisi più approfondita per comprendere il ruolo potenziale che i tre sottotipi recettoriali rivestono nell'induzione di Atrogin-1/MAFbx, analizzando in Real Time PCR i livelli di espressione dell'mRNA dell'Ub-ligasi in miotubi trattati con gli agonisti/antagonisti specifici per ciascun recettore sia in condizioni basali che un'ora prima del trattamento con Dexa.

- *Ruolo funzionale di **S1P1***: in **Figura 33**, i miotubi sono stati trattati sia con un agonista selettivo del recettore S1P1 (SEW2871, 1 μ M) che con il suo corrispettivo antagonista (W146, 2 μ M). L'azione indotta dai due composti sui livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx è opposta: nelle cellule trattate solo con SEW2871, infatti, si osserva un aumento statisticamente significativo del marcatore di atrofia rispetto ai controlli, mentre con W146 i livelli di Atrogin-1/MAFbx si riducono di circa la metà rispetto alle cellule non trattate. In condizioni di atrofia indotta da Dexa, il trattamento con SEW2871 (SEW2871+Dexa) non induce alcuna variazione nell'espressione di Atrogin-1/MAFbx rispetto alle cellule trattate con solo il glucorticoide (Dexa), mentre con W146 (W146 + Dexa) si ha una riduzione statisticamente significativa del contenuto intracellulare dell'Ub-ligasi. Alla luce di quanto appena detto, sembrerebbe che inibendo le vie di segnalazione a valle di S1P1 si possa contrastare l'aumento della proteolisi mediata da Atrogin-1/MAFbx.

- *Ruolo funzionale di **S1P2***: i miotubi sono stati trattati con l'antagonista competitivo di S1P2, JTE-013 (1 μ M) sia in condizioni basali che un'ora prima del trattamento con il Dexa. I risultati riportati in **Figura 34**, mostrano un aumento significativo dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx nelle cellule trattate con JTE-013 rispetto ai controlli. Nelle cellule indotte all'atrofia, invece, JTE-013 non reverte né potenzia l'effetto indotto dal Dexa: non sono state riscontrate, infatti, differenze statisticamente significative tra i miotubi trattati (JTE-013+Dexa) e il trattamento Dexa da solo. Questo ci conferma quanto

osservato precedentemente nella valutazione della riduzione del diametro e del numero di mionuclei in miotubi trattati con l'antagonista.

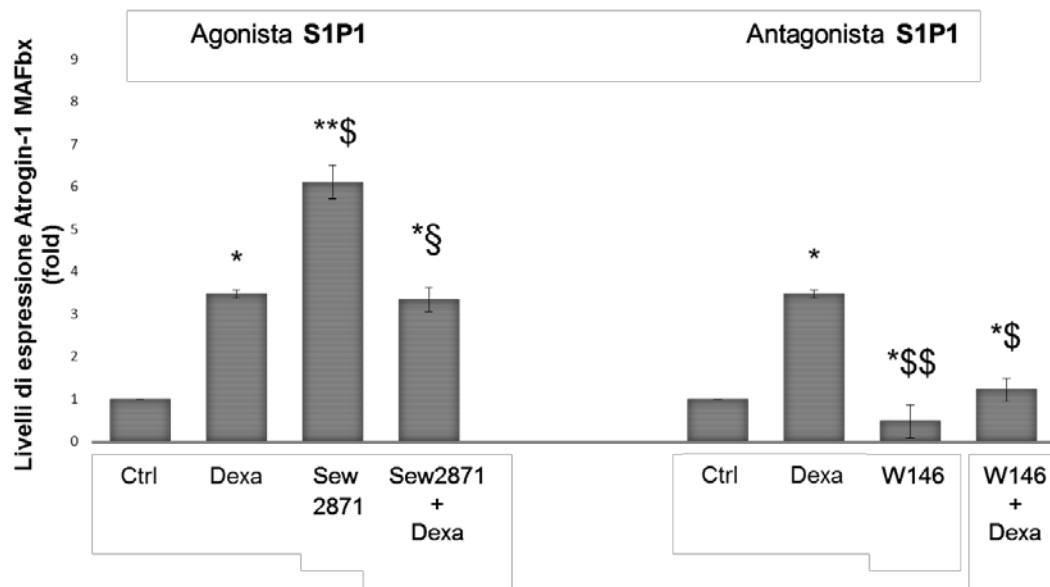


Figura 33. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12. Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con l'agonista (Sew2871, 1 μ M) e l'antagonista (W146, 2 μ M) selettivi per il sottotipo recettoriale S1P1 sia in condizioni basali (Sew2871, W146) che a un'ora prima del trattamento con Dexa 100 μ M (Sew2871+Dexa; W146+Dexa). I livelli d'espressione del gene target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH presente in ciascun campione. I valori sono la media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato, normalizzati sul valore del controllo settato a 1. Le variazioni di Atrogin-1/MAFbx sono statisticamente significative [test Anova ad una via (one way Anova) seguito da Tukey-Kramer post hoc test, * P <0.05, ** P <0.01 vs Ctrl; \$ P < 0.05 vs Sew2871; \$ P < 0.05; \$\$ P < 0.01 vs Dexa].

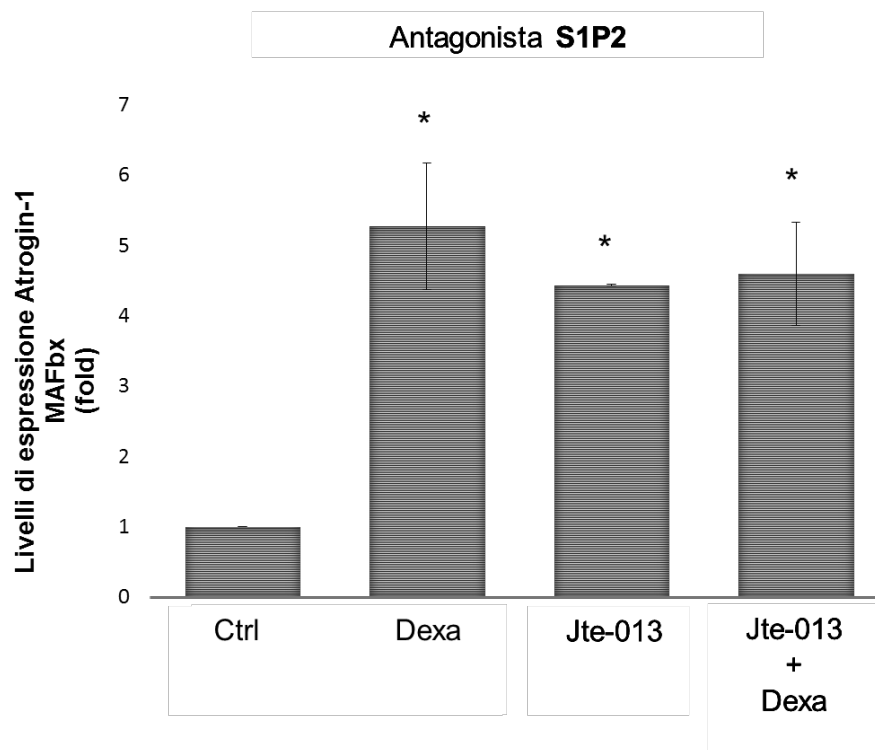


Figura 34. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12. Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con l'antagonista (Jte-013 1 μ M) selettivo per il sottotipo recettoriale S1P2 sia in condizioni basali (Jte-013) che a un'ora prima del trattamento con Dexa 100 μ M (Jte-013+Dexa). I livelli d'espressione del gene target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH presente in ciascun campione. I valori sono la media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato, normalizzati sul valore del controllo settato a 1. Le variazioni di Atrogin-1 MAFbx sono statisticamente significative [test Anova ad una via (one way Anova) seguito da Tukey-Kramer post hoc test , * P < 0.05 vs Ctrl].

- *Ruolo funzionale di **S1P3***: in **Figura 35**, i miotubi sono stati trattati sia con un agonista selettivo del recettore S1P3 (CYM5541, 2 μ M) che con l'antagonista (VPC23019, 1 μ M), specifico per S1P3/S1P1. I risultati riportati in grafico mostrano che sia l'attivazione di S1P3 con CYM5541 che l'inibizione parziale del recettore con VPC23019, di per se' non comportano variazioni significative nell'espressione di Atrogin-1/MAFbx: i miotubi trattati con questi composti, infatti, presentano un contenuto del marcatore atrofico pari al controllo non trattato. In presenza di atrofia indotta da Dexametazone (Dexa), l'attivazione del recettore non potenzia né reverte l'effetto del Dexa sui livelli di espressione dell'ubiquitina ligasi. Al contrario, la diminuzione significativa dei livelli di Atrogin-1/MAFbx nei miotubi a cui è stato aggiunto l'antagonista VPC23019 un'ora prima del trattamento con il glucocorticoide (VPC23019 + Dexa), suggerisce che l'inibizione di S1P3 possa revertire l'effetto del Dexa contrastando l'instaurarsi di un fenotipo atrofico.

Saranno necessari ulteriori esperimenti per approfondire il ruolo che l'inibizione di questo recettore possa svolgere nel contrastare il fenotipo atrofico, per esempio trasfettando le cellule con un siRNA capace di spegnere solo la trascrizione del gene codificante per S1P3, oppure utilizzando un nuovo potente antagonista selettivo per questo sottotipo recettoriale, SPM-354, i cui potenziali effetti sulla rigenerazione muscolare in vivo sono stati da poco riportati in letteratura (Sanna et al., 2016).

Questi dati preliminari, se analizzati nel complesso, mostrano che un'inibizione delle vie di segnalazione a valle di S1P1 e un'eventuale stimolazione dei meccanismi molecolari mediati da S1P2 contribuirebbero al ripristinare il fenotipo muscolare differenziato contrastando l'effetto indotto dal Dexa nei miotubi atrofici.

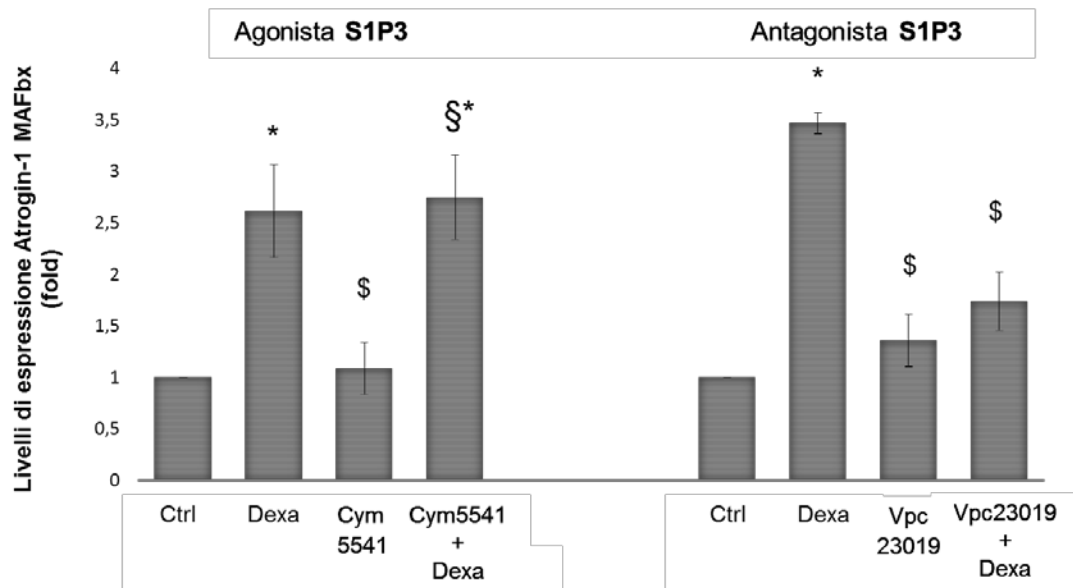


Figura 35. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12. Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con l'agonista (Cym5541 2 μ M) e l'antagonista (Vpc 23019 2 μ M) selettivi per il sottotipo recettoriale S1P3 sia in condizioni basali (Cym554; Vpc23019) che a un'ora prima del trattamento con Dexa (100 μ M) (Cym5541+Dexa; Vpc 23019+Dexa). I livelli d'espressione del gene target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH presente in ciascun campione. I valori sono la media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato, normalizzati sul valore del controllo settato a 1. Le variazioni di Atrogin-1/MAFbx sono statisticamente significative [test Anova ad una via (one way Anova) seguito da Tukey-Kramer post hoc test, * $P < 0.05$ vs Ctrl; \$ $P < 0.05$ vs Dexa; \$ $P < 0.05$ vs Cym5541].

Per confermare ulteriormente questa ipotesi, i miotubi C2C12, un'ora prima dell'aggiunta del Dexa al mezzo di coltura, sono stati trattati con una miscela di antagonisti W146 (2 μ M) + VPC23019 (1 μ M) e successivamente con S1P esogena (2 μ M) (W146+S1P+VPC+Dexa) per stimolare S1P2. I risultati ottenuti in Western Blotting (**Figura 36 A-B**), mostrano una riduzione significativa del contenuto proteico di Atrogin-1/MAFbx nei miotubi trattati con la miscela di composti rispetto alle cellule indotte all'atrofia dall'aggiunta del solo Dexa. Questo dato è stato confermato anche in real time PCR (**Figura 36 C**): i livelli di espressione dell'Ub ligasi risultano significativamente diminuiti nelle cellule trattate con la combinazione di antagonisti rispetto al trattamento con soltanto Dexa. Pertanto, le vie di segnalazione a valle di S1P1 ed S1P2, in maniera opposta, sono in grado di contrastare l'effetto indotto dal glucocorticoide, riducendo i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx.

Successivamente, è stata utilizzata una miscela di composti presumibilmente con azione opposta rispetto alla terna di agonisti/antagonisti impiegata in **Figura 36**. I miotubi sono stati trattati con gli agonisti selettivi per S1P1 ed S1P3, SEW2871 e CYM5541, rispettivamente, e con l'antagonista competitivo JTE-013, specifico per S1P2, senza aggiungere il Dexa al mezzo di coltura (SEW+JTE+CYM). Nel Western Blotting riportato in **Figura 37 A-B**, i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx aumentano significativamente nei miotubi trattati rispetto alle cellule non trattate. Il dato è stato confermato anche in real time PCR (**Figura 37 C**): i livelli di espressione dell'ubiquitina ligasi appaiono marcatamente più alti nei campioni con la mix di composti rispetto al controllo.

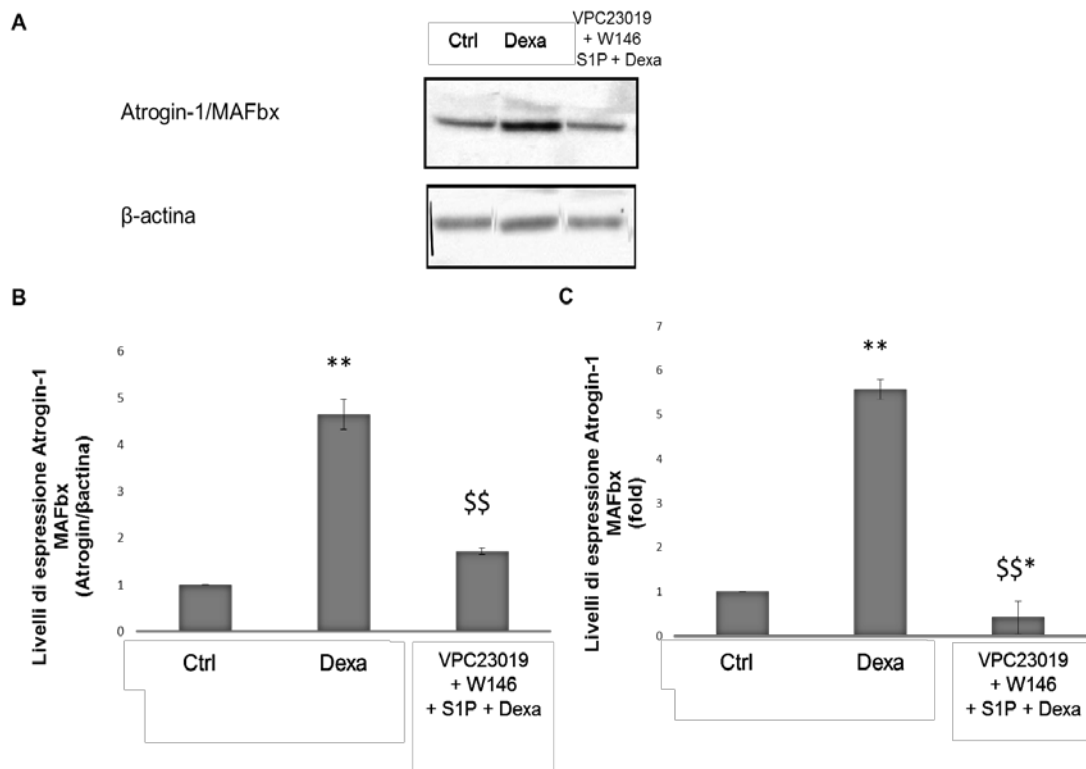


Figura 36. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 µg) ottenuti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con S1P esogena (2µM) più una miscela di antagonisti (W146-2µM; VPC23019-2µM) selettivi per i due sottotipi recettoriali S1P1-S1P3 a un'ora prima del trattamento con Dexa 100µM (W146+VPC23019+S1P+Dexa) usando un anticorpo specifico anti-Atrogin-1/MAFbx. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β-actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 1 ed espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei miotubi dexa e la sua diminuzione nella miscela di antagonisti + S1P (W146+VPC23019+S1P+Dexa) sono statisticamente significativi (test t di Student, **P<0.01vs Ctrl; \$\$P<0.01 vs Dexa). **(C)** Real time PCR L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA proveniente dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore del controllo settato a 1. Le variazioni dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx sono statisticamente significative (test t di Student, *P< 0.05, **P< 0.01vs Ctrl; \$\$P< 0.01 vs Dexa).

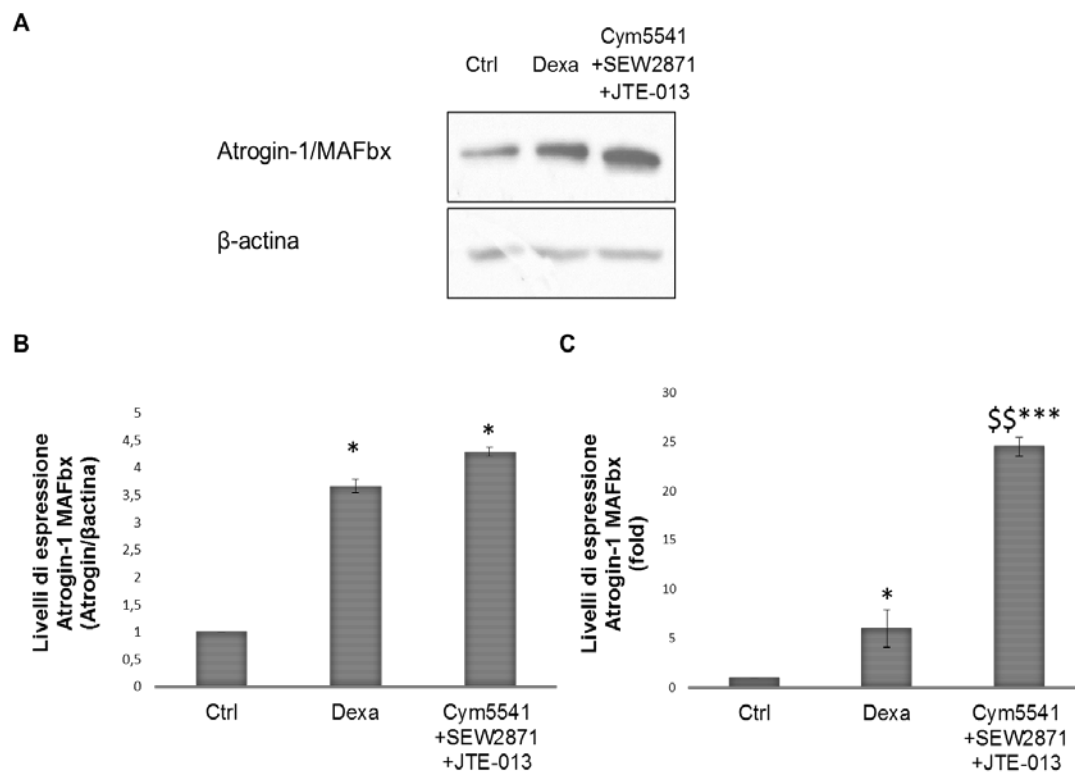


Figura 37. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexta 100 μ M e con una miscela di agonisti/antagonisti (SEW2871 1 μ M; JTE-013 1 μ M; CYM5541 2 μ M) selettivi per i tre sottotipi recettoriali S1P1-S1P2-S1P3 usando un anticorpo specifico anti-Atrogin-1/MAFbx. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. L'aumento di Atrogin-1/MAFbx nei miotubi dexta e nella terna di agonisti/antagonisti (SEW2871 +JTE-013-+CYM5541) è statisticamente significativo (test t di Student, * P < 0.05 vs Ctrl). **(C)** Real time PCR L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA proveniente dai campioni sopra descritti. I livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore del controllo settato a 1. Le variazioni di Atrogin-1/MAFbx sono statisticamente significative (test t di Student, * P < 0.05, *** P < 0.001 vs Ctrl; \$\$ P < 0.01 vs Dexta).

In sintesi, un'attivazione delle vie di segnalazione a valle di S1P1 e un'inibizione dei meccanismi molecolari indotti da S1P2 regolerebbero positivamente la trascrizione genica di Atrogin-1/MAFbx e mimerebbero gli effetti causati dall'aggiunta del Dexa al mezzo di coltura. Al contrario, quando le cellule vengono trattate con soltanto l'agonista selettivo per S1P3 non si osservano variazioni significative dell'espressione di Atrogin-1/MAFbx. Questo suggerisce che l'attivazione delle vie di segnalazione a valle di questo sottotipo recettoriale non abbiano un ruolo determinante nell'induzione del fenotipo atrofico.

In presenza di atrofia muscolare indotta dal trattamento con Dexa abbiamo dimostrato che un aumento dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx si accompagna una diminuzione dei livelli intracellulari di CerK. Pertanto, si è valutato se il mix di ligandi dei recettori S1PR in grado di mimare l'effetto di Dexa (SEW+ JTE +CYM) potesse avere un effetto sull'espressione di CerK. Come riportato nel Western Blotting in **Figura 38 A-B**, i livelli d'espressione di CerK nelle cellule trattate sono significativamente ridotti di circa il 50% rispetto al controllo, confermando che una diminuzione del contenuto intracellulare dell'enzima si accompagna ad un fenotipo atrofico. Dovranno essere comunque condotti ulteriori esperimenti per approfondire il potenziale ruolo delle vie di segnalazione a valle di S1P1 e S1P2 nell'induzione del fenotipo atrofico, valutando l'espressione di altri marcatori molecolari come per esempio Akt e mTOR.

I dati fin qui riportati relativi ai livelli di espressione dell'mRNA di Atrogin-1/MAFbx in miotubi trattati con gli agonisti/antagonisti specifici dei tre sottotipi recettoriali di S1P sono stati riassunti nella **Tabella 2**.

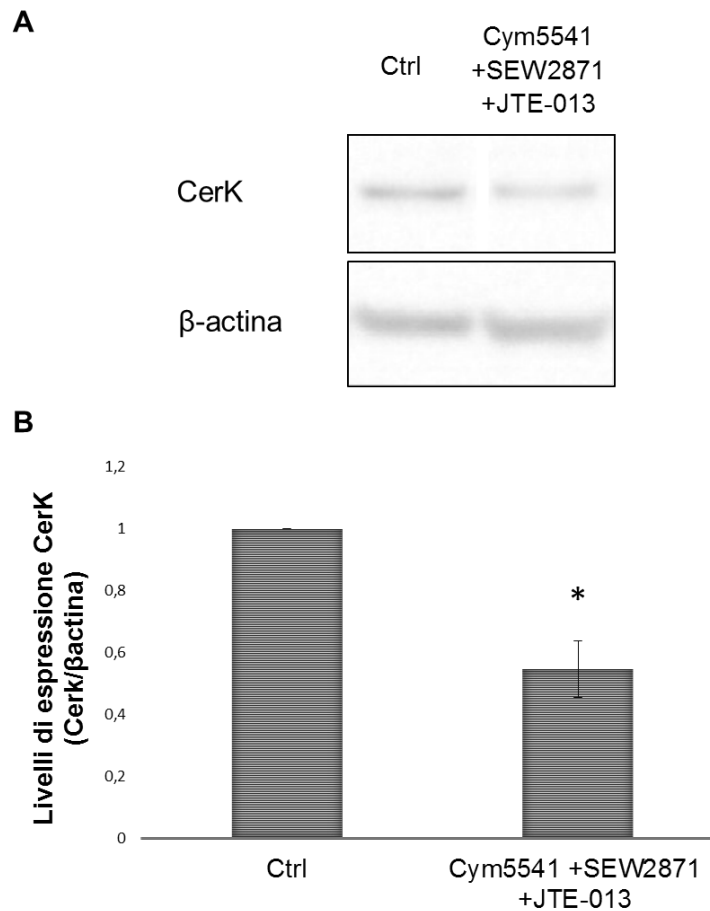


Figura 38. Variazione dei livelli di espressione di CerK in miotubi C2C12. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) ottenuti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con una miscela di agonisti/antagonisti (SEW 2871 1 μ M; JTE-013 1 μ M; CYM 5541 2 μ M) selettivi per i tre sottotipi recettoriali S1P1-S1P2-S1P3 usando un anticorpo specifico anti-CerK. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di CerK nei miotubi trattati è statisticamente significativa (test t di Student, * $P < 0.05$ vs Ctrl).

Livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx (mRNA)					
Attivazione S1PR			Inibizione S1PR		
S1P1	S1P2	S1P3	S1P1	S1P2	S1P1/3
SEW	W146 VPC + S1P	CYM	W146	JTE	VPC
↑			↓↓		
	↓↓			↑	
		=			↓

Tabella 2. Tabella riassuntiva delle variazioni dei livelli di espressione dell'mRNA di Atrogin-1/MAFbx osservate in seguito al trattamento con agonisti/antagonisti specifici dei tre sottotipi recettoriali di S1P (S1P1-S1P2-S1P3) in miotubi C2C12 indotti all'atrofia dal trattamento con Dexa.

ESPRESSIONE DEI RECETTORI SPECIFICI PER S1P IN UN MODELLO *IN VIVO* DI CACHESSIA NEOPLASTICA ED IN UN MODELLO CELLULARE DI ATROFIA MUSCOLARE

✓ *Livelli di espressione dei tre sottotipi recettoriali specifici per S1P in miotubi C2C12 con fenotipo atrofico e nel muscolo EDL di topi cachettici portatori di carcinoma del colon C26*

Considerando che attivazione ed inibizione delle vie a valle dei sottotipi recettoriali svolgono un ruolo importante nella regolazione dell'espressione di Atrogin-1/MAFbx, si è successivamente determinato se la condizione di atrofia indotta nei miotubi si accompagnasse ad alterazione dei livelli di espressione dei vari sottotipi recettoriali e se ciò si verificasse anche nel fenotipo cachettico. Dati pubblicati alcuni anni fa mostrano che durante la miogenesi il rapporto di espressione tra i tre diversi sottotipi recettoriali cambia: S1P2 infatti diminuisce durante il differenziamento, mentre S1P3 è il recettore più espresso nei miotubi (Meacci et al., 2003). Questi risultati sono stati confermati mediante Real Time PCR. Dal grafico mostrato in **Figura 39** si evince, infatti, che i livelli di espressione di S1P1 e S1P2 diminuiscono in maniera altamente significativa nelle cellule muscolari differenziate (MT) rispetto a quelle in attiva proliferazione (MB). S1P3 risulta, invece, essere maggiormente espresso nei miotubi rispetto ai mioblasti.

Successivamente, è stato valutato se vi fossero variazioni nei livelli di espressione dei tre recettori nei miotubi atrofici. I risultati riportati in **Figura 40** mostrano che i livelli di espressione di S1P1 sia a livello di mRNA che di proteina diminuiscono significativamente nei miotubi trattati con Dexa rispetto ai controlli non trattati. Al contrario, l'aumento di S1P2 determinato mediante Real Time PCR non è risultato significativo.

La scarsa efficienza e specificità di anticorpi disponibili in commercio per il riconoscimento del recettore S1P2 non ha permesso di confermare il dato ottenuto in Real Time.

È stato osservato, inoltre, un incremento significativo dei livelli di mRNA di S1P3 che si accompagna ad una diminuzione del contenuto proteico (dato non mostrato) del recettore nei miotubi atrofici, suggerendo, come nel caso del trasportatore Spns2, un'alterazione nel turnover in condizioni di atrofia.

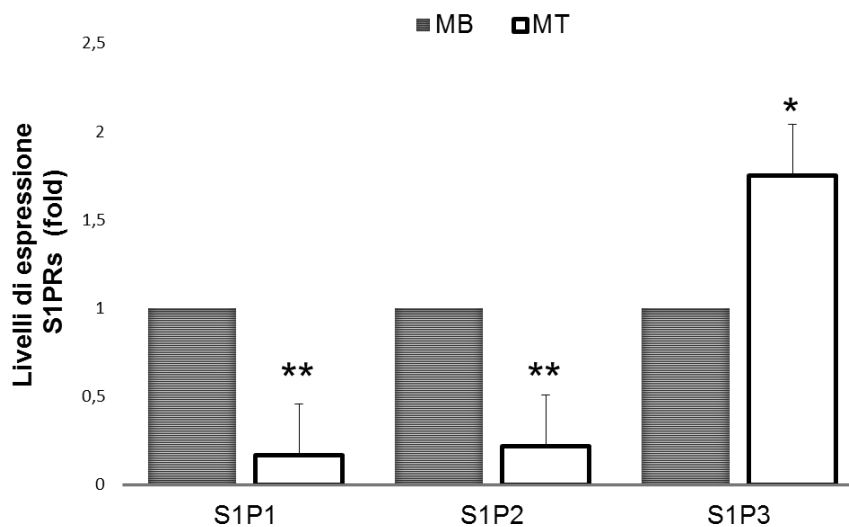


Figura 39. Variazione dei livelli di espressione dei tre sottotipi recettoriali (S1P1-S1P2-S1P3). Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da mioblasti C2C12 (MB) e miotubi (MT). I livelli d'espressione del gene target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH presente in ciascun campione. I valori sono la media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato, normalizzati sul valore dei MB settato a 1 (in cui 1 corrisponde a MB Δ Ct=9,7 per S1P1; Δ Ct=10,1 per S1P2 e Δ Ct=7,2 per S1P3 vs MT Δ Ct 12,3 per S1P1; Δ Ct=12,8 per S1P2 e Δ Ct=6,6 per S1P3). La diminuzione di due sottotipi recettoriali S1P1 e S1P2 e l'aumento di S1P3 nei miotubi sono statisticamente significativi (test t di Student, * P <0.05, ** P <0.01 vs MB).

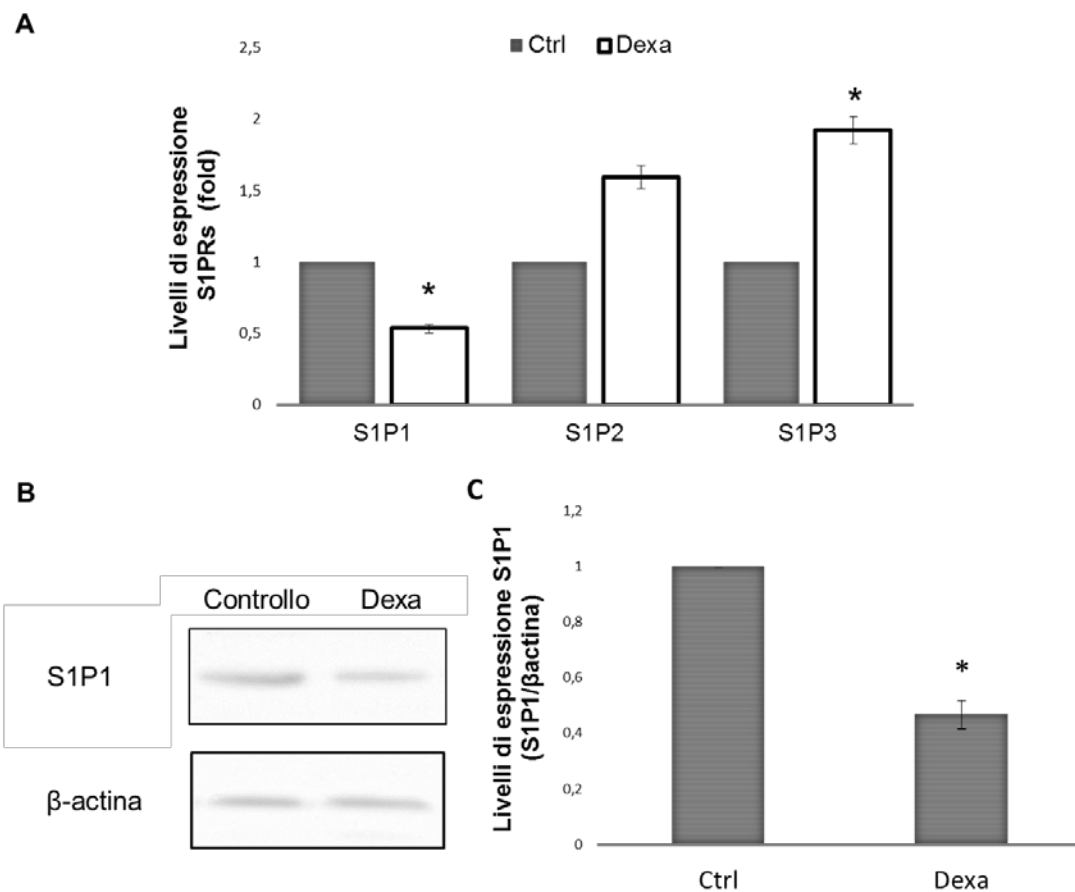


Figura 40. Variazione dei livelli di espressione dei tre sottotipi recettoriali (S1P1-S1P2-S1P3) in miotubi C2C12 in miotubi C2C12 indotti all'atrofia. **(A)** Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100 μ M. I livelli d'espressione dei geni target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore del controllo settato a 1 (in cui 1 corrisponde a MT Ctrl Δ Ct 12,3 per S1P1; Δ Ct=12,8 per S1P2 e Δ Ct=6,6 per S1P3 vs MT Dexa Δ Ct 13,2 per S1P1; Δ Ct=11,6 per S1P2 e Δ Ct=5,6 per S1P3). La diminuzione di S1P1 e l'aumento di S1P3 nei miotubi dexa sono statisticamente significativi (test t di Student, *P <0.05 vs Ctrl). **(B)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20-30 μ g) provenienti dai campioni sopra descritti usando un anticorpo specifico anti-S1P1. **(C)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La diminuzione di S1P1 nei miotubi dexa è statisticamente significativa (test t di Student, *P <0.05 vs Ctrl).

In **Figura 41 A**, sono stati analizzati i livelli di espressione dei recettori in biopsie di muscolo EDL di topi cachettici (C26) rispetto ai controlli.

In particolare, in presenza di cachessia, S1P3 resta il sottotipo recettoriale più espresso, mentre i livelli di S1P2 diminuiscono ulteriormente, contrariamente a ciò che è stato riscontrato nei miotubi atrofici.

A differenza del modello cellulare, inoltre, i livelli di espressione di S1P1 (sia mRNA che proteina) risultano analoghi nelle fibre muscolari del topo cachettico e dei controlli (**Figura 41 A-C**).

I dati fin qui mostrati sia nel modello *in vivo* che *in vitro* relativi ai livelli di espressione dei tre sottotipi recettoriali di S1P, del trasportatore Spns2 e degli enzimi coinvolti nella sintesi degli sfingolipidi bioattivi S1P e C1P sono stati riassunti nella **Tabella 3**.

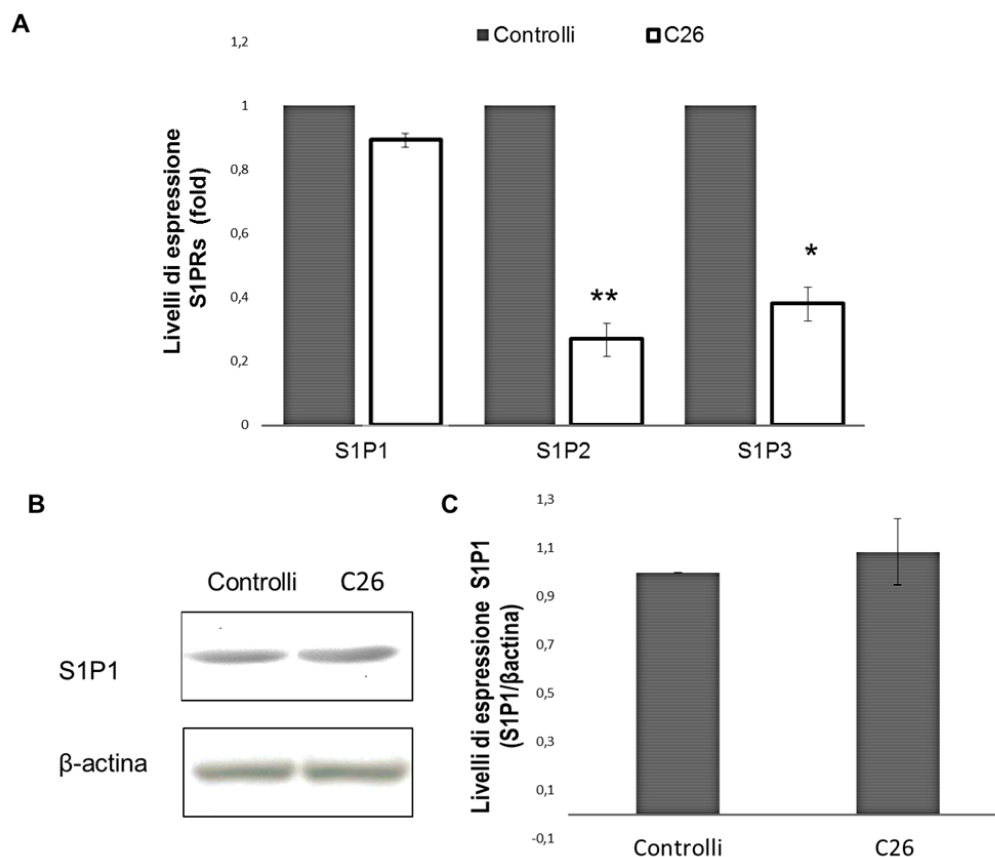


Figura 41. Variazione dei livelli di espressione dei tre sottotipi recettoriali (S1P1-S1P2-S1P3) in biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26. **(A)** Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da biopsie di muscolo EDL di topi BalB/C cachettici portatori di carcinoma C26 (C26) e topi wt (controlli). I livelli d'espressione dei geni target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato e sono stati normalizzati sul valore dei controlli settato a 1 (in cui 1 corrisponde a Controlli Δ Ct=13 per S1P1; Δ Ct=10,2 per S1P2 e Δ Ct=9,5 per S1P3 vs C26 Δ Ct=12,9 per S1P1; Δ Ct=12,2 per S1P2 e Δ Ct=10,8 per S1P3). La diminuzione dei due sottotipi recettoriali (S1P2-S1P3) nei soggetti C26 (C26) è statisticamente significativa (test t di Student * P <0.05; ** P <0.01 vs Controlli). **(B)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (30 μ g) provenienti dai campioni sopra descritti usando un anticorpo specifico anti-S1P1. **(C)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda dei controlli settata a 1 ed espressi come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. La variazione di S1P1 nei soggetti C26 non è statisticamente significativa (test t di Student, P >0.05 vs Controlli).

	Dexa		Cachessia	
	mRNA	Proteina	mRNA	Proteina
S1P1	↓	↓	=	=
S1P2	↑	??	↓	??
S1P3	↑	↓	↓	??
Spns2	↓	↑	=	??
SphK1	↑	=	↑	=
CerK	=	↓	↓	↓

Tabella 3. Tabella riassuntiva delle variazioni dei livelli di espressione (analizzati in Real Time PCR e in Westen Blot) dei tre sottotipi recettoriali di S1P (S1P1-S1P2-S1P3), del trasportatore Spns2 e degli enzimi coinvolti nella sintesi degli sfingolipidi, SphK1 e CerK, sia nel modello animale in vivo di cachessia che nel modello cellulare in vitro di atrofia.

POTENZIALI STRATEGIE TERAPEUTICHE PER FAVORIRE LA RIGENERAZIONE DEL MUSCOLO SCHELETRICO E CONTRASTARE L'ATROFIA MUSCOLARE

Potenziali strategie terapeutiche utili a contrastare l'instaurarsi di un fenotipo atrofico e a favorire la rigenerazione tissutale possono essere considerate la terapia su base cellulare condotta su cellule mesenchimali stromali derivate da midollo osseo (BM-MSCs) ed un approccio nutrizionale incentrato su molti fattori antiossidanti contenuti naturalmente negli alimenti.

Terapia cellulare con BM-MSCs

Numerosi progetti sperimentali ed altri studi clinici, tutt'ora in corso, hanno dimostrato gli effetti benefici del trapianto di BM-MSCs in tessuti che hanno subito danni di varia natura e sulla riparazione/rigenerazione di organi (Almeida et al., 2016; Das et al., 2013; de la Garza-Rodea et al., 2011; Formigli et al., 2015; Kanemaru et al., 2013; Natsu et al., 2004; Pileggi et al., 2013; Pretheeban et al., 2012; Sassoli et al., 2012; von Roth et al., 2012; Winkler et al., 2012). Le BM-MSCs sono, infatti, attualmente considerate tra i migliori candidati nel campo della medicina rigenerativa.

Restano ancora da indagare i potenziali vantaggi di questa linea cellulare in condizioni di atrofia.

Nella maggior parte degli studi riportati in letteratura, gli effetti positivi delle BM-MSCs non sembrano essere attribuiti alla loro capacità di differenziare nei vari tipi cellulari residenti nel tessuto ospite, bensì alla loro abilità a rilasciare fattori paracrini in grado di migliorare il microambiente e di stimolare i meccanismi endogeni di riparazione del tessuto stesso (Kim et al., 2016; Lee et al., 2011; Sassoli et al., 2014).

Pertanto, l'identificazione dei fattori secreti (secretoma) dalle cellule staminali, nonché delle vie di segnalazione da essi attivati, è di grande importanza

biologica per estendere gli studi e ottimizzare gli effetti ottenuti dopo il trapianto di BM-MSCs in sede di danno. Ad oggi, le molecole ad azione paracrina secrete dalle MSCs sono state scarsamente caratterizzate e si sa molto poco sulle azioni autocrine di questi fattori.

Pochi anni fa è stato dimostrato che gli sfingolipidi, in particolare S1P, sono in grado di attenuare i danni tissutali indotti da contrazione eccentrica e di proteggere dall'apoptosi le fibre muscolari, preservando la vitalità e il rinnovamento delle cellule satelliti (Daneli-Betto et al., 2010; Formigli et al., 2007; Formigli et al., 2009; Meacci et al., 2008; Meacci et al., 2010; Nagata et al., 2006; Squecco et al., 2006).

Pertanto, considerate le numerose evidenze sperimentali riguardanti gli effetti benefici delle BM-MSCs nella riparazione del tessuto muscolare danneggiato e tenendo presente il potenziale ruolo trofico attribuito a S1P, al fine di definire i meccanismi di interazione paracrina tra BM-MSCs e cellule muscolari scheletriche, è stato valutato se le BM-MSCs fossero in grado di modulare la proliferazione di mioblasti murini C2C12 attraverso il rilascio del lipide bioattivo e di controbilanciare gli effetti indotti da stimoli atrofici.

✓ *Sphingolipidi e BM-MSCs*

Mediante esperimenti di marcatura con $^3\text{[H]}$ Sfingosina ($^3\text{[H]}$ Sph), è stato dimostrato che le BM-MSCs sono in grado di rilasciare S1P nel mezzo di coltura. In **Figura 42** sono stati quantificati i metaboliti derivati dalla Sph radioattiva aggiunta al mezzo di coltura per 24h e dal grafico si evince che la $^3\text{[H]}$ Sph viene incorporata e metabolizzata all'interno delle cellule a formare $^3\text{[H]}$ S1P e $^3\text{[H]}$ Cer.

Sul totale dei lipidi marcati, la $^3\text{[H]}$ S1P è stata rilevata in maniera analoga nel mezzo di coltura di BM-MSCs coltivate sia nel terreno di differenziamento usato per le cellule C2C12 (MSC-DM) contenente il 2% di siero di cavallo (horse

serum, HS), che nel terreno di proliferazione ottenuto da colture primarie di cellule satelliti (MSC-PM), isolate da singola fibra di muscolo EDL, indicando che le BM-MSCs sono in grado di rilasciare lo sfingolipide bioattivo.

È stato inoltre dimostrato che la sintesi e il rilascio extracellulare di $^3\text{[H]S1P}$ dipendono dall'attività intracellulare di SphK1: infatti, si osserva una riduzione statisticamente significativa (approssimativamente del 40%) nel contenuto di $^3\text{[H]S1P}$ nel mezzo condizionato ottenuto da MSCs coltivate in DM (MSC-DM) o PM (MSC-PM) in presenza dell'inibitore selettivo di SphK1, iSK 5 μM (MSC-DMiSK e MSC-PMiSK, rispettivamente) (**Figura 43**).

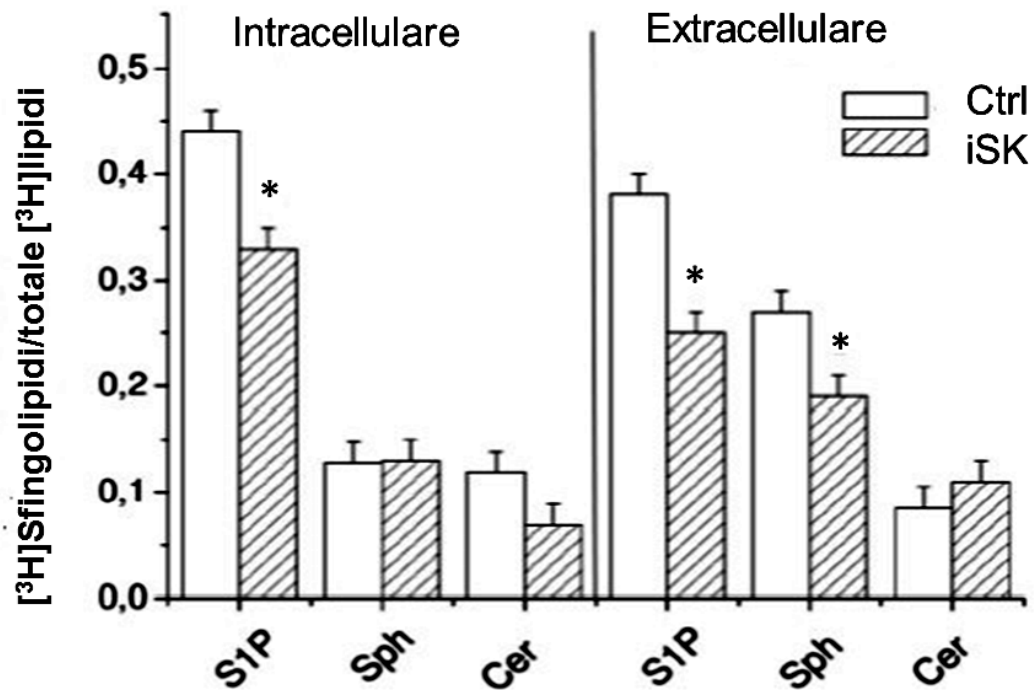


Figura 42. $[^3\text{H}]$ Sfingosina ($[^3\text{H}]$ Sph) e metaboliti derivati dalla sfingosina nelle MSCs. Le MSCs sono state mantenute in coltura in DMEM addizionato con il 10% di FBS in assenza (Ctrl) ed in presenza dell'inibitore della sfingosinachinasi (SphK1) ($5\mu\text{M}$, iSK) per 24h e sono state sottoposte a pulse di $[^3\text{H}]$ Sfingosina per 2h. I lipidi marcati (S1P, Sph, Cer) estratti dalle cellule e dal terreno condizionato sono stati analizzati mediante cromatografia su strato sottile (TLC). I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti e la riduzione del contenuto di $[^3\text{H}]$ S1P e di $[^3\text{H}]$ Sph è statisticamente significativa (test t di Student, $*p < 0.05$ vs Ctrl).

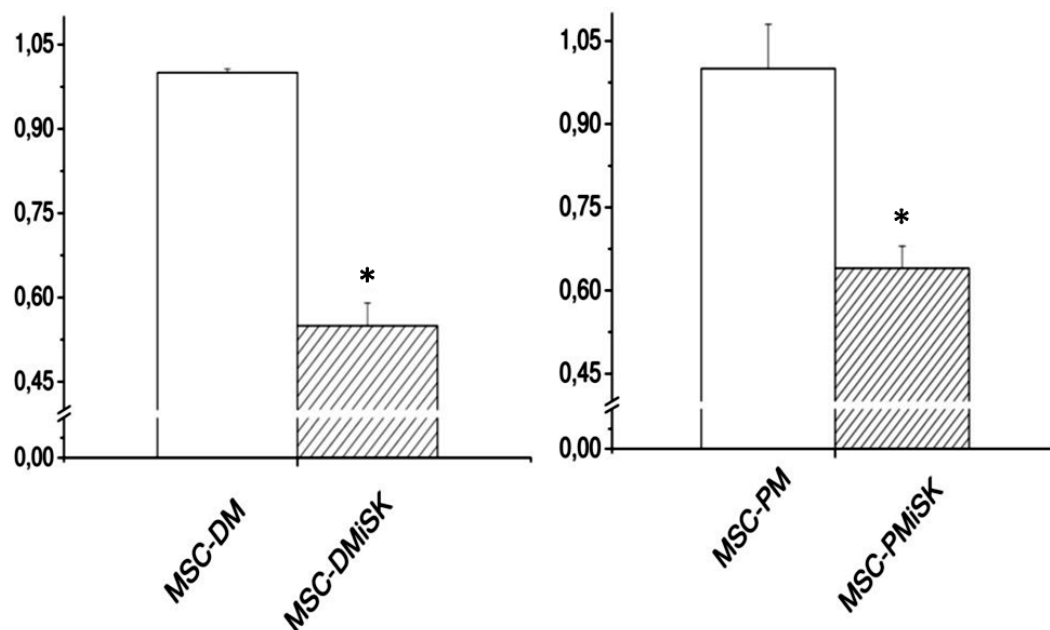


Figura 43. Rapporto tra concentrazione extracellulare e intracellulare di $^3\text{[H]S1P}$ nel mezzo di coltura delle MSCs. Le MSCs sono state coltivate con il terreno di differenziamento (DM) usato per le C2C12 contenente il 2% di siero di cavallo (horse serum, HS), o con il terreno di proliferazione (PM) proveniente da una coltura primaria di cellule satelliti, sia in assenza (MSC-DM, MSC-PM) che in presenza dell'inibitore di SphK1 (iSK, $5\ \mu\text{M}$) (rispettivamente MSC-DMiSK e MSC-PMiSK). Le cellule sono state mantenute in coltura per 48h e poi marcate con $^3\text{[H]Sph}$. I lipidi marcati (S1P, Sph, Cer) estratti dalle cellule e dal terreno condizionato sono stati analizzati mediante cromatografia su strato sottile (TLC). I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti e la riduzione del contenuto di $^3\text{[H]S1P}$ è statisticamente significativa (test t di Student, $*p < 0.05$ vs MSC-DM o vs MSC-PM).

Successivamente sono stati condotti esperimenti per valutare se l'S1P rilasciata dalle BM-MSCs favorisse la proliferazione delle cellule muscolari scheletriche (mioblasti C2C12) e delle cellule satelliti.

In **Figura 44 A-B**, si osserva che il minor contenuto di S1P nel terreno condizionato ottenuto da MSC trattate con iSK (MSC-DMiSK e MSC-PMiSK) si accompagna ad una riduzione significativa della proliferazione dei mioblasti C2C12 e delle cellule satelliti. In particolare, è stata osservata una diminuzione di circa il 40-50% sia nel conteggio del numero di cellule (**Figura 44A**) che nell'incorporazione con ^3H timidina (**Figura 44B**) in mioblasti C2C12 e nelle cellule satelliti esposte per 24h a MSC-DMiSK e MSC-PMiSK, rispetto al controllo specifico (MSC-DM e MSC-PM).

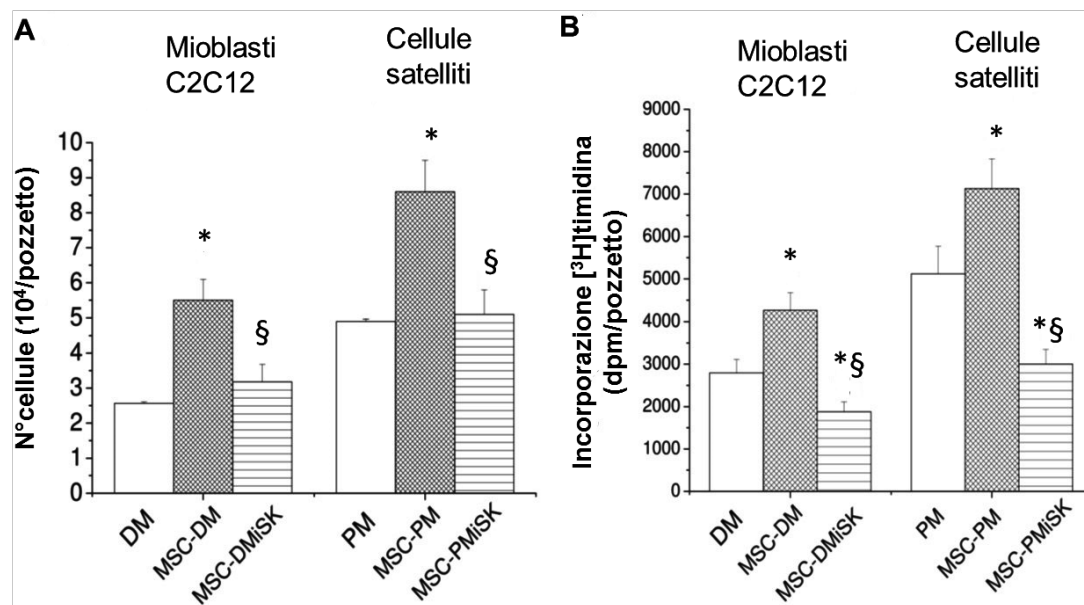


Figura 44. Effetto di S1P secreta dalle MSCs sulla proliferazione di C2C12 e cellule satelliti: conteggio cellulare e incorporazione di ^3H timidina. C2C12 e cellule satelliti isolate da singole fibre muscolari EDL sono state coltivate in terreno di differenziamento (DM) o in terreno di cellule satelliti in proliferazione (PM) o sono state esposte al mezzo condizionato delle MSCs ottenuto da MSCs coltivate per 48h in DM in assenza (MSC-DM) o in presenza di iSK $5\mu\text{M}$ (MSC-DMiSK) o in PM in assenza (MSC-PM) o in presenza di iSK (MSC-PMiSK), rispettivamente. **A)** Conteggio cellulare. Dopo 24h in coltura, le cellule sono state staccate con tripsina e contate in camera di Burk. **B)** Incorporazione di ^3H timidina. C2C12 e cellule satelliti sono state coltivate per almeno due ore in presenza di ^3H metil-timidina e la radioattività emessa è stata misurata tramite uno scintillatore. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato. La significatività statistica è stata calcolata mediante test t di Student: (* $p < 0.05$ vs DM o PM; § $p < 0.05$ vs MSC-DM o MSC-PM).

Il ruolo svolto dall' S1P contenuta nel mezzo condizionato delle BM-MSCs sulla stimolazione della proliferazione dei mioblasti, è stato confermato mediante quantificazione dell'incorporazione di EdU e successiva rilevazione con microscopio a fluorescenza (**Figura 45 A-D**). L' incubazione dei mioblasti C2C12 per 24h con MSC-DM ha comportato un significativo aumento nell'incorporazione di EdU e nella immunocolorazione per Ki67 (un noto marcatore nucleare della proliferazione cellulare), rispetto ai controlli. L'esposizione al MSC-DMiSK ha invece ridotto del 30-40% l'aumento della proliferazione cellulare indotta da MSC-DM.

Come atteso, l'aggiunta di S1P esogena alle cellule mantenute in coltura con MSC-DM e MSC-DMiSK, determina un aumento ulteriore della proliferazione cellulare delle C2C12 (**Figura 45 A-C, E**).

L'effetto positivo del trattamento con solo S1P sulla proliferazione di mioblasti C2C12 è stato già riportato precedentemente in letteratura (Nagata et al., 2006; Sassoli et al.,2012).

Da notare, che le cellule satelliti hanno mostrato un andamento simile a quello dei mioblasti C2C12 (**Figura 45 D**).

Considerati nel complesso, questi risultati suggeriscono che la sintesi e il rilascio di S1P possano giocare un ruolo importante sulla stimolazione della proliferazione dei mioblasti mediata dal mezzo condizionato ottenuto dalle BM-MSCs e sono stati recentemente pubblicati sulla rivista internazionale PLOS ONE (Sassoli et al. 2014).

Gli esperimenti che vengono qui di seguito illustrati dimostrano che l'S1P presente nel mezzo condizionato possa svolgere un ruolo protettivo anche in condizioni di atrofia cellulare.

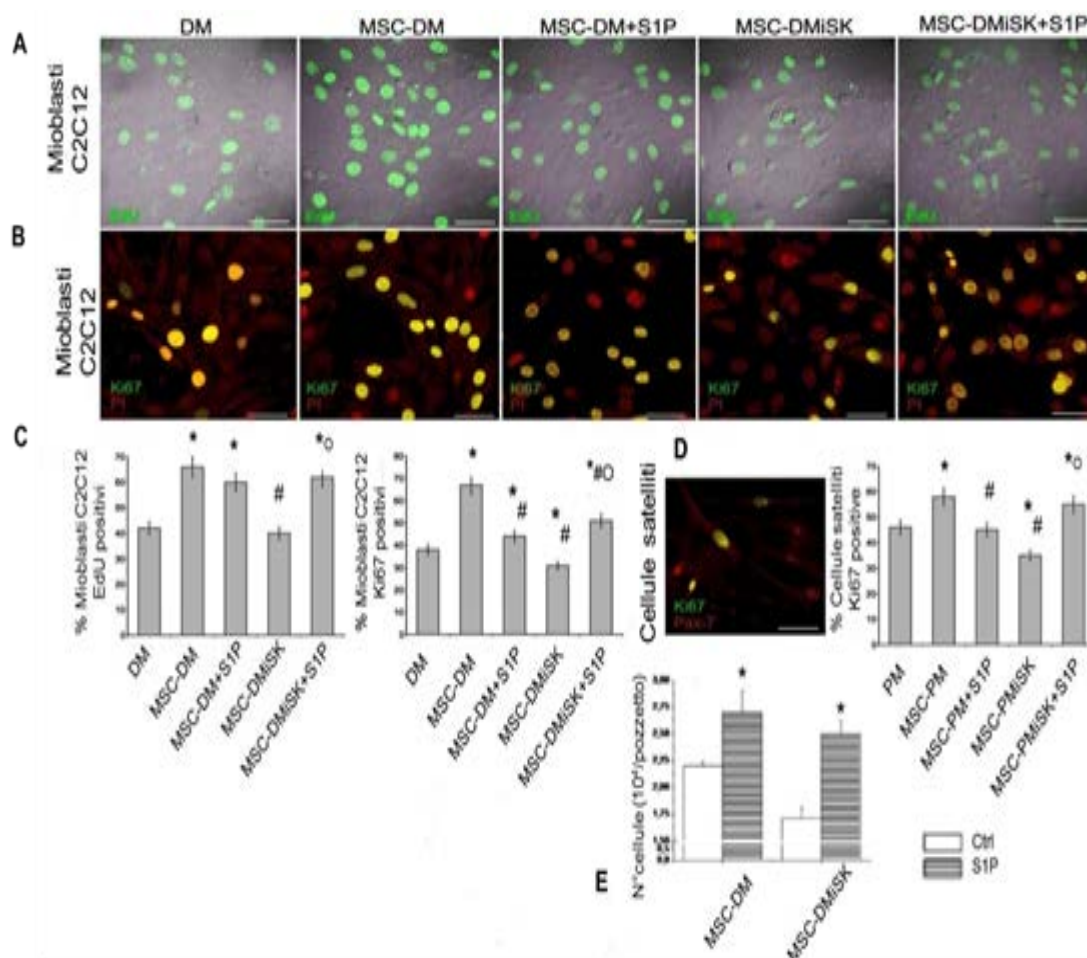


Figura 45. Effetto di S1P secreta dalle MSCs e di S1P esogena sulla proliferazione di C2C12 e di cellule satelliti: analisi morfologica e conteggio cellulare. **(A-D)** Valutazione della proliferazione di C2C12 e di cellule satelliti tramite l'incorporazione di Edu (verde) e l'analisi dell'espressione di Ki67. **(A)** Le immagini riportate, ottenute tramite microscopio a fluorescenza, mostrano l'incorporazione nucleare di Edu (verde) in cellule C2C12 coltivate per 24h nel terreno di differenziamento (DM) o esposte al mezzo condizionato delle MSCs ottenuto da MSCs coltivate per 48h in DM in assenza (MSC-DM) o in presenza di iSK 5 μ M (MSC-DMiSK) o stimulate o meno con S1P esogena 1 μ M (MSC-DM +S1P, MSC-DMiSK +S1P). **(B)** Immagini ottenute al microscopio confocale a fluorescenza di cellule C212 mantenute in coltura nelle condizioni sperimentali descritte in **(A)**, e immunocolorate con anticorpi diretti contro la proteina nucleare ki67 (verde). I nuclei sono stati colorati in rosso con ioduro di propidio (PI). Il colore giallo indica una co-localizzazione dei segnali di fluorescenza rossi e verdi. **(C)** Analisi quantitativa della percentuale di nuclei di cellule C2C12 positivi all'incorporazione di Edu o di Ki67 sul numero di nuclei totali. **(D)** Immagini ottenute al microscopio confocale a fluorescenza

di cellule satelliti mantenute in coltura per 24h con terreno di proliferazione di cellule satelliti (PM), fissate e immunocolorate con anticorpi diretti contro Pax-7 (rosso) e Ki67 (verde). Il colore giallo indica una co-localizzazione dei segnali di fluorescenza rossi e verdi. Nell'istogramma, l'analisi quantitativa della percentuale di nuclei cellulari positivi a Ki67 di cellule satelliti coltivate per 24h in PM o esposte al mezzo condizionato delle MSCs ottenuto da MSCs coltivate per 48h in PM in assenza (MSC-PM) o in presenza di iSK 5 μ M (MSC-PMiSK) o stimulate o meno con S1P esogena 1 μ M (MSC-PM +S1P, MSC-PMiSK +S1P). I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato. **(E)** Conteggio cellulare di C2C12. Le cellule sono state coltivate in MSC-DM o in MSC-DMiSK e stimulate o meno (Ctrl) con S1P 1 μ M. Dopo 24h le cellule sono state staccate con tripsina e contate in camera di Burker. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno quattro esperimenti indipendenti condotti in duplicato. Significatività statistica: in **(C)** (test ANOVA ad una via e Newman-Keuls post hoc test), * $p < 0.05$ vs DM, # $p < 0.05$ vs MSC-DM, ° $p < 0.05$ vs MSC-DMiSK; in **(D)** (test ANOVA ad una via e Newman-Keuls post hoc test), * $p < 0.05$ vs PM, # $p < 0.05$ vs MSC-PM, ° $p < 0.05$ vs MSC-PMiSK; in **(E)** (Student t test), * $p < 0.05$ vs Ctrl.

✓ *Effetto della S1P rilasciata dalle MSCs sui livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12 con fenotipo atrofico*

Come riportato nell'introduzione di questa tesi sperimentale, l'S1P è stata riconosciuta come fattore cruciale nel regolare molti processi molecolari fondamentali nella biologia del muscolo scheletrico, avendo un'azione stimolante sulla crescita delle cellule satelliti (Fortier et al., 2013; Loh et al., 2012; Sassoli et al., 2011), regolando la contrazione muscolare (Bencini et al., 2003) e facilitando la rigenerazione delle fibre muscolari in seguito a lesioni (Costamagna et al., 2015; Danieli-Betto et al., 2010, Nagata et al., 2014).

Appurato che le BM-MSCs sono in grado di rilasciare S1P e che questo sfingolipide svolge un'azione positiva sulla proliferazione dei mioblasti C2C12, il passo successivo è stato quello di valutare il potenziale ruolo di questa molecola come fattore di sopravvivenza su miotubi C2C12 indotti all'atrofia da Dexametazone. Sono stati valutati i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12 incubati per 48h con il mezzo condizionato di BM-MSCs sia in assenza (MSC-DM) che in presenza di Dexametazone (MSC-DM + Dexametazone). Il mezzo condizionato (MSC-DM) è rappresentato, in questo caso, dal terreno di BM-MSCs a confluenza, mantenute per 48h in coltura con il terreno di differenziamento delle C2C12 contenente il 2% di HS.

I risultati ottenuti mediante Real Time PCR (**Figura 46**), mostrano che la riduzione dei livelli di espressione Atrogin-1/MAFbx è altamente significativa nei miotubi mantenuti a contatto per 48h con MSC-DM rispetto alle cellule atrofiche (Dexametazone) e che questa diminuzione è ancora più marcata nelle cellule muscolari differenziate a cui al MSC-DM è stato aggiunto il Dexametazone (MSC-DM + Dexametazone). Quindi, l'S1P rilasciata dalle MSCs e presumibilmente altri fattori in combinazione possono attenuare almeno in parte l'effetto indotto dal glucocorticoide agendo negativamente sulla trascrizione genica di Atrogin-1/MAFbx.

Esperimenti successivi verranno condotti con il terreno condizionato ottenuto da MSC-DMiSK. Inoltre, per comprendere il meccanismo tramite cui agisce

l'S1P rilasciata dalle BM-MSCs, sarà necessario valutare l'espressione di altri marcatori molecolari, come per esempio, le MAP chinasi p38 e ERK 1/2, note vie di segnalazione a valle di S1P1 e S1P2.

I dati preliminari presentati in questo progetto di tesi, mostravano che, in miotubi C2C12 trattati con la mix di antagonisti W146+ VPC23019 e con S1P esogena ad un'ora prima dell'aggiunta del dexametazone al mezzo di coltura (W146+S1P+VPC+Dexa), si riducevano significativamente i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx rispetto alle cellule atrofiche (**Figura 36 A-C**). Ciò può far presupporre che l'S1P secreta dalle BM-MSCs possa contrastare l'effetto del glucocorticoide riducendo l'espressione di Atrogin-1/MAFbx dopo essersi legata ad S1P2 e attivando conseguentemente le vie di segnalazione a valle di questo recettore (i.e. PI3K, GTPasi Rho, ERK1/2, PLC ecc.). Sono in corso esperimenti atti ad evidenziare il ruolo dominante di uno di questi effettori.

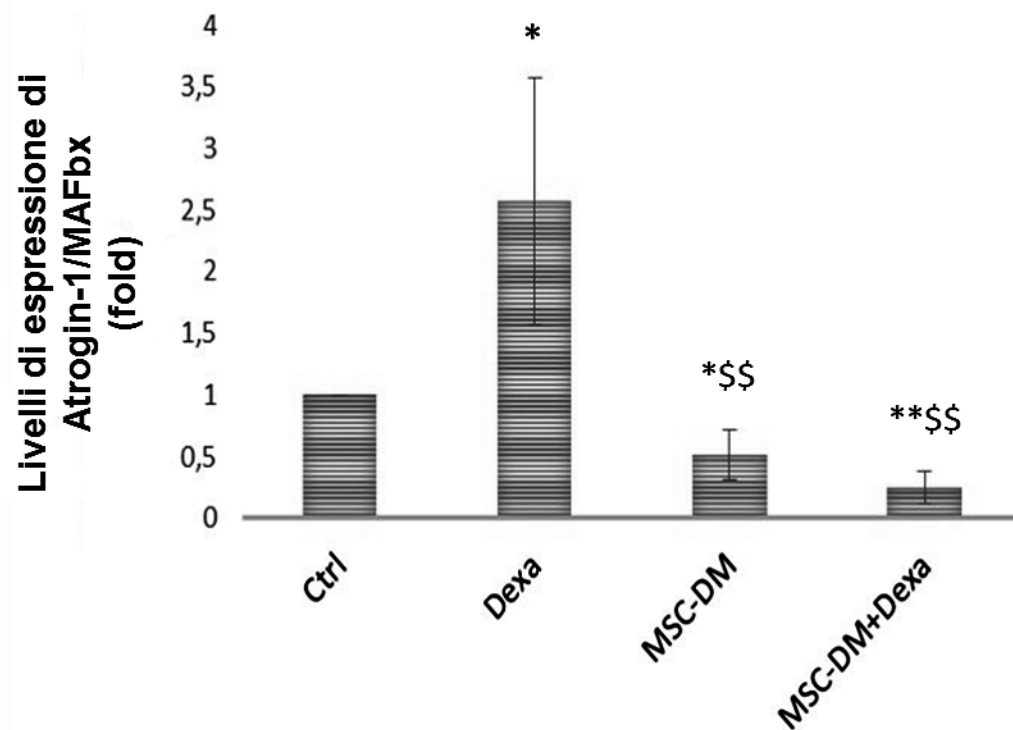


Figura 46. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12. Real time PCR. L'analisi è stata condotta su cDNA retrotrascritto da mRNA ottenuto da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100 μ M e coltivate 48h con terreno di differenziamento (DM), terreno condizionato dall'essere stato mantenuto per 48h a contatto con MSCs a confluenza, sia in assenza (MSC-DM) che in presenza di desametasone (MSC-DM + Dexa). I livelli d'espressione del gene target sono stati normalizzati sul contenuto del gene housekeeping GAPDH presente in ciascun campione. I valori sono la media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato, normalizzati sul valore del controllo settato a 1. Le variazioni di Atrogin-1/MAFbx sono statisticamente significative (test t di Student, * P <0.05, ** P <0.01vs Ctrl; \$\$ P <0.01 vs Dexa).

Molecole bioattive presenti negli alimenti e atrofia cellulare

Data l'importanza di molti fattori antiossidanti contenuti naturalmente negli alimenti, una parte dell'attività di ricerca è stata finalizzata alla caratterizzazione dei principi bioattivi di un prodotto tipico della tradizione della Regione Toscana, *Castanea sativa*, ed in particolare ad uno dei suoi prodotti derivati, la farina dolce. Il progetto si è poi esteso all'identificazione delle proprietà funzionali e nutraceutiche dei principi attivi in termini di capacità di contrastare la comparsa di un fenotipo atrofico nelle cellule muscolari scheletriche. I risultati di questi esperimenti sono stati recentemente pubblicati sulla rivista internazionale di nutrizione "Food and Function" (Frati et al., 2014). È stata analizzata la composizione, in termini di polifenoli e tocoferoli totali, delle farine dolci provenienti da diverse aree geografiche toscane e il più abbondante dei tocoferoli è risultato il γ -tocoferolo, comunemente chiamato vitamina E. Per valutare le capacità nutraceutiche dei vari estratti, è stato utilizzato il modello cellulare rappresentato dai miotubi C2C12 in coltura, indotti all'atrofia dal trattamento con Dexamethasone (Dexa) (100 μ M).

In **Figura 47 A-B**, sono stati valutati mediante Western Blotting i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi trattati con estratti di Polifenoli (Poli) o Tocoferoli (Toco) totali (100 nM) un'ora prima del trattamento con Dexa (Dexa+Poli; Dexa+Toco). Oltre all'aumento atteso dei livelli dell'Ub-ligasi nelle cellule trattate con il glucocorticoide, è stata rilevata un'azione di interferenza indotta dai tocoferoli e non dai polifenoli, rappresentata da una diminuzione dei livelli di Atrogin-1/MAFbx nelle cellule trattate con gli estratti di tocoferoli totali. Questo dato indica che i tocoferoli sono in grado di contrastare in modo significativo i primi momenti del processo di atrofia modulando l'espressione di Atrogin-1/MAFbx a differenza dei polifenoli.

Questi risultati preliminari, quindi, rappresentano la prima evidenza sperimentale delle proprietà biologiche degli estratti del prodotto di lavorazione

della castagna in cellule muscolari scheletriche e possono costituire un buon punto di partenza per eventuali approcci nutrizionali “terapeutici” per limitare l’atrofia del muscolo scheletrico in situazioni fisiologiche come l’invecchiamento o il disuso.

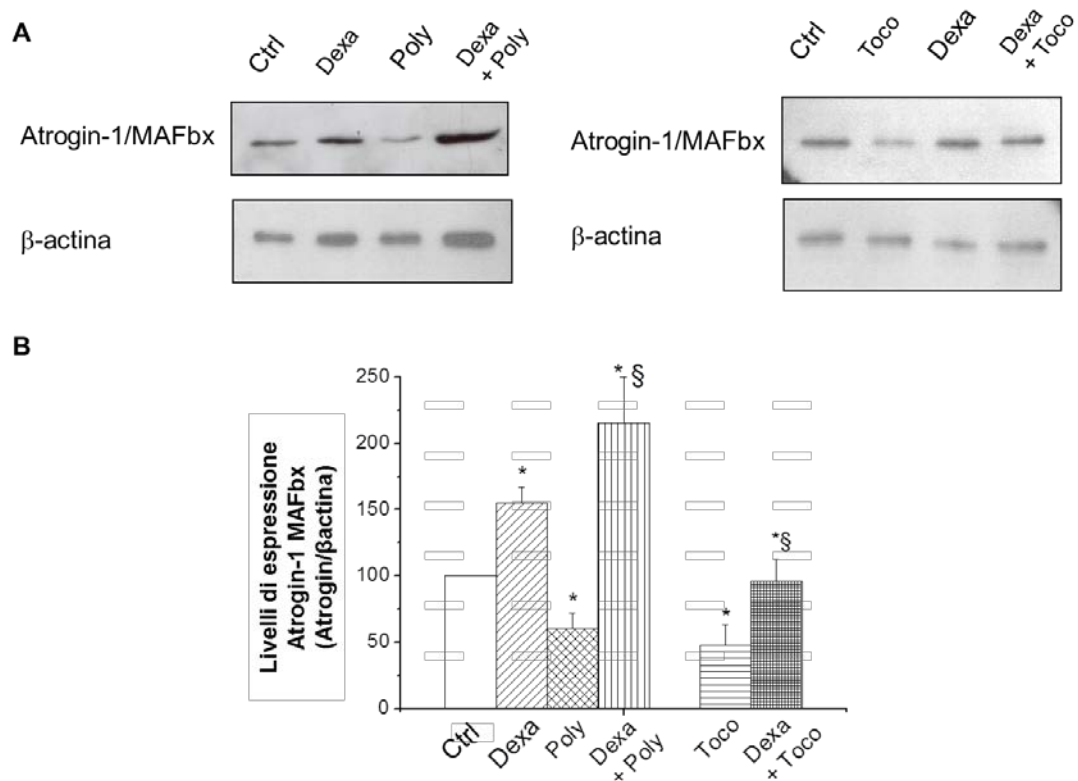


Figura 47. Variazione dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi C2C12. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (20µg) ottenuti da cellule non trattate (Ctrl) e trattate con Dexa 100µM e con estratti di Polifenoli (Poly) e Tocoferoli (Toco) totali (100 nM) a un'ora prima del trattamento con dexa (Dexa+Poly; Dexa+Toco) usando un anticorpo specifico anti-Atrogin-1/MAFbx. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β-actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 100 ed espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Le variazioni dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx sono statisticamente significative (test t di Student, *P<0.05 vs Ctrl; §P< 0.05 vs Dexa).

SFINGOLIPIDI COME POTENZIALI BERSAGLI/EFFETTORI PER CONTRASTARE IL DANNO CELLULARE

Come discusso nei paragrafi precedenti di questa tesi sperimentale, l'efficacia terapeutica del trapianto di cellule staminali mesenchimali nei tessuti muscolari murini danneggiati è principalmente attribuita alla loro abilità a secernere fattori in grado di promuovere l'attivazione e la proliferazione delle cellule satelliti a ricrearsi un microambiente favorevole ai processi di proliferazione e differenziamento.

Per questo motivo, essendo anche S1P un fattore rilasciato da molte cellule, una parte dell'attività di ricerca è stata orientata a valutare la potenzialità degli sfingolipidi ed in particolare S1P di modulare, anche cooperando con altre vie di segnalazione, il rimodellamento della matrice extracellulare (ECM), implicata nei processi di danno (fibrosi) e di rigenerazione tissutale.

È stato dimostrato che l'asse SphK1/S1P/S1PR controlla il rimodellamento della ECM regolando l'espressione, il rilascio e l'attività di enzimi deputati al rimodellamento della matrice extracellulare, le metalloproteasi (MMPs) in BM-MSCs. Infatti, è stato osservato un aumento dell'attività dell'isoforma MMP-2 in cellule trattate con agonisti/antagonisti dei recettori di S1P. Questi dati risultano parte di un manoscritto inviato per la pubblicazione.

In un altro modello cellulare, cellule muscolari cardiache, è stato dimostrato che gli sfingolipidi bioattivi possono essere bersagli anche di ormoni con azione antifibrotica, quale l'ormone peptidico relassina (RLX), i cui effetti biologici si manifestano su vari tessuti compreso il cuore. E' noto che la RLX attivi il turnover della matrice extracellulare e regoli l'espressione/rilascio di MMPs in cellule muscolari cardiache (Nistri et al.,2012; Samuel et al.,2007). I risultati di questi esperimenti condotti durante il mio lavoro di tesi dal gruppo di ricerca guidato dalla Prof.ssa Meacci, sono stati recentemente pubblicati sulla rivista internazionale *Molecular Endocrinology* (Fрати et al. 2015) e mostrano per la prima volta che la RLX può attivare il metabolismo degli sfingolipidi in

una coltura primaria di cellule muscolari cardiache neonatali murine ed in una coltura immortalizzata di cardiomioblasti di ratto H9C2.

Come mostrato in **Figura 48A-B**, la RLX (50 ng/ml) induce un significativo aumento dell'attività di SphK1 in entrambi i tipi cellulari, raggiungendo il massimo effetto dopo 15 min di stimolazione. In particolare, il blot rappresentativo mostrato in **Figura 48C**, indica che dopo un'incubazione di 24h, l'ormone non è più in grado di aumentare in maniera significativa l'espressione di SphK1, probabilmente a causa di una modifica post-traslazionale successiva all'attivazione dell'enzima.

In una seconda fase dello studio è stata valutata l'azione dello SL bioattivo in qualità di ligando di recettori S1PR. L'espressione dei recettori è stata analizzata tramite RT-PCR sull'mRNA totale estratto sia dalle H9C2 che dalle colture primarie di cardiomiociti. Come mostrato in **Figura 49 C-D**, è stato rilevato il cDNA della lunghezza attesa per S1P1 e S1P2 in entrambe le colture cellulari, mentre non è stata osservata nessuna amplificazione per S1P3 nei cardiomioblasti (**Figura 49D**). Come controllo positivo è stato utilizzato l'RNA ottenuto dai miotubi C2C12 (**Figura 49 B**), sulla cui membrana, come precedentemente dimostrato, sono localizzati tutti e tre i sottotipi recettoriali.

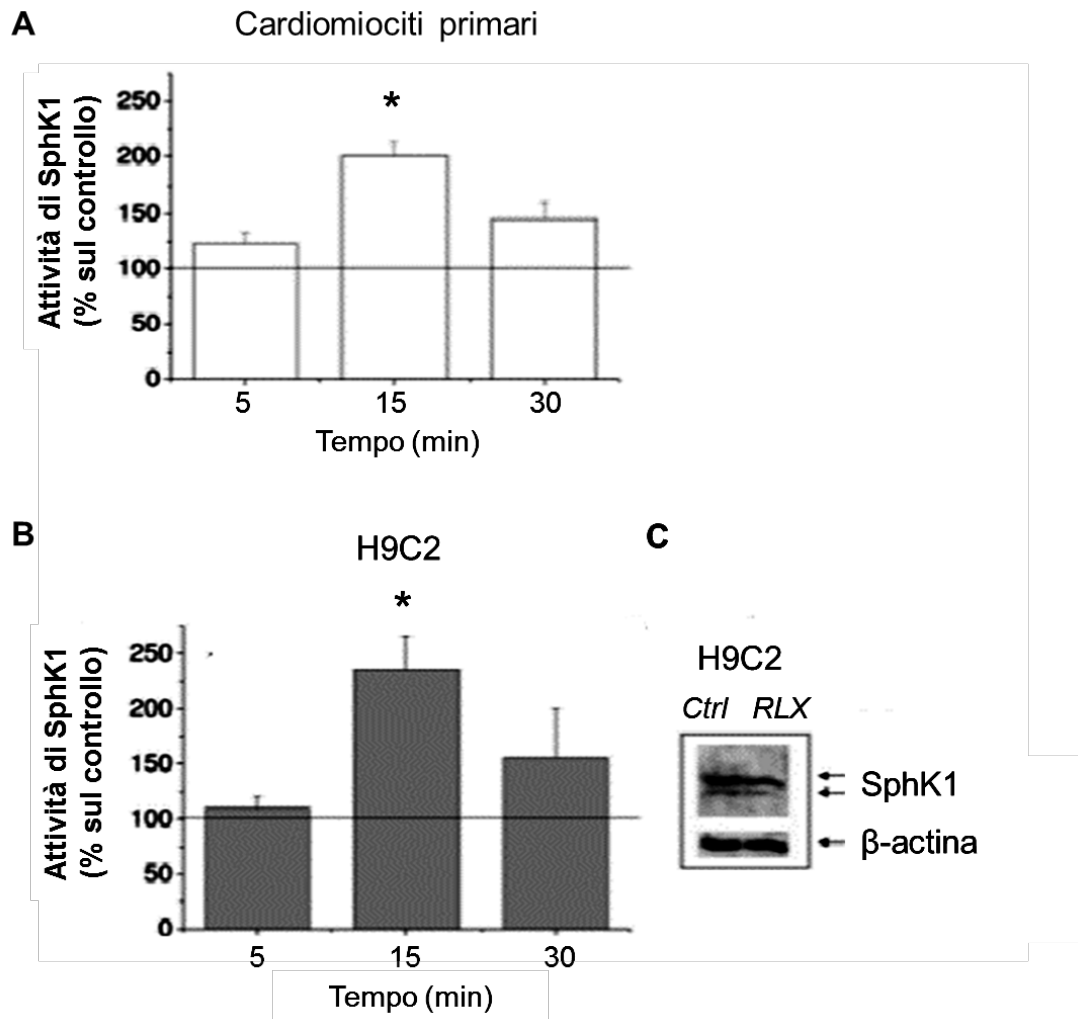


Figura 48 La RLX stimola l'espressione di SphK1 in colture primarie di cardiomiociti e cellule H9C2. **(A)** e **(B)**: Western Blotting. L'espressione di SphK1 è stata determinata su lisati cellulari (30–50 μ g) ottenuti da colture primarie di cardiomiociti **(A)** e H9c2 **(B)** non trattate (Ctrl) e trattate con RLX (50 ng/mL) secondo i tempi indicati nel grafico. I valori sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato (Test t di Student: * $P < 0.05$ vs Ctrl). **(C)** Western Blotting rappresentativo dell'isoforma SphK1 in H9C2. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (25 μ g) usando un anticorpo specifico anti-SphK1 e i risultati sono stati ottenuti tramite analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β -actina presente in ciascun campione. L'intensità delle bande è stata riportata in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 100.

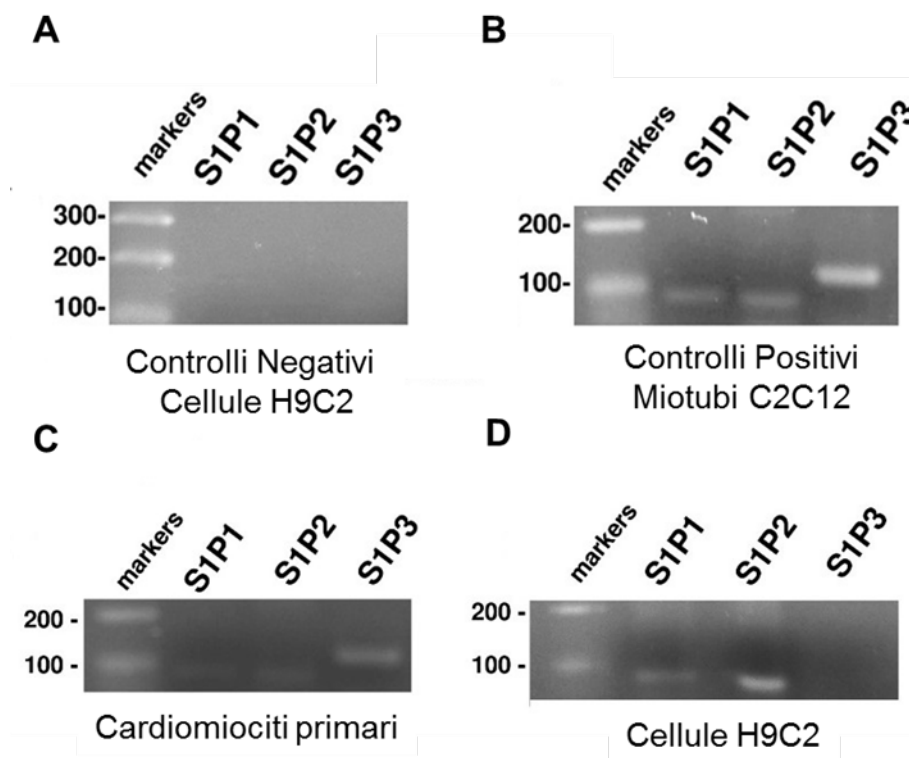


Figura 49. Livelli di espressione dei recettori specifici per S1P in cellule H9C2, in colture primarie di cardiomiociti ed in miotubi C2C12. **(B–D):** Immagini rappresentative di corsa su gel di agarosio degli amplificati attesi. L'RNA totale estratto è stato sottoposto a trattamento con DNasi e successivamente retrotrascritto. Il cDNA è stato amplificato mediante PCR semi-quantitativa usando coppie di primers specifiche per S1P1, S1P2 ed S1P3 **(A–D)**. **(A):** I controlli negativi consistono in H₂O aggiunta a ciascuna reazione. **(B):** I controlli positivi sono rappresentati dal cDNA ottenuto dai miotubi C2C12. **(C e D):** amplificazione del cDNA retrotrascritto a partire dall'RNA estratto dalle colture primarie di cardiomiociti **(C)** e dai cardiomioblasti H9C2 **(D)**.

A causa del basso livello di espressione di S1P1 ed S1P2 nei cardiomiociti, i risultati ottenuti sono stati confermati in Real Time PCR. In **Tabella 4**, sono stati riportati i cicli di amplificazione (Ct) e di differenza di espressione rispetto al gene housekeeping (Δ Ct), relativi ai tre sottotipi recettoriali. In particolare, l'analisi ha indicato livelli di espressione simili di tutti e tre i sottotipi recettoriali nella coltura primaria di cellule muscolari cardiache e ha ribadito l'assenza di S1P3 nelle H9C2.

Nello stesso lavoro è stato riportato che la RLX modula il rilascio di MMP-2 e -9 e del fattore CTGF (fattore di crescita del tessuto connettivo) attraverso l'induzione del metabolismo degli sfingolipidi e la formazione di S1P (Fрати et al., 2014).

		S1P1	S1P2	S1P3	GAPDH
Cardiomiociti primari	Ct	17,44	17,97	17,28	13,26
	Δ Ct	4,18 $\pm$ 0,5	4,71 $\pm$ 0,6	4,02 $\pm$ 0,7	
H9C2	Ct	21,89	20,00		14,52
	Δ Ct	7,37 $\pm$ 0,8	5,48 $\pm$ 0,7		

Tabella 4. I livelli di espressione dei tre sottotipi recettoriali (S1P1-S1P2-S1P3) sono stati valutati in Real Time PCR dall'RNA totale estratto da una coltura primaria di cardiomiociti e dai cardiomioblasti H9C2 dopo essere stato retrotrascritto a cDNA e amplificato con coppie specifiche di primers. I valori in Ct sono stati riportati come media $\pm$ SEM di almeno tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato.

Un altro aspetto importante da sottolineare (riportato alcuni anni fa in letteratura da Nistri et al. 2012), è l'abilità della RLX nel promuovere la crescita e la maturazione dei cardiomiociti. Su questa premessa, è stato dimostrato che l'S1P è coinvolta nei meccanismi di differenziamento dei precursori muscolari cardiaci mediati dalla RLX. Infatti in **Figura 50 C-D**, si osserva una riduzione significativa (circa il 45%) dei livelli di espressione della connessina 43 (Cx43), proteina coinvolta nel processo di differenziamento del miocardio, in cardiomioblasti H9C2 trattati con l'inibitore di SphK1 (iSK, 5 μ M). Questo dato indica che la sintesi dello sfingolipide bioattivo sia necessaria per mediare questa azione pro-differenziante. Nel complesso questi risultati indicano che l'asse SphK1/S1P riveste un ruolo cruciale nel rimodellamento della ECM e nel promuovere il differenziamento dei precursori del muscolo cardiaco agendo come bersaglio dell'azione della RLX.

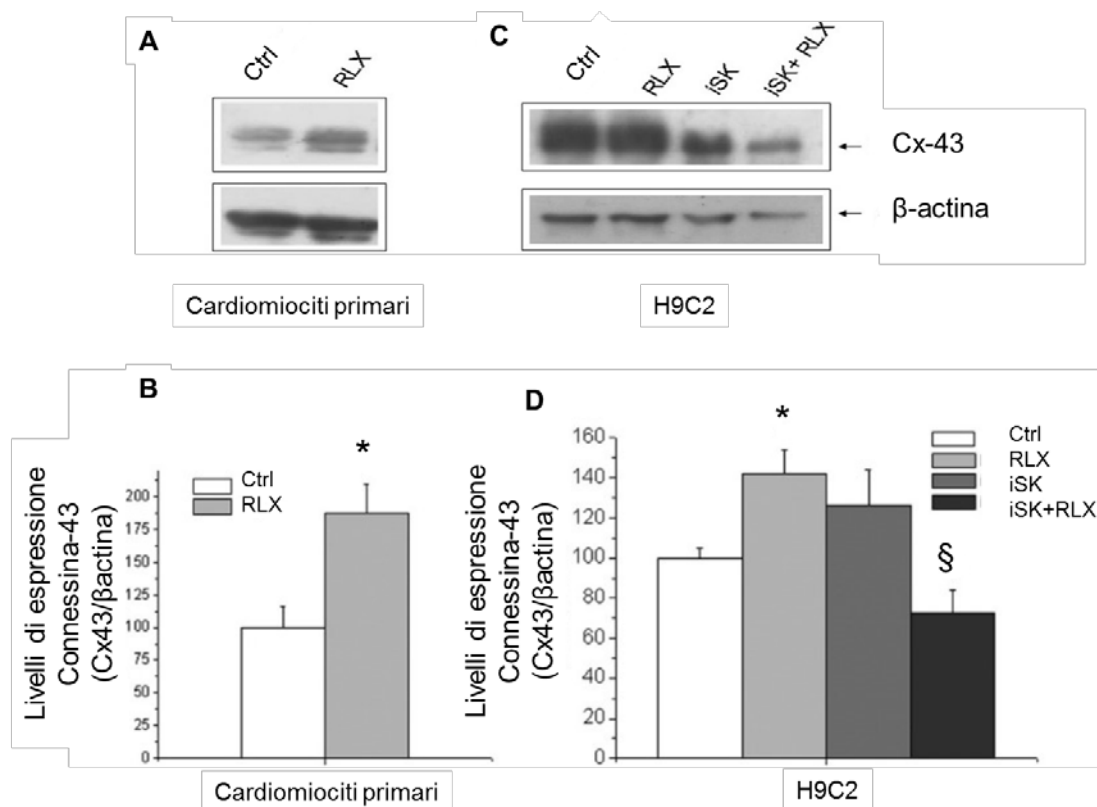


Figura 50. Effetto dell'inibizione dell'attività di SphK1 sui livelli di espressione della Connexina-43 (Cx43) in una coltura primaria di cardiomiociti e di cardiomioblasti H9C2. **(A)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (10 µg) ottenuti dai cardiomiociti primari non trattati (Ctrl) e trattati con RLX (50 ng/mL) per 24h usando un anticorpo specifico anti-Cx43. **(B)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β-actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 100 ed espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Le variazioni di espressione della Cx43 sono statisticamente significative (test t di Student, *P<0.05 vs Ctrl). **(C)** Western Blotting. L'analisi è stata condotta su lisati cellulari (25 µg) ottenuti dai cardiomioblasti H9C2 non trattati (Ctrl) e trattati per 30 min senza o con composto II (iSK, 5 µM) e successivamente con RLX (50 ng/mL) per 24h usando un anticorpo specifico anti-Cx43. **(D)** Analisi densitometrica. I risultati sono stati quantificati mediante analisi densitometrica delle bande d'interesse normalizzate sul contenuto di β-actina presente in ciascun campione, riportati in grafico come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo settata a 100 ed espressi come media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti. Le variazioni di espressione della Cx43 sono statisticamente significative (test t di Student, *P<0.05 vs Ctrl; §P<0.05 vs RLX).

DISCUSSIONE

L'atrofia del muscolo scheletrico, dal punto di vista biochimico e molecolare, è un processo molto complesso che richiede la trascrizione di geni specifici denominati *atrogeni*, i quali codificano per proteine deputate alla regolazione di sintesi e degradazione proteica (Anthony TG., 2016; Milan et al., 2015). Le due ubiquitina ligasi specificatamente espresse nel muscolo scheletrico, Atrogin-1/MAFbx, e MuRF1, hanno ruoli definiti: Atrogin-1/MAFbx preferenzialmente modula la degradazione proteica via proteasoma, mentre MuRF1 blocca la sintesi proteica nel muscolo in condizioni cataboliche (Bilodeau et al., 2016; Bodine et al., 2014; Cao et al., 2004, Koyama et al., 2008).

Alcune vie di segnalazione coinvolte nel controllo della loro espressione sono note: es. miostatina e il fattore di crescita trasformante β (Gumucio et al., 2013), ma restano ancora aspetti poco conosciuti come la regolazione da lipidi bioattivi come gli sfingolipidi (SLs). Pertanto, un'indagine più approfondita del ruolo di queste molecole sfingoidi potrebbe portare all'individuazione di nuovi potenziali bersagli farmacologici per prevenire la perdita di massa e funzione muscolare.

In letteratura, negli ultimi venti anni, è stato ampiamente indagato il metabolismo degli SLs, molecole bioattive in grado di modulare il destino di molti tipi cellulari, tra cui le cellule del muscolo scheletrico. Infatti, è stato dimostrato che Sph ed S1P modulano i canali del calcio (Formigli et al., 2002) e la contrazione dei miotubi (Bencini et al., 2003). Inoltre, in particolare S1P: 1) è responsabile dell'attivazione della PLD, coinvolta nel processo di differenziamento miogenico; 2) è in grado di stimolare regolatori cellulari come la PKC e RhoA (Meacci et al., 2001) coinvolti nel rimodellamento del citoscheletro (Formigli et al., 2005) e nella trasduzione del segnale in risposta a fattori di crescita; 3) favorisce la meccano-trasduzione attraverso la regolazione dei canali attivati da stretch, come TRPC1, cruciali per il processo

di differenziamento miogenico (Formigli et al., 2007; Formigli et al., 2009; Meacci et al., 2010; Meacci et al., 2012; Sassoli et al., 2011; Sbrana et al., 2008); 4) promuove la comunicazione tra cellule mediata da giunzioni gap formate da Cx-43 (Meacci et al., 2010; Squecco et al., 2006).

Secondo il modello del reostato, presentato nella parte introduttiva di questa tesi sperimentale, non è la concentrazione del singolo lipide bioattivo a stabilire il destino cellulare, ma in maniera determinante le variazioni del rapporto Sph+Cer/S1P+C1P e quindi la regolazione degli enzimi responsabili della fosforilazione di Sph e Cer, rispettivamente SphK e CerK.

In particolare, è stato dimostrato che l'asse SphK1/S1P è implicato nell'attivazione delle cellule muscolari staminali (cellule satelliti) residenti nel muscolo (Sassoli et al., 2014) e dei precursori mioblastici (Meacci et al., 2008), favorendone la proliferazione ed il differenziamento (Danieli-Betto et al., 2010; Fortier et al., 2013; Germinario et al., 2012; Nagata et al., 2006).

Al momento della stesura di questa tesi ci sono pochissimi dati in letteratura circa il coinvolgimento di S1P nell'atrofia muscolare scheletrica, eccetto le evidenze sperimentali riguardanti un'azione trofica che lo sfingolipide svolge per il muscolo scheletrico, attenuando i danni in una fibra muscolare isolata soggetta a denervazione (Ieronimakis et al., 2013; Zanin et al., 2008) o a contrazione eccentrica (Sassoli et al., 2011).

È stata inoltre osservata una correlazione tra l'aumento di Atrogin-1/MAFbx e l'incremento del contenuto intracellulare di ceramide in miotubi differenziati indotti all'atrofia dal trattamento con la citochina TNF- α (De Larichaudy et al., 2012). Niente è invece noto sul ruolo del sistema ceramide chinasi e C1P nella biologia della cellula muscolare scheletrica differenziata.

I dati ottenuti dall'analisi del contenuto intracellulare di SphK1, in biopsie di muscolo EDL di topi cachettici, ottenuti mediante inoculazione sottocutanea di un frammento del tumore solido carcinoma C26 (Gorselink et al., 2006) e, successivamente, in miotubi C2C12 indotti all'atrofia con Dexametazone (Kayali et

al.,1987; Marinovic et al., 2002; McElhinny et al.,2002), hanno dimostrato che all'aumento dei livelli d'espressione di Atrogin-1/MAFbx e alla diminuzione dei livelli di MuRF1 non si accompagna alcuna variazione del contenuto della proteina totale SphK1, mentre risulta ridotta l'espressione della forma attiva fosforilata nei miotubi atrofici. Un'ulteriore conferma del ruolo funzionale di questo enzima è data dalla riduzione del diametro cellulare e del numero di mionuclei in miotubi trattati con un inibitore specifico della SphK1.

L'aumento dei livelli di mRNA osservati nei tessuti EDL di topi cachettici e nelle cellule atrofiche rappresentano probabilmente un tentativo delle cellule muscolari di compensazione al danno, confermando l'importanza per il mantenimento del fenotipo differenziato del sistema SphK1/S1P e quindi dei livelli intracellulari di S1P.

La S1P, oltre a svolgere un ruolo come mediatore intracellulare, agisce anche come ligando di specifici recettori accoppiati a proteine G eterotrimeriche. I risultati della presente tesi sono di notevole interesse in questo ambito poiché identificano un ruolo specifico dei vari sottotipi recettoriali nel mantenimento del fenotipo differenziato/induzione del fenotipo atrofico.

Negli ultimi anni l'interesse per le vie di segnalazione a valle dei recettori S1PR è aumentato (Blaho et al., 2014; O'Sullivan et al., 2013; Mahajan-Thakur et al., 2015), soprattutto dopo che è stato identificato che molti tipi cellulari sono in grado di rilasciare S1P nel mezzo extracellulare grazie ad un trasportatore specifico, denominato Spns2 (Aoki et al., 2016). L'esistenza di questo trasportatore, appartenente alla famiglia degli ABC transporters, indica un ruolo della S1P sia come fattore paracrina che autocrino, aprendo nuove ed importanti prospettive per questo sfingolipide in qualità di regolatore dell'omeostasi tissutale.

Dati ottenuti in miotubi C2C12 marcati con ^3H Sfingosina indicano un aumento statisticamente significativo del contenuto di ^3H S1P nel terreno di coltura di miotubi differenziati rispetto a quello di mioblasti a confluenza ed un

aumento dei livelli di espressione di Spns2, sottolineando che, la S1P formata all'interno della cellula, viene rilasciata anche dalle cellule muscolari differenziate.

Questi dati suggeriscono un ruolo importante del rilascio di S1P durante la miogenesi, in linea con quanto precedentemente pubblicato sull'importanza dell'attività di SphK1 e della sintesi di S1P (Meacci et al., 2008) per il mantenimento del fenotipo della cellula muscolare differenziata. In maniera interessante, per la prima volta, si osserva che cellule indotte all'atrofia con Dexametazone mostrano una diminuzione a livello di mRNA e un aumento a livello proteico di Spns2, suggerendo che, in condizioni di atrofia, questa proteina sia regolata a livello post traduzionale per mantenerne alti i livelli e per garantire un maggior rilascio di S1P, la quale, di per sé, è presente in minor quantità nella cellula a causa della ridotta attività della SphK1.

Tuttavia, dall'analisi quantitativa dei livelli di mRNA codificante per Spns2 nel modello in vivo, sono emersi livelli di espressione leggermente più alti (ma non statisticamente significativi) nei tessuti cachettici (C26) rispetto ai controlli. La quantificazione di Spns2 a livello proteico in un numero elevato di animali è in corso.

I vari sottotipi recettoriali specifici per S1P sono i veri mediatori dell'azione autocrina/paracrina dello sfingolipide in molti tipi cellulari. Negli ultimi cinque anni sono stati molti i composti sviluppati dall'industria farmaceutica in grado di agire come agonisti/antagonisti dei vari sottotipi S1PR. In maniera interessante uno di loro, FTY720, è il farmaco in prima linea per la sclerosi multipla (La Mantia et al., 2016; Khatri 2016).

Tre sono i sottotipi recettoriali espressi sul sarcolemma delle fibre muscolari: S1P1, S1P2, S1P3 (Meacci et al., 2003). Gli altri due sottotipi, S1P4 e S1P5, risultano preferenzialmente espressi in tessuti specifici come il sistema nervoso e quello ematopoietico (Brinkmann, 2007; Chun et al., 2002; Delgado et al., 2016; Dillmann et al., 2016; Ebenezer et al., 2016; Mahajan-Thakur et al.,

2015; Pulkoski-Gross et al.,2015; Rosen et al., 2009 Taha et al.,2004). Ogni sottotipo recettoriale, associandosi a specifiche proteine G eterotrimeriche, porta all'attivazione o all'inibizione di vie di segnalazione distinte e quindi la risposta funzionale al ligando S1P dipende dai livelli relativi dei diversi sottotipi recettoriali espressi in quella determinata cellula e dal loro pattern di espressione.

I dati ottenuti mediante real time PCR, riportati in questa tesi, confermano che durante la miogenesi il rapporto di espressione dei tre diversi sottotipi recettoriali cambia, sottolineando i loro diversi ruoli funzionali: S1P1 ed S1P2 diminuiscono in modo statisticamente significativo durante il differenziamento, mentre S1P3 è il recettore più espresso nei miotubi.

Nelle cellule indotte all'atrofia, si osserva una diminuzione dei livelli di mRNA di S1P1, un aumento di S1P3 e nessuna significativa variazione di S1P2. L'analisi a livello proteico mostra una diminuzione dei livelli di S1P1 e di S1P3, mentre è risultato impossibile quantificare S1P2 per la mancanza di anticorpi specifici. Gli esperimenti condotti nei tessuti di topi cachettici sembrano non confermare queste variazioni, anche se una valutazione su un numero più elevato di animali e direttamente sulla fibra muscolare mediante immunofluorescenza sarebbe essenziale ed è attualmente in corso.

Il trattamento con agonisti/antagonisti del recettore S1P1 aggiungono ulteriori informazioni: l'agonista selettivo SEW2871 aumenta, mentre l'antagonista W146 riduce i livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx. Anche in presenza di Dexametasona, W146 determina una diminuzione dell'espressione dell'Ub-ligasi. Da questi dati emerge che l'inattivazione di S1P1 è protettiva, mentre la sua attivazione si accompagna all'induzione di Atrogin-1/MAFbx. Inoltre, dati preliminari non mostrati indicano che il trattamento di miotubi C2C12 con una miscela di agonisti/antagonisti, in grado di promuovere un'inibizione di S1P1/3 e un'attivazione di S1P2 (W146+VPC23019+S1P + Dexametasona), si accompagna sia

ad una diminuzione significativa della proteina p38 MAPK che ad un ridotto aumento di Atrogin-1/MAFbx.

Pertanto, la riduzione dei livelli di S1P1 in condizioni di atrofia è una risposta protettiva piuttosto che il risultato della degenerazione cellulare. Evidenze sperimentali hanno mostrato che 1) ERK1/2 è un effettore a valle del recettore S1P1; 2) ad una maggior attività di ERK1/2 si accompagna un'iperespressione di Atrogin-1/MAFbx in miotubi trattati con TNF α (Li et al., 2005); 3) l'inibizione farmacologica di ERK1/2 migliora la funzione muscolare in topi cachettici portatori di carcinoma C26 (Penna et al., 2010). Potremmo quindi suggerire che la riduzione dei livelli di espressione di S1P1 sia una strategia cellulare di sopravvivenza per ridurre l'attivazione di ERK1/2 (Kihara A. et al., 2007) responsabile dell'induzione di Atrogin-1/MAFbx.

Questo dato per la prima volta dimostra che un possibile approccio "farmacologico" per contrastare l'atrofia potrebbe basarsi sull'utilizzo di antagonisti di S1P1.

Per quel che riguarda il ruolo funzionale di S1P3, il trattamento con l'antagonista (VPC23019) prima di Dexa comporta una diminuzione significativa dei livelli dell'Ub-ligasi nei miotubi C2C12. Poichè il composto da noi utilizzato non inibisce in maniera selettiva solo l'azione di S1P3 ma anche quella del sottotipo recettoriale S1P1, la diminuzione dei livelli di Atrogin-1/MAFbx potrebbe essere causata da un'inibizione delle vie di segnalazione a valle di S1P1 più che da quelle di S1P3. Il silenziamento selettivo mediante siRNAs specifici per S1P3 è in corso e potrà confermare o meno il ruolo di questo recettore.

Pur non avendo indicazioni esatte sui livelli di espressione di S1P2 a livello di proteina, i dati mostrati in questa tesi suggeriscono una diminuzione dei livelli di mRNA nei topi cachettici e un ruolo funzionale opposto rispetto a S1P1. Infatti, il trattamento con l'antagonista competitivo di S1P2 (JTE-013) determina un aumento significativo di Atrogin-1/MAFbx, ma questo effetto non

si somma a quello indotto da Dexa, suggerendo che l'inibizione delle vie a valle di S1P2 sia responsabile almeno in parte del fenotipo atrofico indotto dal glucocorticoide.

In letteratura è stato mostrato che: 1) una downregolazione dell'espressione di S1P2 nei miotubi C2C12 comporta una diminuzione dell'efficienza di S1P a stimolare la PLD (Meacci et al., 2003); 2) l'attività della PLD è essenziale per il differenziamento miogenico (Komati et al., 2005) e per il mantenimento del fenotipo differenziato; 3) un'iperattivazione di PLD e di mTOR in cellule muscolari di ratto L6 o in modelli animali si accompagna ad ipertrofia (Mebarek et al., 2007, Jaafar et al., 2013). Pertanto l'inibizione della via a valle di S1P2, in opportune condizioni (es. trattamento con glucocorticoide), portando alla riduzione dell'attività della PLD potrebbe indurre la comparsa di un fenotipo atrofico. Questi dati nel loro complesso suggeriscono che agonisti di S1P2 potrebbero funzionare nel contrastare la comparsa del fenotipo atrofico.

A conferma di questo la somministrazione di una miscela di agonisti/antagonisti dei vari sottotipi recettoriali (SEW, JTE, CYM) che porta all'attivazione di S1P1 e S1P3 e all'inibizione delle vie a valle di S1P2 contribuisce all'induzione del fenotipo atrofico, mentre la somministrazione di una miscela di agonisti/antagonisti che inibisce S1P1 e S1P3 e attiva S1P2 (W146+VPC23019+S1P) previene la comparsa di atrofia.

Questi dati rappresentano la prima dimostrazione di un ruolo critico dell'espressione e delle vie di segnalazione a valle degli specifici sottotipi S1PR nel mantenimento del fenotipo muscolare differenziato.

Successivamente, la nostra indagine si è focalizzata sul sistema CerK/C1P. Nei topi cachettici così come nei miotubi indotti all'atrofia da Dexa, i livelli di espressione di CerK sono ridotti rispetto ai controlli, sottolineando una correlazione inversa tra i livelli di CerK e quelli di Atrogin-1/MAFbx ed una stretta corrispondenza tra il modello animale di cachessia ed il modello cellulare di atrofia. L'aumento dell'Ub-ligasi e la diminuzione del contenuto

intracellulare di CerK sono stati osservati anche in miotubi in cui è stata indotta atrofia attraverso l'attivazione di S1P1 con SEW2871 e l'inibizione di S1P2 con JTE-013.

La comparsa di un fenotipo atrofico, potrebbe essere la causa della riduzione dei livelli di espressione di CerK per attivazione del sistema Ub-proteasoma e induzione dell'espressione di Atrogin-1/MAFbx. Per indagare più a fondo la relazione tra la regolazione di Atrogin-1/MAFbx e l'asse CerK/C1P sono stati condotti esperimenti utilizzando la tecnologia del silenziamento genico. Da notare che la diminuzione dei livelli di espressione di CerK (mRNA e proteina), ottenuta elettroporando muscolo tibiale di topi cachettici con una miscela di tre plasmidi codificanti per short hairpin RNA disegnati in tre regioni diverse del trascritto dell'enzima, si accompagna ad un drastico aumento nel contenuto di Atrogin-1/MAFbx. Il silenziamento di CerK induce aumento dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx anche nel modello cellulare, confermando l'importanza dei livelli di espressione dell'enzima per il controllo dell'espressione dell'Ub-ligasi.

E' da notare che la correlazione inversa tra i livelli di CerK e quelli del marcatore di atrofia risulta esasperata laddove si instauri un fenotipo cachettico, suggerendo che il controllo dell'espressione di CerK sia un possibile meccanismo di induzione dell'espressione di Atrogin-1/MAFbx distinto da quello indotto dai normali processi patogenetici risultanti dall'inoculo del tumore adenocarcinoma C26.

Questi dati per la prima volta indicano che garantire livelli più alti di CerK potrebbe portare a contrastare l'insorgere di un fenotipo atrofico. Esperimenti volti alla misurazione del contenuto di ceramide/C1P e all' overespressione di CerK nelle varie condizioni di atrofia sono in corso. I risultati qui mostrati sono comunque in linea con quanto riportato in letteratura alcuni anni fa, secondo cui la riduzione dei livelli di ceramide limita marcatamente l'espressione di

Atrogin-1/MAFbx in cellule muscolari L6, indotte all'atrofia dal trattamento con il TNF- α (De Larichaudy et al., 2012).

Un ultimo aspetto affrontato nella presente tesi sperimentale riguarda il potenziale ruolo della S1P e degli sfingolipidi nelle strategie atte ad attenuare l'atrofia muscolare.

In una review pubblicata alcuni anni fa (Sakuma et al., 2012) sono state descritte alcune delle strategie terapeutiche più classiche utili a contrastare l'atrofia che compare nell'anziano (sarcopenia). Tra queste, sono stati menzionati gli inibitori della miostatina (Amirouche et al., 2009), la proteina Smad (Morissette et al., 2009; Trendelenburg et al., 2009), il coattivatore traccrizionale PGC-1 α (Peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α) capace di mantenere l'integrità delle fibre muscolari regolando positivamente la biogenesi mitocondriale (Holloszy 2008) e l'acido eicosapentaenoico (EPA) (Babcock et al. 2002; De Larichaudy et al., 2012; Singer et al., 2008).

A queste si è aggiunta negli ultimi anni la terapia cellulare. E' stato ormai ampiamente dimostrato che il trapianto di cellule staminali mesenchimali nei tessuti muscolari murini danneggiati ha un grande potenziale terapeutico (de la Garza-Rodea et al., 2011; Natsu et al., 2004; von Roth et al., 2012) e che questa efficacia sia principalmente attribuita alla loro abilità a secernere fattori in grado di promuovere meccanismi endogeni di riparazione tissutale in seguito a danno (Salem et al., 2010; Sassoli et al., 2012; Uccelli et al., 2008). La potenziale capacità di cellule mesenchimali stromali derivate da midollo osseo (BM-MSCs) di contrastare, attraverso la modulazione del metabolismo degli sfingolipidi, la degenerazione della cellula muscolare ci è sembrato un approccio interessante. Per questo motivo la ricerca si è spostata sul ruolo di S1P come mediatore della funzionalità delle BM-MSCs. Dati riassunti nella presente tesi dimostrano che il lipide bioattivo è rilasciato dalle BM-MSCs e che questo rilascio favorisce la proliferazione di mioblasti C2C12 e di cellule

satelliti (Sassoli et al.,2014). Analogamente l'incubazione di miotubi trattati con Dexametazone in presenza del mezzo condizionato delle BM-MSCs porta ad una riduzione significativa dei livelli di espressione di Atrogin-1/MAFbx.

Pertanto, l'S1P secreta dalle BM-MSCs agirebbe come un fattore paracrino importante per contrastare l'effetto dei composti inducenti atrofia, probabilmente attraverso l'attivazione di S1P2.

In questa tesi sono riportati anche dati relativi al ruolo di S1P in cellule muscolari cardiache neonatali murine ed in una coltura immortalizzata di cardiomioblasti di ratto H9C2, sottolineando l'importanza del metabolismo degli SLs e del sistema SphK1/S1P nell'espressione, rilascio e attività delle metalloproteasi (MMP) tramite l'azione dell'ormone peptidico relassina. Uno studio analogo sul ruolo di S1P e del recettore S1P1 nel rilascio della MMP-2 in cellule BM-MSCs è in corso di pubblicazione.

Infine, dati recentemente pubblicati e riassunti nell'elaborato mostrano come i polifenoli e, in particolar modo, i tocoferoli, componenti degli estratti di *Castanea sativa*, possano svolgere un ruolo protettivo nei confronti della comparsa di un fenotipo atrofico.

CONCLUSIONI

In maniera interessante e per la prima volta, i dati presentati in questa tesi sperimentale, mostrano un ruolo critico del metabolismo degli sfingolipidi nel mantenimento del fenotipo muscolare differenziato. In particolare, S1P svolgerebbe un'azione critica come fattore di sopravvivenza non solo in cellule satelliti, come riportato in letteratura, ma anche come fattore protettivo in grado di attenuare la comparsa di un fenotipo atrofico agendo sia come mediatore intracellulare (asse SphK1/S1P) che come ligando di specifici recettori (S1P1/S1P2).

Inoltre, sono state riportate evidenze specifiche per lo sviluppo di possibili strategie farmacologiche, in quanto sono stati identificati nei recettori S1P1 e S1P2 potenziali targets per l'attenuazione della comparsa di atrofia muscolare. Un dato del tutto originale è anche la dimostrazione del possibile coinvolgimento dell'asse CerK/C1P nell'induzione dell'espressione dell'Ub-ligasi Atrogin-1/MAFbx.

BIBLIOGRAFIA

Adada M., Canals D., Hannun Y. A., Obeid L. M. "Sphingosine-1-phosphate receptor 2" *FEBS Journal*, **280**, 6354-6366 (2013)

Almeida C.F., Fernandes S.A., Ribeiro Junior A.F., Keith Okamoto O., Vainzof M. "Muscle Satellite Cells: Exploring the Basic Biology to Rule Them". *Stem Cells Int.*, **1078686** doi: 10.1155/2016/1078686 (2016).

Amirouche A., Durieux A.C., Banzet S., Koulmann N., Bonnefoy R., Mouret C., Bigard X., Peinnequin A., Freyssen D. "Down-regulation of Akt/mammalian target of rapamycin signaling pathway in response to myostatin overexpression in skeletal muscle" *Endocrinology* **150**, 286–294 (2009).

Anthony T.G. "Mechanisms of protein balance in skeletal muscle" *Domest Anim Endocrinol.* **56**, Suppl:S23-32. doi: 10.1016/j.domaniend.2016.02.012. (2016)

Aoki M., Aoki H., Ramanathan R., Hait N. H., Takabe K. "Sphingosine-1- Phosphate Signaling in Immune Cells and Inflammation: Roles and Therapeutic Potential" *Hindawi Publishing Corporation*, Volume 2016, Article ID 8606878, 11 pages (2016).

Arana L., Gangoiti P., Ouro A., Trueba M., Gomez-Munoz A. "Ceramide and ceramide-1-phosphate in health and disease" *Lipids in Health and Disease* **9**, 15-26 (2010)

Arana L., Gangoiti P., Ouro A., Rivera I. G., Ordonez M., Trueba M., Lankalapalli R. S., Bittman R., Gomez-Muñoz A. "Generation of reactive oxygen species (ROS) is a key factor for stimulation of macrophage proliferation by ceramide 1-phosphate" *Experimental Cell Research*, **318(4)**, 350–360. (2012).

Atherton P.J., Greenhaff P.L., Phillips S.M., Bodine S.C., Adams C.M., Lang C.H. "Control of skeletal muscle atrophy in response to disuse: clinical/preclinical contentions and fallacies of evidence" *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **1**, 311(3):E594-604. doi: 10.1152/ajpendo.00257.2016. (2016).

Aulino P., Berardi E., Cardillo V.M., Rizzuto E., Perniconi B., Ramina C., Padula F., Spugnini E.P., Baldi A., Faiola F., Adamo S., Coletti D. "Molecular, cellular and physiological characterization of the cancer cachexia-inducing C26 colon carcinoma in mouse" *BMC Cancer* **10**, 363-377 (2010)

Agüera E., Castilla S., Luque E., Jimena I., Leiva-Cepas F., Ruz-Caracuel I., Peña J. "Muscular hypertrophy and atrophy in normal rats provoked by the administration of normal and denervated muscle extracts". *Histol Histopathol.* **(12)**, 1367-1379. doi: 10.14670/HH-11-776 (2016).

Aguilera-Romero A., Gehin C., Riezman H., "Sphingolipid homeostasis in the web of metabolic routes" *Biochimica et Biophysica Acta*, **1841(5)**, 647-656 (2013)

Aleman R., van Koppen C.J., Danneberg K., Ter Braak M., Meyer zu Heringdorf D. "Regulation and functional roles of sphingosine kinases" *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **374**, 413–428 (2007)

- Baar K., Nader G., Bodine S. "Resistance exercise, muscle loading/unloading and the control of muscle mass". *Essays Biochem.* **42**, 61-74 (2006)
- Babcock T.A., Helton W.S., Hong D., Espat N.J., "Omega-3 fatty acid lipid emulsion reduces LPS-stimulated macrophage TNF- α production" *Surgical Infections*, **3**,145–149 (2002)
- Bacurau A.V., Jannig P.R., de Moraes W.M., Cunha T.F., Medeiros A., Barberi L., Coelho M.A., Bacurau R.F., Ugrinowitsch C., Musarò A., Brum P.C. "Akt/mTOR pathway contributes to skeletal muscle anti-atrophic effect of aerobic exercise training in heart failure mice". *Int J Cardiol.* **1**, 214:137-147. doi: 10.1016/j.ijcard.2016.03.071.(2016)
- Bassi R., Anelli V., Giussani P., Tettamanti G., Viani P., Riboni L. "Sphingosine 1-phosphate is released by cerebellar astrocytes in response to bFGF and induces astrocyte proliferation through Gi protein- coupled receptors". *Glia* **53**, 621–630 (2006).
- Baumann C.W., Liu H.M., Thompson L.V. "Denervation-Induced Activation of the Ubiquitin-Proteasome System Reduces Skeletal Muscle Quantity Not Quality". *PLoS One.* **11(8)**, e0160839. doi: 10.1371/journal.pone.0160839. (2016)
- Becciolini L., Meacci E., Donati C., Cencetti F., Rapizzi E., Bruni P. "Sphingosine 1-phosphate inhibits cell migration in C2C12 myoblasts". *Biochim.Biophys. Acta.* **1761**, 43-51 (2006).
- Bencini C., Squecco R., Piperio C., Formigli L., Meacci E., Nosi D., Tiribilli B., Vassalli M., Quercioli F., Bruni P., Zecchi Orlandini S., Francini F. "Effects of sphingosine 1-phosphate on excitation-contraction coupling in mammalian skeletal muscle". *J Muscle Res Cell Motil* **24**, 539–554 (2003).
- Bilodeau P.A., Coyne E.S., Wing S.S. "The ubiquitin proteasome system in atrophying skeletal muscle: roles and regulation." *Am J Physiol Cell Physiol.* **311(3)**, C392-403. doi:10.1152/ajpcell.00125.2016 (2016).
- Blaho V.A., Hla T. "An update on the biology of sphingosine 1-phosphate receptors". *J Lipid Res.* **55(8)**, 1596-1608. doi: 10.1194/jlr.R046300 (2014).
- Blanc C.A., Grist J.J., Rosen H., Sears-Kraxberger I., Steward O., Lane T.E." Sphingosine-1-phosphate receptor antagonism enhances proliferation and migration of engrafted neural progenitor cells in a model of viral-induced demyelination." *Am J Pathol.* **185(10)**, 2819-2832. doi: 10.1016/j.ajpath.2015.06.009. (2015)
- Bodine S.C., Stitt T.N., Gonzales M., Kline W.O., Stover G.L., Bauerlein R., Ziotchenko E., Scrimgeour A., Lawrence J.C., Glass D.J., Yancopoulos G.D. "Akt/mTOR pathway is a crucial regulator of skeletal muscle hypertrophy and can prevent muscle atrophy in vivo" *Nat. Cell Biol.* **3**, 1014-1019 (2001).
- Bodine S.C., Baehr L.M. "Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogen-1". *Am J Physiol Endocrinol Metab.* **307(6)**, E469-484. doi: 10.1152/ajpendo.00204.2014 (2014).
- Bollinger C.R, Teichgräber V., Gulbins E. "Ceramide-enriched membrane domains" *Biochim. Biophys. Acta* **1746**, 284-294 (2005)
- Bonzon-Kulichenko E., Schwudke D., Gallardo N., Molto E., Fernandez-Agullo T., Shevchenko A., Andres A. "Central leptin regulates total ceramide content and sterol regulatory element

binding protein-1C proteolytic maturation in rat white adipose tissue" *Endocrinology* **150**, 169-178 (2009)

Bornancin F. "Ceramide kinase: the first decade" *Cell. Signal.* doi:10.1016/j.cellsig.2010.11.012 (2010)

Brand-Saberi B. "Genetic and epigenetic control of skeletal muscle development" *Ann. Anat.* **187**, 199-207 (2005)

Brinkmann V. "Sphingosine 1-phosphate receptors in health and disease: Mechanistic insights from gene deletion studies and reverse pharmacology". *Pharmacol Ther* **115**, 84-105 (2007).

Brocca L., Toniolo L., Reggiani C., Bottinelli R., Sandri M., Pellegrino M.A. "FoxO-dependent atrogenes vary among catabolic conditions and play a key role in muscle atrophy induced by hindlimb suspension." *J Physiol* doi: 10.1113/JP273097 (2016)

Buehrer B.M., Bell R.M. "Inhibition of sphingosine kinase in vitro and in platelets: implications for signal transduction pathways" *J. Biol. Chem.* **267**, 3154–3159 (1992)

Cagmat E.B., Guingab-Cagmat J.D., Vakulenko A.V., Hayes R.L., Anagli J. "Potential Use of Calpain Inhibitors as Brain Injury Therapy." n: Kobeissy FH, editor. *Brain Neurotrauma: Molecular, Neuropsychological, and Rehabilitation Aspects*. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis; **Chapter 40** (2015)

Cai D.S., Frantz J.D., Tawa N.E., Melendez P.A., Oh B.C., Lidov H.G.W., Hasselgren P.O., Frontera W.R., Lee J., Glass D.J., Shoelson S.E. "IKK beta/NF-kappa B activation causes severe muscle wasting in mice" *Cell* **119**, 285-298 (2004)

Calise S., Blescia S., Cencetti F., Bernacchioni C., Donati C., Bruni P. "Sphingosine 1-phosphate stimulates proliferation and migration of satellite cells: role of S1P receptors" *Biochim. Biophys. Acta* **1823**, 439-450 (2012).

Cao P.R., Kim H.J., Lecker S.H. "Ubiquitin-protein ligases in muscle wasting". *Int J Biochem Cell Biol.* **37**(10), 2088-2097 (2005).

Cassano M., Quattrocchi M., Crippa S., Perini I., Ronzoni F., Sampaolesi M. "Cellular mechanisms and local progenitor activation to regulate skeletal muscle mass" *J Muscle Res. Cell. Motil.* **30**, 243-253 (2009)

Chao Z., Zheng X.L., Sun R.P., Liu H.L., Huang L.L., Cao Z.X., Deng C.Y., Wang F. "Characterization of the Methylation Status of Pax7 and Myogenic Regulator Factors in Cell Myogenic Differentiation." *Asian-Australas J Anim Sci.* **29**(7), 1037-1043. doi: 10.5713/ajas.15.0459. (2016).

Chargé S.B., Rudnicki M.A. "Cellular and molecular regulation of muscle regeneration." *Physiol Rev.* **84**(1), 209-238. (2004).

Chipuk J. E., McStay G. P., Bharti A., Kuwana T., Clarke C. J., Siskind L. J., Obeid L. M., Green D. R. "Sphingolipid metabolism cooperates with BAK and BAX to promote the mitochondrial pathway of apoptosis" *Cell*, **148**, 988–1000 (2012).

Chun J., Goetz E.J., Hla T., Igarashi Y., Lynch K.R., Moolenaar W., Pyne S., Tigyi G. "International Union of Pharmacology. XXXIV. Lysophospholipid receptor nomenclature". *Pharmacol. Rev.* **54**, 265-269 (2002).

Chun J., Hla T., Lynch K.R., Spiegel S., Moolenaar W.H." International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXVIII. Lysophospholipid receptor nomenclature." *Pharmacol Rev.* **62(4)**, 579-587. doi: 10.1124/pr.110.003111. Review. (2010)

Cohen S., Nathan J.A., Goldberg A.L. "Muscle wasting in disease: molecular mechanisms and promising therapies".*Nat Rev Drug Discov.* **14(1)**, 58-74. doi: 10.1038/nrd4467 (2015).

Costamagna D., Costelli P., Sampaolesi M., Penna F. "Role of Inflammation in Muscle Homeostasis and Myogenesis" *Mediators of Inflammation* Article ID 805172, 14 pages <http://dx.doi.org/10.1155/2015/805172> (2015)

Costamagna D., Berardi E., Ceccarelli G., Sampaolesi M. "Adult Stem Cells and Skeletal Muscle Regeneration" *Curr Gene Ther.* **15(4)**, 348-363 (2015).

Cowart L.A. "A novel role for sphingolipid metabolism in oxidant-mediated skeletal muscle fatigue" *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **299**, C549–C551(2010)

Cruz-Jentoft A.J., Baeyens J.P., Bauer J.M., Boirie Y., Cederholm T., Landi F., Martin F.C., Michel J.P., Rolland Y., Schneider S.M., Topinková E., Vandewoude M., Zamboni M., European Working Group on Sarcopenia in Older People. "Sarcopenia: European consensus on definition and diagnosis: Report of the European Working Group on Sarcopenia in Older People". *Age Ageing.* **39**, 412–23 (2010).

D'Andrea P., Civita D., Cok M., Ulloa Severino L., Vita F., Scaini D., Casalis L., Lorenzon P., Donati I., Bandiera A. "Myoblast adhesion, proliferation and differentiation on human elastin-like polypeptide (HELP) hydrogels." *J Appl Biomater Funct Mater* **26**,0. doi: 10.5301/jabfm.5000331.(2016)

Danieli-Betto D., Peron S., Germinario E., Zanin M., Sorci G., Franzoso S., Sandonà D., Betto R. "Sphingosine 1-phosphate signaling is involved in skeletal muscle regeneration". *Am J Physiol Cell Physiol* **298**, C550–558. doi: 10.1152/ajpcell.00072.2009 (2010).

Das M., Sundell I.B., Koka P.S. "Adult mesenchymal stem cells and their potency in the cell-based therapy". *J Stem Cells* **8**, 1–16 (2013).

Dedkov E.I., Borisov A.B., Carlson B.M. "Dynamics of postdenervation atrophy of young and old skeletal muscles: differential responses of fiber types and muscle types". *J Gerontol A Biol Sci Med Sci.* **58**, 984–91 (2003).

Dehoux M.J.M., van Beneden R.P., Fernandez-Celemin L., Lause P.L., Thissen J.P.M. "Induction of MAFbx and MuRF ubiquitin ligase mRNAs in rat skeletal muscle after LPS injection" *FEBS Lett.* **544**, 214-217 (2003)

De la Garza-Rodea A.S., van der Velde I., Boersma H., Gonçalves M.A., van Bekkum D.W., de Vries AA., Knaän-Shanzer S. "Long-term contribution of human bone marrow mesenchymal stromal cells to skeletal muscle regeneration in mice". *Cell Transplant.* **20**, 217–231. doi: 10.3727/096368910X522117 (2011).

De Larichaudy J., Zufferli A., Serra F., Isidori A.M, Naro F., Dessalle K., Desgeorges M., Piraud M., Cheillan D., Vidal H., Lefai E., Némot G."TNF- α and tumor-induced skeletal muscle atrophy involves sphingolipid metabolism" *Skeletal Muscle* **2,2** (2012)

Delgado A., Martínez-Castro M. "Therapeutic Potential of the Modulation of Sphingosine-1-Phosphate Receptors" *Curr Med Chem.* **23(3)**, 242-64 (2016).

Desgeorges M.M., Devillard X., Toutain J., Divoux D., Castells J., Bernaudin M., Touzani O., Freyssen D.G. "Molecular mechanisms of skeletal muscle atrophy in a mouse model of cerebral ischemia." *Stroke* **46(6)**, 1673-1680. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.008574.(2015)

Dillmann C., Ringel C., Ringleb J., Mora J., Olesch C., Fink A.F., Roberts E., Brüne B., Weigert A. "S1PR4 Signaling Attenuates ILT 7 Internalization To Limit IFN- α Production by Human Plasmacytoid Dendritic Cells." *J Immunol.* **196(4)**, 1579-1590. doi: 10.4049/jimmunol.1403168 (2016).

Donati C., Meacci E., Nuti F., Becciolini L., Farnararo M., Bruni P. "Sphingosine 1-phosphate regulates myogenic differentiation: a major role for S1P2 receptor" *FASEB J.* doi:10.1096/fj.04-1780fje (2004)

Drummond M.J., Dreyer H.C., Fry C.S., Glynn E.L., Rasmussen B.B. "Nutritional and contractile regulation of human skeletal muscle protein synthesis and mTORC1 signaling" *J. Appl. Physiol* **106**, 1374-1384 (2009).

Du J., Wang X.N., Miereles C., Bailey J.L., Debigare R., Zheng B., Price S.R., Mitch W.E. "Activation of caspase-3 is an initial step triggering accelerated muscle proteolysis in catabolic conditions" *J. Clin. Invest.* **113**, 115-123 (2004)

Ebenezer D.L., Fu P., Natarajan V. "Targeting sphingosine-1-phosphate signaling in lung diseases". *Pharmacol Ther.* **16**, S0163-7258 30164-4. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.09.008 Review (2016).

Eley H.L., Skipworth R.J.E., Deans D.A.C., Fearon K.C., Tisdale M.J. "Increased expression of phosphorylated forms of RNA-dependent protein kinase and eukaryotic initiation factor 2 α may signal skeletal muscle atrophy in weight-losing cancer patients" *Br. J. Cancer* **98**, 443-449 (2008)

Evans W.J., Morley J.E., Argiles J. et al. "Cachexia: a new definition" *Clin. Nutr.* **27**, 793-799 (2008)

Fanzani A., Conraads V.M., Penna F., Martinet W. "Molecular and cellular mechanisms of skeletal muscle atrophy: an update." *J Cachexia Sarcopenia Muscle.* **3(3)**, 163-179. doi: 10.1007/s13539-012-0074-6.(2012).

Fayyaz S., Henkel J., Japtok L., Krämer S., Damm G., Seehofer D., Püschel G.P., Kleuser B. "Involvement of sphingosine 1-phosphate in palmitate-induced insulin resistance of hepatocytes via the **S1P2** receptor subtype". *Diabetologia* **57(2)**, 373-382. doi: 10.1007/s00125-013-3123-6 (2014).

Formigli L., Francini F., Meacci E., Vassalli M., Nosi D., Quercioli F., Tiribilli B., Bencini C., Piperio C., Bruni P., Orlandini S.Z. "Sphingosine 1-phosphate induces Ca²⁺ transients and cytoskeletal rearrangement in C2C12 myoblastic cells". *Am J Physiol Cell Physiol.* **282(6)**, C1361-1373 (2002).

Formigli L., Meacci E., Sassoli C., Chellini F., Giannini R., Quercioli F., Tiribilli B., Squecco R., Bruni P., Francini F., Zecchi-Orlandini S. "Sphingosine 1-phosphate induces cytoskeletal reorganization in C2C12 myoblasts: physiological relevance for stress fibres in the modulation of ion current through stretch-activated channels". *J Cell Sci.* **15**, 118:1161-1171 (2005).

Formigli L., Perna A.M., Meacci E., Francini F., Zecchi-Orlandini S. "Paracrine effects of transplanted myoblasts and relaxin on post-infarction heart remodelling". *J Cell Mol Med.* **11**, 1087–1100. (2007)

Formigli L., Meacci E., Sassoli C., Squecco R., Nosi D., Chellini F., Naro F., Francini F., Zecchi-Orlandini S. "Cytoskeleton/stretch-activated ion channel interaction regulates myogenic differentiation of skeletal myoblasts" *J Cell Physiol.* **211**, 296–306 (2007).

Formigli L., Sassoli C., Squecco R., Bini F., Martinesi M., Chellini F., Luciani G., Sbrana F., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Meacci E. "Regulation of transient receptor potential canonical channel 1 (TRPC1) by sphingosine 1-phosphate in C2C12 myoblasts and its relevance for a role of mechanotransduction in skeletal muscle differentiation". *J Cell Sci.* **122**, 1322–1333. doi: 10.1242/jcs.035402. (2009).

Formigli L., Paternostro F., Tani A., Mirabella C., Quattrini Li A., Nosi D., D'Asta F., Saccardi R., Mazzanti B., Lo Russo G., Zecchi-Orlandini S. "MSCs seeded on bioengineered scaffolds improve skin wound healing in rats". *Wound Repair Regen.* **23**, 115–23. doi: 10.1111/wrr.12251. (2015).

Fortier M., Figeac N., White R.B., Knopp P., Zammit P.S. "Sphingosine-1-phosphate receptor 3 influences cell cycle progression in muscle satellite cells". *Dev Biol* **382**, 504–516. doi: 10.1016/j.ydbio.2013.07.006. (2013).

Fрати A., Landi D., Marinelli C., Gianni G., Fontana L., Migliorini M., **Pierucci F.**, Garcia-Gil M., Meacci E. "Nutraceutical properties of tuscany chestnut flours: beneficial effects on skeletal muscle atrophy". *Food Funct.* **5**, 2870–2882. doi: 10.1039/c4fo00353e. (2014).

Fрати A., Ricci B., Pierucci F., Nistri S., Bani D., Meacci E. "Role of sphingosine kinase/s1p axis in ecm-remodeling of cardiac cells elicited by the hormone relaxin". *Mol Endocrinol* **29(1)**, 53–67. doi: 10.1210/me.2014-1201 (2015)

French K.J., Schreengost R.S., Lee B.D., Zhuang Y., Smith S.N., Eberly J.L., Yun J.K., Smith C.D. "Discovery and evaluation of inhibitors of human sphingosine kinase" *Cancer Res.* **63**, 5962–5969 (2003).

Futerman A. H., Hannun Y. A. "The complex life of simple sphingolipids" *EMBO reports*, **5**, 777–782 (2004).

Gangoiti P., Granado M.H., Arana L., Ouro A., Gomez-Muñoz A., "Involvement of nitric oxide in the promotion of cell survival by ceramide 1-phosphate" *FEBS Letters*, **582(15)**, 2263–2269 (2008).

Gaveglione V.L., Pasquaré S.J., Giusto N.M. "Phosphatidic acid metabolism in rat liver cell nuclei." *FEBS Lett.* **2**; **587(7)**, 950–956. doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.074. (2013)

Germinario E., Peron S., Toniolo L., Betto R., Cencetti F., Donati C., Bruni P., Danielli-Betto D. "S1P2 receptor promotes mouse skeletal muscle regeneration". *J Appl Physiol* **113**, 707–713. doi:10.1152/jappphysiol.00300 (2012).

Gomes M.D., Lecker S.H., Jagoe R.T., Navon A., Goldberg A.L. "Atrogin-1, a muscle-specific F-box protein highly expressed during muscle atrophy." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14440–14445. (2001).

Gomez-Muñoz A., Presa N., Gomez-Larrauri A., Rivera I.G., Trueba M., Ordoñez M. "Control of inflammatory responses by ceramide, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate." *Prog Lipid Res.* **61**, 51-62. doi: 10.1016/j.plipres.2015.09.002. Review. (2016).

Gorselink M., Vaessen S.F.C., Van Der Flier L.G., Leenders I., Kegler D., Caldenhoven E., Van Der Beek E., Van Helvoort A. "Mass-dependent decline of skeletal muscle function in cancer cachexia" *Muscle Nerve* **33**, 691-693 (2006).

Graf C., Rovina P., Bornancin F. "A secondary assay for ceramide kinase inhibitors based on cell growth inhibition by short-chain ceramides." *Anal Biochem.* **384(1)**, 166-169. doi: 10.1016/j.ab.2008.09.008 (2008).

Gumucio J.P., Mendias C.L. "Atrogin-1, MuRF-1, and sarcopenia". *Endocrine* **43(1)**, 12-21. doi: 10.1007/s12020-012-9751-7. Review (2013).

Guttridge D.C., Mayo M.W., Madrid L.V., Wang C.Y., Baldwin A.S. Jr. "Nf-kappaB-induced loss of MyoD messenger RNA: possible role in muscle decay and cachexia" *Science* **289**, 2363-2366 (2000)

Hait N.C., Allegood J., Maceyka M., Strub G.M., Harikumar K.B., Singh S.K., Luo C., Marmorstein R., Kordula T., Milstien S., Spiegel S. "Regulation of histone acetylation in the nucleus by sphingosine-1-phosphate". *Science* **325**, 1254-1257 (2009).

Hannun Y.A., Loomis C.R., Merrill Jr. A.H., Bell R.M. "Sphingosine inhibition of protein kinase C activity and of phorbol dibutyrate binding in vitro and in human platelets" *J. Biol. Chem.*, **261(27)**, 12604-12609 (1986).

Hannun Y.A., Obeid L.M. "Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids". *Nature Rev. Mol. Cell Biol.* **9**, 139-150. (2008).

Hartmann D., Lucks J., Fuchs S., Schiffmann S., Schreiber Y., Ferreirós N., Merckens J., Marschalek R., Geisslinger G., Grösch S. "Long chain ceramides and very long chain ceramides have opposite effects on human breast and colon cancer cell growth". *Int J Biochem Cell Biol.* **44(4)**, 620-628. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.019. (2012)

Holloszy J.O. "Regulation by exercise of skeletal muscle" *Journal of Physiology and Pharmacology*, **59**, 5-18 (2008)

Hsu A., Zhang W., Lee J. F., An J., Ekambaram P., Liu J., Honn K. V., Klinge C. M., Lee M. J. "Sphingosine-1-phosphate receptor-3 signaling up-regulates epidermal growth factor receptor and enhances epidermal growth factor receptor-mediated carcinogenic activities in cultured lung adenocarcinoma cells" *International Journal of Oncology*, **40(5)**, 1619-1626 (2012).

Huang J., Zhu X. "The molecular mechanisms of calpains action on skeletal muscle atrophy." *Physiol Res.* **65(4)**, 547-560.(2016).

Huwiler A., Pfeilschifter J. "New players on the center stage: Sphingosine 1-phosphate and its receptors as drug targets". *Biochem. Pharmacol.* **75**, 1893-1900 (2008)

Huxley A.F. "Cross-bridge action: present views, prospects, and unknowns". *J Biomech.* **33**, 1189-1195 (2000).

Ieronimakis N., Pantoja M., Hays A.L., Dosey T.L., Qi J., Fischer K.A., Hoofnagle A.N., Sadilek M., Chamberlain J.S., Ruohola-Baker H., Reyes M. "Increased sphingosine-1-phosphate

improves_muscle_regeneration_in acutely injured mdx mice." *Skelet Muscle*. **3(1)**, 20. doi: 10.1186/2044-5040-3-20 (2013).

Jaafar R., Larichaudy J., Chanon S., Euthine V., Durand C., Naro F., Bertolino P., Vidal H., Lefai E., Némóz G. "Phospholipase D regulates the size of skeletal muscle cells through the activation of mTOR signaling". *Cell Communication and Signaling* **11**, 55 (2013).

Johns N., Stephens N.A., Fearon K.C."Muscle wasting in cancer". *Int J Biochem Cell Biol*. **45(10)**, 2215-2229. doi: 10.1016/j.biocel.2013.05.032 (2013).

Kamei Y., Miura S., Suzuki M., Kai Y., Mizukami J., Taniguchi T., Mochida K., Hata T., Matsuda J., Aburatani H., Nishino I., Ezaki O. "Skeletal muscle FOXO1 (FKHR) transgenic mice have less skeletal muscle mass, down-regulated type I (slow twitch/red muscle) fiber genes, and impaired glycemic control" *J. Biol. Chem*. **279**, 41114-41123 (2004)

Kandarian S.C., Jackman R.W. "Intracellular signaling during skeletal muscle atrophy" *Muscle Nerve* **33**, 155-165 (2006).

Kanemaru S., Kitani Y., Ohno S., Shigemoto T., Kojima T., Ishikawa S., Mizuta M., Hirano S., Nakamura T., Dezawa M. "Functional regeneration of laryngeal muscle using bone marrow-derived stromal cells" *Laryngoscope* **123**, 2728–2734. doi: 10.1002/lary.24060 (2013).

Kayali A.G., Young V.R., Goodman MN. "Sensitivity of myofibrillar proteins to glucocorticoid-induced muscle proteolysis". *Am J Physiol* **252**, E621-626 (1987)

Khatri BO. "Fingolimod in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: long-term experience and an update on the clinical evidence". *Ther Adv Neurol Disord*. **9(2)**, 130-147. doi:10.1177/1756285616628766 Review.(2016)

Kihara A., Mitsutake S., Mizutani Y., Igarashi Y. "Metabolism and biological functions of two phosphorylated sphingolipids, sphingosine 1-phosphate and ceramide 1-phosphate". *Prog. Lipid. Res*. **46**,126-144 (2007).

Kim R.H., Takabe K., Milstien S., Spiegel S. "Export and functions of sphingosine-1-phosphate". *Biochim Biophys Acta* **1791(7)**, 692-696 (2009).

Kim M.J., Kim Z.H., Kim S.M., Choi Y.S. "Conditioned medium derived from umbilical cord mesenchymal stem cells regenerates atrophied muscles". *Tissue Cell*. **S0040-8166(16)**, 30082-30089. doi: 10.1016/j.tice.2016.06.010 (2016).

Komati H., Naro F., Mebarek S., De Arcangelis V., Adamo S., Lagarde M., Prigent A.F., Nemoz G. "Phospholipase D Is Involved in Myogenic Differentiation through Remodeling of Actin Cytoskeleton" *Molecular Biology of the Cell* **16**, 1232–1244 (2005).

Konishi M., Ishida J., von Haehling S., Anker S.D., Springer J. "Nutrition in cachexia: from bench to bedside." *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. **7(2)**,107-109. doi: 10.1002/jcsm.12111.(2016)

Koyama S., Hata S., Witt C.C., Ono Y., Lerche S., Ojima K., Chiba T., Doi N., Kitamura F., Tanaka K., Abe K., Witt S.H., Rybin V., Gasch A., Franz T., Labeit S., Sorimachi H. "Muscle RING-finger protein-1 (MuRF1) as a connettor of muscle energy metabolism and protein synthesis" *J. Mol. Biol*. **376**, 1224-1236 (2008).

Kumada S., Mitsutake S., Inagaki Y., Mitsunaga S., Tsuchikawa H., Katsumura S., Igarashi Y.

"Kinetics of the ceramide kinase inhibitor K1, a suppressor of mast-cell activation" *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **71**, 2581-2584 (2007).

Ladner K.J., Caligiuri M.A., Guttridge D.C. "Tumor necrosis factor-regulated biphasic activation of NFkappa B is required for cytokine-induced loss of skeletal muscle gene products" *J. Biol. Chem.* **278**, 22942303 (2003)

Lagirand-Cantaloube J., Offner N., Csibi A., Leibovitch M.P., Batonnet-Pichon S., Tintignac L.A., Segura C.T., Leibovitch S.A. "The initiation factor eIF3-f is a major target for Atrogin-1/MAFbx function in skeletal muscle atrophy." *EMBO J.* **27**, 1266-1276 (2008)

La Mantia L., Tramacere I., Firwana B., Pacchetti I., Palumbo R., Filippini G. "Fingolimod for relapsing-remitting multiple sclerosis". *Cochrane Database Syst Rev.* **9**;4, CD009371. doi: 10.1002/14651858.CD009371.pub2. Review (2016)

Lang C.H., Huber D., Frost R.A. "Burn-induced increase in atrogin-1 and MuRF1 in skeletal muscle in glucocorticoid independent but downregulated by IGF-1" *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* **292**, R328-R336 (2007)

Lecker S.H., Jagoe R.T., Gilbert A., Gomes M., Baracos V., Bailey J., Price S.R., Mitch W.E., Goldberg A.L. "Multiple types of skeletal muscle atrophy involve a common program on changes in gene expression" *FASEB J.* **18**, 39-51 (2004)

Lee M.J., Van Brocklyn J.R., Thangada S., Liu C.H., Hand A.R., Menzeleev R., Spiegel S., Hla T. "Sphingosine-1-phosphate as a ligand for the G protein-coupled receptor EDG-1". *Science* **279**, 1552-1555 (1998).

Lee R.H., Oh J.Y., Choi H., Bazhanov N. "Therapeutic factors secreted by mesenchymal stromal cells and tissue repair". *J Cell Biochem* **112**, 3073–3078 doi: 10.1002/jcb.23250 (2011).

Li P.Y., Chen Y., John J., Moylan J., Jin B., Mann D.L., Reid M.B. "TNF- α acts via p38 MAPK to stimulate expression of the ubiquitin ligase atrogin1/MAFbx in skeletal muscle." *FASEB J.* **19**(3), 362–370. doi:10.1096/fj.04-2364com.(2005)

Liu H., Sugiura M., Nava V.E., Edsall L.C., Kono K., Poulton S., Milstien S., Kohama T., Spiegel S. "Molecular cloning and functional characterization of a novel mammalian sphingosine kinase type 2 isoform" *J. Biol. Chem.* **275**, 19513-19520 (2000)

Liu C.M., Yang Z., Liu C.W., Wang R., Tien P., Dale R., Sun L.Q. "Effect of RNA oligonucleotide targeting FOXO-1 on muscle growth in normal and cancer cachexia mice" *Cancer Gene Ther.* **14**, 945952 (2007)

Liu W., Lan T., Xie X., Huang K., Peng J., Huang J., Shen X., Liu P., Huang H. "S1P2 receptor mediates sphingosine-1-phosphate-induced fibronectin expression via MAPK signaling pathway in mesangial cells under high glucose condition". *Exp Cell Res.* **318**(8), 936-943. doi: 10.1016/j.yexcr.2012.02.020 (2012).

Livak K.J and Schmittgen T.D. "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method". *Methods* **25**, 402-408 (2001).

Loh K.C., Leong W.I., Carlson M.E., Oskouian B., Kumar A., Fyrst H., Zhang M., Proia R.L., Hoffman E.P., Saba J.D. "Sphingosine-1-phosphate enhances satellite cell activation in dystrophic muscles through a S1PR2/STAT3 signaling pathway". *PLoS One* **7**(5), e37218. doi: 10.1371/journal.pone.0037218 (2012).

Mahajan-Thakur S., Böhm A., Jedlitschky G., Schrör K., Rauch B.H. "Sphingosine-1-Phosphate and Its Receptors: A Mutual Link between Blood Coagulation and Inflammation". *Mediators Inflamm.* 2015;**831059**. doi: 10.1155/2015/831059. Review (2015).

Malavaki C.J., Sakkas G.K., Mitrou G.I., Kalyva A., Stefanidis I., Myburgh K.H., Karatzaferi C. "Skeletal muscle atrophy: disease-induced mechanisms may mask disuse atrophy" *J Muscle Res Cell Motil.* **36(6)**,405-421. doi: 10.1007/s10974-015-9439-8. Review. (2015).

Marinovic A., Zheng B., Mitch W., Price S. "Ubiquitin (UbC) expression in muscle cells is increased by glucocorticoids through a mechanism involving Sp1 and MEK1" *J Biol Chem* **277**, 16673-16681 (2002).

Mayol K., Biajoux V., Marvel J., Balabanian K., Walzer T. "Sequential desensitization of CXCR4 and S1P5 controls natural killer cell trafficking". *Blood*, **118**, 4863–4871 (2011)

McElhinny A., Kakinuma K., Sorimachi H., Labeit S., Gregorio C. "Muscle-specific RING finger-1 interacts with titin to regulate sarcomeric M-line and thick filament structure and may have nuclear functions via its interaction with glucocorticoid modulatory element binding protein-1". *J Cell Biol* **157**, 125-136 (2002).

Meacci E., Donati C., Cencetti F., Oka T., Komuro I., Farnararo M., Bruni P. "Dual regulation of sphingosine 1-phosphate-induced phospholipase D activity through RhoA and protein kinase C- α in C2C12 myoblasts". *Cell Signal.* **13(8)**, 593-598 (2001).

Meacci, E., Cencetti, F., Donati, C., Nuti, F., Farnararo, M., Kohno, T., Igarashi Y., Bruni P. "Down-regulation of EDG5/S1P2 during myogenic differentiation results in the specific uncoupling of sphingosine 1-phosphate signalling to phospholipase D". *Biochim. Biophys. Acta* **1633**, 133–142. doi: 10.1016/S1388-1981(03)00106-9 (2003).

Meacci E., Formigli L., Sassoli C., Chellini F., Giannini R., Quercioli F., Tiribilli B., Squecco R., Bruni P., Francini F., Zecchi-Orlandini S. "Sphingosine 1-phosphate induces cytoskeletal reorganization in C2C12 myoblasts: physiological relevance for stress fibres in the modulation of ion current through stretch-activated channels". *J Cell Sci.* **118**, 1161-1171 (2005).

Meacci E., Nuti F., Donati C., Cencetti F., Farnararo M., Bruni P. "Sphingosine kinase activity is required for myogenic differentiation of C2C12 myoblasts" *J. Cell. Physiol.* **214**, 210-220 (2008).

Meacci E, Bini F., Sassoli C., Martinesi M., Squecco R., Chellini F., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L. "Functional interaction between TRPC1 channel and connexin-43 protein: a novel pathway underlying S1P action on skeletal myogenesis" **67**, 4269–4285 (2010).

Meacci E., Bini F., Battistini C. "Sphingosine-1-phosphate signaling in skeletal muscle cells" *Methods Mol Biol*, **874**, 155-165. doi: 10.1007/978-1-61779-800-9_12. (2012).

Means C.K. Xiao C.Y., Li Z., Zhang T., Omens J.H., Ishii I., Chun J., Brown J.H. "Sphingosine 1-phosphate S1P2 and S1P3 receptor-mediated Akt activation protects against in vivo myocardial ischemia-reperfusion injury" *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **292(6)**, H2944-2951. (2007)

Mebarek S., Komati H., Naro F., Zeiller C., Alvisi M., Lagarde M., Prigent A.F., Nemoz G. "Inhibition of de novo ceramide synthesis upregulates phospholipase D and enhances myogenic differentiation" *J. Cell.Sci.* **120**, 407-416 (2007).

Mencarelli C., Martinez-Martinez P. "Ceramide function in the brain: when a slight tilt is enough".*Cellular and Molecular Life Sciences*, **70**, 181–203. (2013)

Menconi M., Gonnella P., Petkova V., Lecker S., Hasselgren P.O. "Dexamethasone and corticosterone induce similar, but not identical, muscle wasting responses in cultured L6 and C2C12 myotubes" *J. Cell Biochem.* **105**, 353-364 (2008).

Milan G., Romanello V., Pescatore F., Armani A., Paik J.H., Frasson L., Seydel A., Zhao J., Abraham R., Goldberg A.L., Blaauw B., DePinho R.A., Sandri M. "Regulation of autophagy and the ubiquitin-proteasome system by the FoxO transcriptional network during muscle atrophy". *Nat Commun.* **10**, 6:6670. doi: 10.1038/ncomms7670 (2015).

Mirzoev T.M., Tyganov S.A., Shenkman B.S."Akt-dependent and Akt-independent pathways are involved in protein synthesis activation during reloading of disused soleus muscle." *Muscle Nerve*. doi: 10.1002/mus.25235 (2016).

Mizugishi K., Yamashita T., Olivera A., Miller G.F., Spiegel S., Proia R.L. "Essential role for sphingosine kinases in neural and vascular development" *Mol. Cell. Biol.* **25**, 11113–11121 (2005)

Morales A., Lee H., Goni F.M., Kolesnick R., Fernandez-Checa J.C. "Sphingolipids and cell death" *Apoptosis* **12**, 923-939 (2007)

Morissette M.R., Cook S.A., Buranasombati C., Rosenberg M.A., Rosenzweig A. "Myostatin inhibits IGF1-induced myotube hypertrophy through Akt" *American Journal of Physiology, Cell Physiology*, **297**, C1124–C1132 (2009).

Murakami M., Ito H., Hagiwara K., Yoshida K., Sobue S., Ichihara M., Takagi A., Kojima T., Tanaka K.,Tamiya-Koizumi K., Kyogashima M., Suzuki M., Banno Y., Nozawa Y., Murate T. "ATRA inhibits ceramide kinase transcription in a human neuroblastoma cell line, SH-SY5Y cells: the role of COUPTF1" *J. Neurochem.* **112**, 511–520 (2010)

Murton A.J., Constantin D., Greenhaff P.L. "The involvement of the ubiquitin proteasome system in human skeletal muscle remodelling and atrophy" *Biochim. Biophys. Acta.* **1782**(12), 730-743. doi: 10.1016/j.bbadis.2008.10.011 (2008)

Nagata Y., Partridge T.A., Matsuda R., Zammit P.S. "Entry of muscle satellite cells into the cell cycle requires sphingolipid signaling" *J. Cell Biol.* **174**, 245-253 (2006).

Nagata Y., Kobayashi H., Umeda M., Ohta N., Kawashima S., Zammit P.S., Matsuda R. "Sphingomyelin levels in the plasma membrane correlate with the activation state of muscle satellite cells" *J Histochem Cytochem.* **54**, 375–384 (2006).

Nagata Y., Ohashi K., Wada E., Yuasa Y., Shiozuka M., Nonomura Y., Matsuda R. "Sphingosine-1-phosphate mediates epidermal growth factor-induced muscle satellite cell activation". *Exp Cell Res.* **326**(1),112-124. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.06.009. (2014)

Nakashima K., Ishida A., Ijiri D., Ohtsuka A. "Effect of dexamethasone on the expression of atrogin-1/MAFbx in chick skeletal muscle". *Anim Sci J.* **87**(3), 405-410. doi: 10.1111/asj.12437 (2016).

Natsu K., Ochi M., Mochizuki., Hachisuka H., Yanada S., Yasunaga Y. "Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibres". *Tissue Eng* **10**, 1093–1112 (2004).

Newton J., Lima S., Maceyka M., Spiegel S. "Revisiting the sphingolipid rheostat: evolving concepts in cancer therapy" *Experimental Cell Research*, **333**, 195-200. (2015)

Nikolova-Karakashian M.N., Reid M.B. "Sphingolipid Metabolism, Oxidant Signaling, and Contractile Function of Skeletal Muscle". *Antioxid. Redox Signal.* **15**, 2501–2517 doi: 10.1089/ars.2011.394 (2011).

Nishi T., Kobayashi N., Hisano Y., Kawahara A., Yamaguchi A. "Molecular and physiological functions of sphingosine 1-phosphate transporters". *Biochim Biophys Acta.* **1841(5)**, 759-765. doi: 10.1016/j.bbalip.2013.07.012 (2014).

Nistri S., Pini A., Sassoli C., Squecco R., Francini F., Formigli L., Bani D. "Relaxin promotes growth and maturation of mouse neonatal cardiomyocytes in vitro: clues for cardiac regeneration". *J Cell Mol Med.* **16**, 507–519 (2012).

Novgorodov A. S., El-Alwani M., Bielawski J., Obeid L. M., Gudz T. I. "Activation of sphingosine-1-phosphate receptor S1P5 inhibits oligodendrocyte progenitor migration". *FASEB Journal*, **21**, 1503–1514 (2007).

Oelkrug C., Horn K., Makert G.R., Schubert A. "Novel in vitro platform to investigate myotube atrophy". *Anticancer Res* **35(4)**, 2085-2091 (2015).

Olguin H.C., Olwin B.B. "Pax-7 up-regulation inhibits myogenesis and cell cycle progression in satellite cells: a potential mechanism for self-renewal" *Dev. Biol.* **275**, 375-388 (2004)

Ono Y., Saido T.C., Sorimachi H." Calpain research for drug discovery: challenges and potential." *Nat Rev Drug Discov.* doi: 10.1038/nrd.2016.212. (2016)

Osada M., Yatomi Y., Ohmori T., Ikeda H., Ozaki Y. "Enhancement of sphingosine 1-phosphate-induced migration of vascular endothelial cells and smooth muscle cells by an EDG-5 antagonist" *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **299**, 483-487 (2002).

O'Sullivan C., Dev K.K. "The structure and function of the S1P1 receptor". *Trends Pharmacol. Sci.* **34**, 401–412. doi: 10.1016/j.tips.2013.05.002 (2013).

Passey S.L., Hansen M.J., Bozinovski S., McDonald C.F., Holland A.E., Vlahos R. "Emerging therapies for the treatment of skeletal muscle wasting in chronic obstructive pulmonary disease". *Pharmacol Ther.* **166**, 56-70. doi: 10.1016/j.pharmthera.2016.06.013 (2016).

Pawlikowski B, Pulliam C, Betta ND, Kardon G, Olwin BB." Pervasive satellite cell contribution to uninjured adult muscle fibers" *Skeletal Muscle* **5,42** doi 10.1186/s13395-015-0067-1 (2015).

Penna F., Costamagna D., Fanzani A., Bonelli G., Baccino FM., Costelli P. "Muscle wasting and impaired myogenesis in tumor bearing mice are prevented by ERK inhibition". *PLoS One.* **5(10)**, doi: 10.1371/journal.pone.0013604 (2010).

Penna F., Bonetto A., Muscaritoli M., Costamagna D., Minero V.G., Bonelli G., Rossi Fanelli F., Baccino F.M., Costelli P. "Muscle atrophy in experimental cancer cachexia: is the IGF-1 signaling pathway involved?". *Int. J. Cancer* **127**, 1706–1717 (2010).

- Perry R.A. Jr., Brown L.A., Lee D.E., Brown J.L., Baum J.I., Greene N.P., Washington T.A. "The Akt/mTOR pathway: Data comparing young and aged mice with leucine supplementation at the onset of skeletal muscle regeneration". *Data Brief.* **11**;8, 1426-1432. doi: 10.1016/j.dib.2016.08.013 (2016).
- Pileggi A., Xu X., Tan J., Ricordi C. "Mesenchymal stromal (stem) cells to improve solid organ transplant outcome: lessons from the initial clinical trials". *Curr Opin Organ Transplant* **18**, 672–681 doi: 10.1097/MOT.0000000000000029 (2013).
- Pinto Neto L.F., Sales M.C., Scaramussa E.S., da Paz C.J., Morelato R.L. *Braz J Infect Dis.* "Human immunodeficiency virus infection and its association with sarcopenia". **20**(1), 99-102. doi: 10.1016/j.bjid.2015.10.003 (2015).
- Pitson S.M., Moretti P.A., Zebol J.R., Lynn H.E., Xia P., Vadas M.A., Wattenberg B.W. "Activation of sphingosine kinase 1 by ERK1/2-mediated phosphorylation". *EMBO J.* **22**, 5491-5500 (2003).
- Powers S.K., Lynch G.S., Murphy K.T., Reid M.B., Zijdwind I. "Disease-Induced Skeletal Muscle Atrophy and Fatigue" *Med Sci Sports Exerc.* **48**(11), 2307-2319 (2016).
- Pretheeban T., Lemos D.R., Paylor B., Zhang R.H., Rossi F.M. "Role of stem/progenitor cells in reparative disorders". *Fibrogenesis Tissue Repair* **5**, 20. doi:10.1186/1755-1536-5-20 (2012).
- Pulkoski-Gross M.J., Donaldson J.C., Obeid L.M. "Sphingosine-1-phosphate metabolism: A structural perspective" *Crit Rev Biochem Mol Biol.* **50**(4), 298-313. doi: 10.3109/10409238.2015.1039115. Review (2015)
- Punch V.G., Jones A.E., Rudnicki M.A. "Transcriptional networks that regulate muscle stem cell function. Wiley Interdiscip." *Rev. Syst. Biol. Med.* **1**, 128-140 (2009).
- Pyne NJ, Pyne S. "Sphingosine 1-phosphate and cancer". *Nat. Rev. Cancer* **10**, 489-503. (2010).
- Rao R. P., Vaidyanathan N., Rengasamy M., Oommen A. M., Somaiya N., Jagannath M. R., "Sphingolipid metabolic pathway: an overview of major roles played in human Diseases" *Journal of Lipids*, Volume 2013 Article ID 178910, 12 pages. (2013).
- Reid M.B., Moylan J.S. "Beyond atrophy: redox mechanisms of muscle dysfunction in chronic inflammatory disease" *J Physiol.* **589**(Pt 9), 2171-2179. doi: 10.1113/jphysiol.2010.203356. (2011)
- Riccitelli E., Giussani P., Di Vito C., Condomitti G., Tringali C., Caroli M., Galli R., Viani P., Riboni L. "Extracellular sphingosine-1-phosphate: a novel actor in human glioblastoma stem cell survival". *PLoS One* **8**(6), e68229. doi:10.1371/journal.pone.0068229 (2013).
- Rose R.A., Jiang H., Wang X., Helke S., Tsoporis J.N., Gong N., Keating S.C., Parker T.G., Backx P.H., Keating A. "Bone marrow-derived mesenchymal stromal cells express cardiac-specific markers, retain the stromal phenotype, and do not become functional cardiomyocytes in vitro". *Stem Cells.* **26**(11), 2884-2892. doi: 10.1634/stemcells.2008-0329 (2008).

Rosen H., Gonzalez-Cabrera P.J., Sanna M.G., Brown S. "Sphingosine 1-phosphate receptor signaling". *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 743-768 (2009).

Rudnicki M.A., Williams B.O. "Wnt signaling in bone and muscle.". *Bone*. **80**, 60-66. doi: 10.1016/j.bone.2015.02.009. (2015).

Rudrappa S.S., Wilkinson D.J., Greenhaff P.L., Smith K., Idris I., Atherton P.J. "Human Skeletal Muscle Disuse Atrophy: Effects on Muscle Protein Synthesis, Breakdown, and Insulin Resistance—A Qualitative Review" *Front. Physiol.*, **7**, 361 <http://dx.doi.org/10.3389/fphys.2016.00361> (2016)

Sacheck J.M., Ohtsuka A., McLary S.C., Goldberg A.L. "IGF-1 stimulates muscle growth by suppressing protein breakdown and expression of atrophy-related ubiquitin ligases, atrogin-1 and MuRF1" *Am. J. Physiol.* **287**, E591-E601 (2004)

Sacheck J.M., Hyatt J.P., Raffaello A., Jagoe R.T., Roy R.R., Edgerton V.R., Lecker S.H., Goldberg A.L. "Rapid disuse and denervation atrophy involve transcriptional changes similar to those of muscle wasting during systemic diseases". *FASEB J* **21**, 140–155, (2007).

Sakai J., Yoshimori A., Nose Y., Mizoroki A., Okita N., Takasawa R., Tanuma S. "Structure-based discovery of a novel non-peptidic small molecular inhibitor of caspase-3." *Bioorg Med Chem.* **16(9)**, 4854-9. doi: 10.1016/j.bmc.2008.03.046.(2008).

Sakuma K., Yamaguchi A. "Novel intriguing strategies attenuating sarcopenia" *J Aging Res.* 251217. doi: 10.1155/2012/251217 (2012)

Salem H.K., Thiemermann C. "Mesenchymal stromal cells: current understanding and clinical status" *Stem Cells* **28(3)**, 585-596 doi: 10.1002/stem.269 (2010).

Sammani S., Park K.S., Zaidi S.R., Mathew B., Wang T., Huang Y., Zhou T., Lussier Y.A., Husain A.N., Moreno-Vinasco L., Vigneswaran W.T., Garcia J.G. "A sphingosine 1-phosphate 1 receptor agonist modulates brain death-induced neurogenic pulmonary injury" *Am J Respir Cell Mol Biol.* **45(5)**, 1022-1027. doi: 10.1165/rcmb.2010-0267OC (2011).

Samuel C.S., Lekgabe E.D., Mookerjee I. "The effects of relaxin on extracellular matrix remodeling in health and fibrotic disease" *Adv Exp Med Biol.* **612**, 88–103 (2007).

Sanchez T., Hla T. "Structural and functional characteristics of S1P receptors." *J Cell Biochem.* **1;92(5)**:913-922. Review (2004)

Sandri M., Sandri C., Gilbert A., Skurk C., Calabria E., Picard A., Walsh K., Schiaffino S., Lecker S.H., Goldberg A.L. "Foxo transcription factors induce the atrophy-related ubiquitin ligase atrogin-1 and cause skeletal muscle atrophy" *Cell* **117**, 399-412 (2004)

Sanllehi P., Abad J-L., Casas J., Delgado A., "Inhibitors of sphingosine-1-phosphate metabolism (sphingosine kinases and sphingosine-1-phosphate lyase)" *Chemistry and Physics of Lipids*, **197**, 69–81. (2016)

Sanna M.G., Vincent K.P., Repetto E., Nguyen N., Brown S.J., Abgaryan L., Riley S.W., Leaf N.B., Cahalan S.M., Kiosses W.B., Kohno Y., Brown J.H., McCulloch A.D., Rosen H., Gonzalez-Cabrera P.J. "Bitopic Sphingosine 1-Phosphate Receptor 3 (S1P3) Antagonist Rescue from Complete Heart Block: Pharmacological and Genetic Evidence for Direct S1P3 Regulation of Mouse Cardiac Conduction". *Mol Pharmacol.* **89(1)**, 176-186. doi: 10.1124/mol.115.100222 (2016).

Sassoli C., Formigli L., Bini F., Tani A., Squecco R., Battistini C., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Meacci E. "Effects of S1P on skeletal muscle repair/regeneration during eccentric contraction". *J Cell Mol Med* **15**, 2498–2511. doi: 10.1111/j.1582-4934.2010.01250.x (2011).

Sassoli C., Zecchi-Orlandini S., Formigli L. "Trophic Actions of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells for Muscle Repair/Regeneration". *Cells* **1**, 832–850. doi:10.3390/cells1040832 (2012).

Sassoli C., Nosi D., Tani A., Chellini F., Mazzanti B., Quercioli F., Zecchi-Orlandini S., Formigli L. "Defining the role of mesenchymal stromal cells on the regulation of matrix metalloproteinases in skeletal muscle cells". *Exp Cell Res* **323**, 297–313. doi: 10.1016/j.yexcr.2014.03.003 (2014).

Sassoli C., Frati A., Tani A., Anderloni G., **Pierucci F.**, Matteini F., Chellini F., Zecchi Orlandini S., Formigli L., Meacci E. "Mesenchymal Stromal Cell Secreted Sphingosine1-Phosphate (S1P) Exerts a Stimulatory Effect on Skeletal Myoblast Proliferation". *PLOS ONE* **9(9)**, e108662. doi:10.1371/journal.pone.0108662 (2014).

Sbrana F., Sassoli C., Meacci E., Nosi D., Squecco R., Paternostro F., Tiribilli B., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L. "Role for stress fiber contraction in surface tension development and stretch-activated channel regulation in C2C12 myoblasts" *Am J Physiol Cell Physiol*. **295(1)**, C160-172. doi: 10.1152/ajpcell.00014.2008 (2008)

Schiaffino S., Mammucari C. "Regulation of skeletal muscle growth by the IGF1 Akt/PKB pathway: insights from genetic models." *Skelet Muscle*. **24**, 1(1):4. doi: 10.1186/2044-5040-1-4.(2011)

Schuelke M., Wagner K.R., Stolz L.E., Hubner C., Riebel T., Komen W., Braun T., Tobin J.F., Lee S.J. "Myostatin mutation associated with gross muscle hypertrophy in a child" *N. Engl. J. Med*. **350**, 2682-2688 (2004)

Shenkman B.S., Belova S.P., Lomonosova Y.N., Kostrominova T.Y., Nemirovskaya T.L. "Calpain-dependent regulation of the skeletal muscle atrophy following unloading." *Arch Biochem Biophys*. **15**, 584:536-41. doi: 10.1016/j.abb.2015.07.011.(2015).

Shenoy R.T., Sivaraman J. "Structural basis for reversible and irreversible inhibition of human cathepsin L by their respective dipeptidyl glyoxal and diazomethylketone inhibitors" *J. Struct. Biol*. **173**, 14-19 (2011)

Shi H., Scheffler J.M., Pleitner J.M., Zeng C., Park S., Hannon K.M., Grant A.L., Gerrard D.E. "Modulation of skeletal muscle fiber type by mitogen-activated protein kinase signaling". *FASEB J*. **22**, 2990-3000. doi: 10.1096/fj.07-097600 (2008).

Singer P., Shapiro H., Theilla M., Anbar R., Singer J., Cohen J. "Anti-inflammatory properties of omega-3 fatty acids in critical illness: novel mechanisms and an integrative perspective" *IntensiveCareMedicine*, **34**, 1580– 1592 (2008)

Skoura A., Hla T. "Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype" *Cardiovascular Research*, **82**, 221–228. (2009).

Sobel K., Monnier L., Menyhart K., Bolinger M., Studer R., Nayler O., Gatfield J. "FTY720 Phosphate Activates Sphingosine-1-Phosphate Receptor 2 and Selectively Couples to G α 12/13/Rho/ROCK to Induce Myofibroblast Contraction". *Mol Pharmacol.* **87**(6), 916-927. doi: 10.1124/mol.114.097261 (2015).

Spiegel S., Merrill A.H. Jr. "Sphingolipid metabolism and cell growth regulation". *FASEB J.* **10**, 1388-1397 (1996).

Squecco R., Sassoli C., Nuti F., Martinesi M., Chellini F., Nosi D., Zecchi-Orlandini S., Francini F., Formigli L., Meacci E. "Sphingosine 1-phosphate induces myoblast differentiation through Cx43 protein expression: a role for a gap junction-dependent and -independent function". *Mol Biol Cell.* **17**(11), 4896-4910 (2006).

Stahelin R.V., Hwang J.H., Kim J.H., Park Z.Y., Johnson K.R., Obeid L.M., Cho W. "The mechanism of membrane targeting of human sphingosine kinase 1" *J. Biol. Chem.* **280**, 43030–43038 (2005).

Stahn C., Buttgerit F. "Genomic and nongenomic effects of glucocorticoids" *Nat. Clin. Pract. Rheumatol.* **4**, 525-533 (2008)

Stephens N.A., Gallagher I.J., Rooyackers O., Skipworth R.J., Tan B.H., Marstrand T., Ross J.A., Guttridge D.C., Lundell L., Fearon K.C., Timmons J.A. "Using transcriptomics to identify and validate novel biomarkers of human skeletal muscle cancer cachexia" *Genome Med.* **15**, 2(1):1. doi: 10.1186/gm122 (2010).

Stevenson E.J., Koncarevic A., Giresi P.G., Jackman R.W., Kandarian S.C. "Transcriptional profile of a myotube starvation model of atrophy" *J. Appl. Physiol.* **98**, 1396-1406 (2005).

Straczkowski M., Kowalska I., Baranowski M., Nikolajuk A., Otziomek E., Zabielski P., Adamska A., Blachnio A., Gorski J., Gorska M. "Increased skeletal muscle ceramide level in men at risk of developing type 2 diabetes" *Diabetologia* **50**, 2366-2373 (2007).

Sugiura M., Kono K., Liu H., Shimizugawa T., Minekura H., Spiegel S., Kohama T. "Ceramide kinase, a novel lipid kinase: molecular cloning and functional characterization" *J. Biol. Chem.* **277**, 23294-23300 (2002)

Syverud B.C., VanDusen K.W., Larkin L.M. "Growth Factors for Skeletal_Muscle_Tissue Engineering." *Cells Tissues Organs.* **202**(3-4), 169-179 (2016).

Taha T.A., Argraves K.M., Obeid L.M. "Sphingosine-1-phosphate receptors: receptor specificity versus functional redundancy". *Biochim Biophys Acta* **1682**(1-3), 48-55 (2004).

Takabe K., Paugh S.V., Milstien S., Spiegel S. "'Inside-out' signaling of sphingosine-1-phosphate: therapeutic targets" *Pharm. Rev.* **60**, 181-195 (2008)

Takata S., Kaneko S., Takuwa Y. "G12/13 and Gq mediate S1P2-induced inhibition of Rac and migration in vascular smooth muscle in a manner dependent on Rho but not Rho kinase". *Cardiovascular Research*, **79**, 689–697 (2008).

Thomas D.R. "Loss of skeletal muscle mass in aging: examining the relationship of starvation, sarcopenia and cachexia". *Clin Nutr* **26**, 389–399 (2007).

Tintignac L.A., Lagirand J., Batonnet S., Sirri V., Leibovitch M.P., Leibovitch S.A. "Degradation of MyoD mediated by the SCF (MAFbx) ubiquitin ligase" *J. Biol. Chem.* **280**, 2847-2856 (2005)

- Tisdale M.J. "Cancer cachexia" *Curr. Opin. Gastroenterol.* **26**, 146-151 (2010)
- Uccelli A., Moretta L., Pistoia V. "Mesenchymal stem cells in health and disease". *Nat. Rev. Immunol* **8(9)**, 726-736 doi: 10.1038/nri2395 (2008).
- Trendelenburg A.U., Meyer A., Rohner D., Boyle J., Hatakeyama S., Glass D.J. "Myostatin reduces Akt/TORC1/p70S6K signaling, inhibiting myoblast differentiation and myotube size" *American Journal of Physiology: Cell Physiology*, **296**, C1258–C1270 (2009).
- Van Brocklyn J. R., Williams J. B. "The control of the balance between ceramide and sphingosine-1-phosphate by sphingosine kinase: Oxidative stress and the seesaw of cell survival and death" *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B*, **163**, 26–36 (2012).
- Vandervoort A.A. "Aging of the human neuromuscular system". *Muscle Nerve* **25**, 17–25 (2002).
- Venkataraman K., Futerman A.H. "Ceramide as a second messenger: sticky solutions to sticky problems" *Trends Cell. Biol.* **10**, 408-412 (2000)
- Von Roth P., Duda G.N., Radojewski P., Preininger B., Perka C., Winkler T. "Mesenchymal stem cell therapy following muscle trauma leads to improved muscular regeneration in both male and female rats". *Gend. Med.* **9**, 129–136. doi:10.1016/j.genm.2012.01.007 (2012).
- Walters E.H., Stickland C., Loughna P.T. "MRF-4 exhibits fiber type and muscle specific pattern of expression in postnatal rat muscle" *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* **278**, R1381-R1384 (2000).
- Wang X., Yue P., Chan C.B., Ye K., Ueda T., Watanabe-Fukunaga R., Fukunaga R., Fu H., Khun F.R., Sun S.Y. "Inhibition of mammalian target of rapamycin induces phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and Mnk-mediated eukaryotic translation initiation factor 4E phosphorylation" *Mol. Cell. Biol.* **27**, 74057413 (2007)
- Wang Y.X., Rudnicki M.A. "Satellite cells, the engines of muscle repair". *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 127-133. (2012).
- Wegner M-S., Schiffmann S., Parnham M. J., Geisslinger G., Grösch S."The enigma of ceramide synthase regulation in mammalian cells" *Progress in Lipid Research*, **63**, 93–119. (2016).
- Winkler T., von Roth P., Radojewski P., Urbanski A., Hahn S., Preininger B., Duda G.N., Perka C. "Immediate and delayed transplantation of mesenchymal stem cells improve muscle force after skeletal muscle injury in rats" *J Tissue Eng Regen Med* **6**, 60–67. doi: 10.1002/term.1542 (2012).
- Xia P., Wadham C. "Sphingosine-1-phosphate, a key mediator of the cytokine network: juxtacrine signaling" *Cytokine & Growth Factor Reviews*, **22(1)**, 45–53. (2011)
- Xiao H.Y., Watterson S.H., Langevine C.M., Srivastava A.S., Ko S.S., Zhang Y., Cherney R.J., Guo W., Gilmore J.L., Sheppeck J.E., Wu D.R., Li P., Ramasamy D., Arunachalam P.N., Mathur A., Taylor T.L., Shuster D.J., McIntyre K.W., Shen D.R., Yarde M., Cvijic M.E., Marino A.M., Balimane P.V., Yang Z., Banas D.M., Cornelius G., D Arienzo C.J., Warrack B.M., Lehman-McKeeman L.D., Salter-Cid L.M., Xie J.H., Barrish J.C., Carter P.H., Dyckman A.J., Dhar T.G. "Identification of Tricyclic Agonists of Sphingosine-1-Phosphate

Receptor 1 (S1P1) Employing Ligand-Based Drug Design." *J Med Chem.* (2016) [Epub ahead of print]

Yamazaki Y., Kamei Y., Sugita S., Akaike F., Kanai S., Miura S., Hirata Y., Troen B.R., Kitamura T., Nishino I., Suganami T., Ezaki O., Ogawa Y. "The cathepsin L gene is a direct target of FOXO1 in skeletal muscle." *Biochem J.* **427(1)**, 171-178. doi: 10.1042/BJ2009134 (2010).

Yatomi Y., Ruan F., Megidish T., Toyokuni T., Hakomori S., Igarashi Y. "N,N-Dimethylsphingosine inhibition of sphingosine kinase and sphingosine 1-phosphate activity in human platelets" *Biochemistry* **35**, 626–633 (1996)

Yokota H., Yatomi Y., Mashige F., Nakahara K. "Expression of ceramide kinase in hematopoietic cells" *Eur. J. Haematol.* **73**, 307-308 (2004)

Yu Z., Li P., Zhang M., Hannink M., Stamler J.S., Yan Z. "Fibre type specific nitric oxide protects oxidative myofibres against cachectic stimuli" *PLoS One* **3**, e2086 (2008)

Yuan L., Han J., Meng Q., Xi Q., Zhuang Q., Jiang Y., Han Y., Zhang B., Fang J., Wu G. "Muscle-specific E3 ubiquitin ligases are involved in muscle atrophy of cancer cachexia: an in vitro and in vivo study". *Oncol Rep.* **33(5)**, 2261-2268. doi: 10.3892/or.2015.3845 (2015).

Zanin M., Germinario E., Dalla Libera L., Sandonà D., Sabbadini R.A., Betto R., Danieli-Betto D. "Trophic action of sphingosine 1-phosphate in denervated rat soleus muscle" *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **294**, C36-C46 (2008).

Zhang Y., Yu B., He J., Chen D." From Nutrient to MicroRNA: a Novel Insight into Cell Signaling Involved in Skeletal Muscle Developmentand Disease." *Int J Biol Sci.* **12(10)**, 1247-1261 (2016)

Zhao W., Qin W., Pan J., Wu Y., Bauman W.A., Cardozo C. "Dependence of dexamethasone-induced Akt/FOXO1 signaling, upregulation of MAFbx and protein catabolism upon the glucocorticoid receptor" *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **378**, 668-672 (2009)