

a mia nonna Lisa



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI FIRENZE

Dipartimento di Scienze Biochimiche

Scuola di Dottorato in:

SCIENZE E TECNOLOGIE BIOMOLECOLARI E

MORFOLOGICHE

Tesi di Dottorato in **BIOCHIMICA e BIOLOGIA APPLICATA**

XXI ciclo

(SSD BIO/10)

**Ruolo differenziale di sfingosina 1-fosfato e suo metabolismo
nella regolazione della proliferazione, differenziamento e
sopravvivenza di mioblasti e cellule staminali.**

Coordinatore:

Prof. G. Cappugi

Tesi di Dottorato di:

Dott.ssa Paola Nincheri

Docente guida:

Prof.ssa P. Bruni

Indice

INTRODUZIONE	pag. 1
Sfingolipidi	pag. 1
Metabolismo degli sfingolipidi	pag. 2
Sfingosina 1-fosfato	pag. 7
Modalità di azione di S1P	pag. 11
Recettori per S1P	pag. 14
Funzioni biologiche di S1P	pag. 21
S1P e muscolo scheletrico	pag. 28
<i>Crosstalk</i> tra vie di trasduzione del segnale	pag. 30
Fattore di necrosi tumorale α (TNF α)	pag. 41
Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF).....	pag. 44
Fattore di crescita trasformante β (TGFβ)	pag. 47
Mesoangioblasti e distrofia muscolare	pag. 51
MATERIALI e METODI.....	pag. 56
Materiali	pag. 56
Colture cellulari	pag. 58
Preparazione dei lisati cellulari.....	pag. 59
Frazionamento cellulare	pag. 59
Dosaggio di proteine	pag. 60
Elettroforesi su gel di poliacrilammide e Western Blotting	pag. 60
Retrotrascrizione da RNA totale e reazione a catena della polimerasi	pag. 61
Real Time PCR	pag. 62
Valutazione della proliferazione cellulare mediante incorporazione di timidina triziata.....	pag. 64
Valutazione della proliferazione cellulare in mesoangioblasti D16 mediante conta delle cellule.....	pag. 64
Dosaggio di attività di SphK.....	pag. 65
Valutazione dell'effetto anti-apoptotico di S1P e TGFβ.....	pag. 66
Valutazione dell'apoptosi mediante conta del numero delle cellule	pag. 66

Valutazione dell'apoptosi mediante dosaggio di attività della caspasi-3.....	pag. 66
Valutazione dell'apoptosi mediante saggio ELISA	pag. 67
Valutazione dell'apoptosi mediante l'impiego di PE-AnnessinaV.....	pag. 68
Superespressione di plasmidi contenenti cDNA di sequenze di interesse ...	pag. 68
Trasfezione con oligodeossinucleotidi antisenso per i S1PR	pag. 69
Trasfezione con siRNA specifici e di controllo	pag. 70
Presentazione dei dati ed analisi statistica	pag. 70
RISULTATI I PARTE.....	pag. 71
Sfingosina 1-fosfato media proliferazione e sopravvivenza di mesoangioblasti	pag. 71
TGFβ protegge mesoangioblasti D16 dall'apoptosi mediante regolazione di SphK-1	pag. 85
RISULTATI II PARTE	pag. 99
Sfingosina 1-fosfato è coinvolta nell'effetto pro-miogenico esercitato da TNFα in mioblasti C2C12	pag. 99
RISULTATI III PARTE	pag. 107
In mioblasti C2C12 il recettore S1P₁ regola negativamente la proliferazione indotta dal PDGF.....	pag. 107
DISCUSSIONE I PARTE	pag.117
Sfingosina 1-fosfato media proliferazione e sopravvivenza di mesoangioblasti	pag. 117
TGFβ protegge mesoangioblasti D16 dall'apoptosi mediante regolazione di SphK-1	pag. 120
DISCUSSIONE II PARTE.....	pag.126
DISCUSSIONE III PARTE	pag.129
BIBLIOGRAFIA.....	pag.131

Sfingolipidi

Negli ultimi anni si è affermata l'evidenza che le molecole lipidiche non hanno esclusivamente un ruolo come componenti strutturali delle membrane biologiche o nel metabolismo energetico, ma hanno un ruolo fondamentale anche come molecole segnalatorie e regolatorie. È stato infatti dimostrato che esse sono coinvolte in numerosi processi biologici importanti, quali la crescita e la proliferazione cellulare, l'apoptosi, la senescenza, l'adesione e la migrazione cellulare, l'angiogenesi e la risposta immunitaria, e che alterazioni nelle vie di segnalazione controllate da tali molecole contribuiscono alla patogenesi di varie malattie, quali il cancro e vari disordini metabolici [1].

È stato osservato che l'azione dei lipidi è cellula-specifica, ossia una stessa molecola lipidica può provocare effetti diversi su tipi cellulari differenti, e questo a seconda delle vie di segnalazione che possono essere attivate nella cellula bersaglio.

I lipidi bioattivi, definiti come molecole le cui variazioni nei livelli intracellulari hanno come risultato conseguenze funzionali, e quindi molecole in grado di innescare varie risposte cellulari, comprendono, oltre agli ormai ben noti eicosanoidi e fosfatidilinositoli, gli sfingolipidi. Questi ultimi, sintetizzati negli organismi eucariotici, sia unicellulari che pluricellulari [2], oltre ad essere costituenti ubiquitari del plasmalemma hanno un ruolo significativo come mediatori di processi cellulari fondamentali quali la proliferazione, la sopravvivenza, il differenziamento e la motilità.

La struttura centrale di tutti gli sfingolipidi è rappresentata da un aminoalcol a lunga catena, la cui forma predominante, in cellule di mammifero, è rappresentata dalla sfingosina, una molecola a 18 atomi di carbonio con un doppio legame in *trans* tra gli atomi C-4 e C-5.

Tra gli sfingolipidi più studiati e meglio caratterizzati ci sono il ceramide (Cer), che media la risposta cellulare a vari stress, regolando i processi di apoptosi [3] e

senescenza cellulare [4], la sfingosina (Sph), coinvolta nella regolazione dell'endocitosi, del ciclo cellulare e dell'apoptosi [5], e la sfingosina 1-fosfato (S1P), le cui funzioni saranno ampiamente discusse in seguito.

Altri sfingolipidi, ai quali è stato recentemente riconosciuto un ruolo come importanti lipidi bioattivi, comprendono il ceramide 1-fosfato (Cer-1P), coinvolto nella regolazione della risposta infiammatoria [6,7], dell'apoptosi [8,9] e della proliferazione cellulare [10,11], il glucosilceramide, che ha un ruolo nella resistenza delle cellule a vari farmaci chemioterapici e nel trasporto di proteine dal Golgi al plasmalemma [12], la lisosfingomielina ed il diidroceramide.

Metabolismo degli sfingolipidi

La biosintesi degli sfingolipidi è un processo che avviene a tappe e coinvolge enzimi localizzati nel reticolo endoplasmatico e nell'apparato del Golgi [13,14,15].

Essa ha inizio a livello delle membrane del reticolo endoplasmatico, con la reazione di condensazione del palmitoilCoA, un acido grasso attivato a 16 atomi di carbonio, con l'amminoacido serina, catalizzata dalla serina palmitoiltransferasi, che porta alla formazione di 3-chetodiidrosfingosina, successivamente ridotta a diidrosfingosina dall'enzima 3-chetodiidrosfingosina reductasi. Questa rappresenta il substrato dell'enzima diidroceramide sintasi, che catalizza il trasferimento di un acido grasso attivato a lunga catena, generalmente il palmitoilCoA, sul gruppo amminico libero della diidrosfingosina. Il diidroceramide così formato viene poi convertito in Cer dall'enzima diidroceramide desaturasi, che inserisce un doppio legame tra gli atomi di carbonio C-4 e C-5.

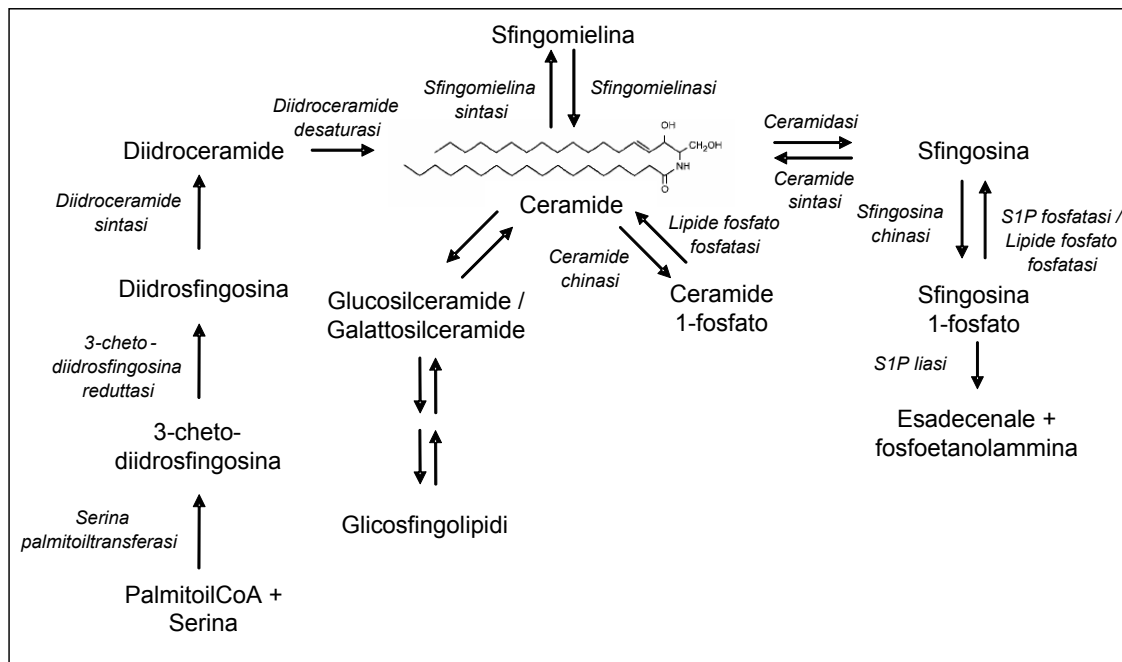


Figura 1 *Metabolismo degli sfingolipidi.*

Il Cer, oltre ad essere di per sé un lipide bioattivo [16,17,18], rappresenta una molecola chiave nella via biosintetica degli sfingolipidi, essendo il precursore di almeno cinque prodotti differenti, tutti biologicamente rilevanti. Il gruppo idrossilico in posizione C-1 del Cer può essere fosforilato a Cer-1P dall'enzima ceramide chinasi [19,20], la cui localizzazione subcellulare è ancora dubbia. Alternativamente, il gruppo idrossilico in C-1 del ceramide può essere glicosilato per trasferimento di galattosio, che avviene a livello del reticolo endoplasmatico, o di glucosio, nell'apparato del Golgi, con formazione di galattosilceramide o glucosilceramide, rispettivamente. Questi, a loro volta, rappresentano i precursori dei glicosfingolipidi, la cui sintesi avviene nell'apparato del Golgi per trasferimento di unità saccaridiche addizionali. I glicosfingolipidi vengono poi trasportati, attraverso vescicole, alla membrana plasmatica, dove mediano processi di riconoscimento intercellulare, adesione cellulare e differenziamento [21,22]. Il Cer può essere inoltre deacilato, con formazione di Sph e di un acido grasso, per azione di ceramidasi, enzimi di cui sono note varie isoforme, che si distinguono in base all'optimum di pH di catalisi enzimatica, neutro, alcalino o acido, e per la localizzazione subcellulare, a livello della membrana plasmatica, del reticolo endoplasmatico e dell'apparato del Golgi o dei lisosomi, rispettivamente. Infine, il Cer può essere convertito in sfingomielina (SM), in una reazione catalizzata dall'enzima sfingomielina sintasi, localizzato nell'apparato del Golgi [23,24], che trasferisce la

fosforilcolina dalla fosfatidilcolina all'ossidrile in C-1 del Cer, con conseguente produzione anche di diacilglicerolo, importante secondo messaggero intracellulare [25]. Il trasporto del Cer dal reticolo endoplasmatico, dove viene sintetizzato, all'apparato del Golgi, dove può subire varie modificazioni per dare origine ad altre molecole, può avvenire per azione di una specifica proteina di trasferimento, CERT, o attraverso il trasporto vescicolare, a seconda che lo sfingolipide venga poi utilizzato per la sintesi di SM o di glucosilceramide, rispettivamente.

La SM viene trasferita, probabilmente attraverso il trasporto vescicolare, dal Golgi alla membrana plasmatica, dove può entrare a far parte del pool dei lipidi di membrana come componente strutturale, oppure essere ulteriormente metabolizzata per dare origine a molecole sfingoidi bioattive. In questo processo di degradazione, la SM, presente a livello del plasmalemma, viene convertita in Cer e fosforilcolina per idrolisi del legame fosfodiesterico. Questa reazione è catalizzata dall'enzima sfingomielinasi, che può essere attivato da diversi stimoli intra- ed extracellulari [26] e del quale sono state identificate due isoforme, che differiscono per l'optimum di pH, per la localizzazione subcellulare e per il cofattore metallico richiesto [18,26]: una sfingomielinasi acida, localizzata a livello del foglietto esterno della membrana, ed una sfingomielinasi neutra, presente invece a livello del foglietto interno. Il Cer così generato può agire di per sé come molecola biologicamente attiva, oppure servire come precursore per la sintesi di altre molecole sfingoidi bioattive, come descritto in precedenza.

La Sph che si forma per deacilazione del Cer catalizzata da ceramidasi, a sua volta, oltre ad agire come importante molecola regolatoria di vari processi, può essere riciclata nella via biosintetica degli sfingolipidi, attraverso la sua conversione a Cer catalizzata dalla ceramide sintasi, oppure può essere fosforilata dalla sfingosina chinasi (SphK) a S1P, un altro lipide bioattivo dalle molteplici funzioni. Questa molecola, che rappresenta il prodotto terminale del metabolismo degli sfingolipidi, può essere degradata attraverso due diverse reazioni, entrambe catalizzate da enzimi localizzati a livello del reticolo endoplasmatico: per defosforilazione, processo reversibile, catalizzato dalla sfingosina 1-fosfato fosfatasi (SPPasi), che genera di nuovo Sph, oppure per idrolisi del legame tra gli atomi di carbonio C-2 e C-3, processo irreversibile, che determina cioè l'uscita dalla via del metabolismo degli sfingolipidi, catalizzato dalla sfingosina 1-fosfato liasi (Spl), che porta alla formazione di fosfoetanolamina ed esadecenale, che possono essere

riutilizzati per la biosintesi di fosfatidiletanolamina. L'esadecenale può anche essere ridotto a palmitato, e rientrare così nel metabolismo lipidico.

Per completare questo già complesso quadro metabolico, occorre ricordare che esiste anche un processo di degradazione lisosomiale degli sfingolipidi, che interessa principalmente i glicosfingolipidi [17]. I frammenti di membrana contenenti queste molecole vengono internalizzati sotto forma di vescicole rivestite e, passando attraverso il compartimento endosomiale, raggiungono i lisosomi. Qui, attraverso l'idrolisi sequenziale dei residui saccaridici, catalizzata da specifiche glicosil idrossilasi, si forma il Cer, che mediante deacilazione per azione della ceramidasi acida viene convertito in Sph. Gli intermedi del catabolismo lisosomiale degli sfingolipidi, che comprendono residui saccaridici, acidi grassi e Sph, possono essere ulteriormente degradati oppure possono essere riciclati, rientrando nella via biosintetica, attraverso quella che viene indicata come "via della sfingomielinasi" o "via di recupero" (*salvage pathway*) [27].

Riassumendo, esistono due strade per entrare nella via del metabolismo degli sfingolipidi, ed entrambe convergono nella formazione di Cer, molecola chiave nella sintesi degli altri sfingolipidi bioattivi: la via *de novo*, che ha inizio con la condensazione della serina con il palmitoilCoA, e la via della sfingomielinasi, o via di "riciclaggio", che prevede l'idrolisi della SM di membrana. Esiste invece una sola via per uscirne, che consiste nella conversione degli sfingolipidi a S1P, poi idrolizzata a esadecenale e fosfoetanolamina.

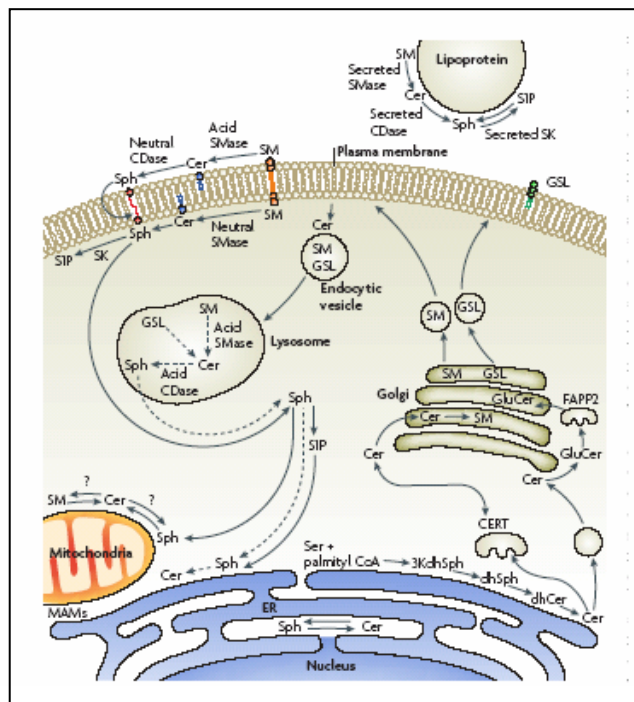


Figura 2 Sintesi de novo e “via di recupero” (indicata dal tratteggio) degli sfingolipidi.

Poiché molti degli intermedi delle vie metaboliche appena descritte rappresentano molecole bioattive, coinvolte nella modulazione di numerosi ed importanti processi biologici, è chiara la necessità, per la cellula, di regolare finemente i livelli intracellulari di tali molecole. Ciò viene realizzato attraverso la regolazione dell’attività degli enzimi coinvolti nella loro biosintesi e degradazione [28].

La maggior parte degli enzimi coinvolti nel metabolismo degli sfingolipidi mostra una specifica localizzazione subcellulare. Questa caratteristica, unita al fatto che le molecole lipidiche sono idrofobiche, e quindi difficilmente diffusibili nel citosol, a meno che non intervengano specifici sistemi di trasporto, impone delle restrizioni alla localizzazione subcellulare degli sfingolipidi stessi, e quindi al loro sito di azione, che nella maggior parte dei casi coincide con il compartimento cellulare in cui essi vengono generati. Ciò ha delle importanti conseguenze funzionali: è stato infatti dimostrato che uno stesso sfingolipide può esercitare funzioni differenti a seconda del compartimento cellulare in cui viene prodotto. È stato osservato, per esempio che il Cer generato a livello del reticolo endoplasmatico svolge funzioni diverse rispetto a quello generato a livello della membrana plasmatica, e che, anche a livello del plasmalemma stesso, tale molecola regola funzioni distinte a seconda che sia prodotta nel foglietto interno o esterno.

Tra gli sfingolipidi, comunque, ci sono molecole, come S1P, che, per le loro caratteristiche chimico-fisiche, sono sufficientemente solubili in ambiente acquoso e quindi in grado di diffondere nel citosol, e che perciò non rimangono confinate nel compartimento in cui sono state prodotte.

Sfingosina 1-fosfato

S1P è una molecola segnalatoria coinvolta nella regolazione di importanti processi biologici, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, in molti tipi cellulari di vari organismi.

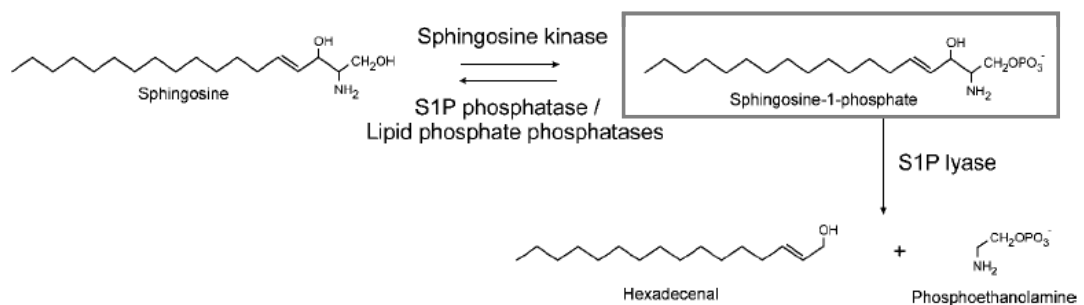


Figura 3 *Sfingosina 1-fosfato: struttura, sintesi e degradazione.*

S1P è presente a concentrazioni elevate nel plasma (0,1 $\mu\text{mol/L}$) e nel siero (0,4 $\mu\text{mol/L}$). La quota di molecola biologicamente attiva sembra tuttavia essere ridotta, dal momento che S1P ha una emivita breve nei fluidi extracellulari e che, nel sangue, essa è ampiamente legata a varie componenti del plasma, quali albumina ed altre proteine, oppure particelle lipoproteiche [29,30].

Le piastrine, che possiedono elevati livelli di SphK e sono prive della Spl, rappresentano un'importante fonte del lipide bioattivo, che viene rilasciato in circolo in seguito ad attivazione delle piastrine stesse, da parte di vari stimoli [31]. Anche cellule della linea emangioblastica, quali monociti, mastociti, cellule endoteliali ed eritrociti, rilasciano lo sfingolipide nel sangue [32]. Recentemente è stato proposto che i maggiori responsabili degli elevati livelli di S1P nel sangue siano appunto gli eritrociti, privi degli enzimi coinvolti nella degradazione di tale molecola, piuttosto che le piastrine [33].

Numerosi tipi cellulari, comunque, possiedono gli enzimi necessari per la sintesi di S1P, e producono il lipide bioattivo in risposta a stimoli extracellulari, quali fattori di crescita e citochine.

Così come per le altre molecole segnalatorie, i livelli di S1P all'interno della cellula vengono mantenuti bassi e devono essere finemente modulati: ciò viene realizzato attraverso la regolazione degli enzimi della via biosintetica e di quelli della via degradativa. Questo permette alla cellula di mantenere la concentrazione del lipide bioattivo a livelli ottimali, e di generarne variazioni spazio-temporali in risposta ad opportuni stimoli [34]. I livelli di S1P possono essere quindi potenzialmente alterati da tutti quegli stimoli in grado di influenzare l'attività o l'espressione degli enzimi responsabili della sintesi e della degradazione di questa molecola. In realtà, la modulazione del metabolismo, e quindi dei livelli intracellulari di S1P, da parte di agenti extracellulari, viene realizzata principalmente attraverso la regolazione dell'attivazione e/o dell'espressione di SphK.

La SphK è una chinasi lipidica evolutivamente conservata, che catalizza la fosforilazione del gruppo idrossilico sul carbonio C-1 della Sph, in una reazione che richiede ATP ed un catione divalente e che determina la formazione di S1P e la concomitante riduzione del contenuto cellulare di Cer [14].

Nelle cellule di mammifero sono state caratterizzate due isoforme di questo enzima, note come SphK1 e SphK2 [35], che differiscono tra loro per struttura, proprietà cinetiche, meccanismi di regolazione, localizzazione subcellulare, distribuzione tissutale e pattern di espressione temporale durante lo sviluppo embrionale [36]: tutto questo porta ad ipotizzare che esse svolgano funzioni cellulari distinte. Effettivamente è stato dimostrato che le due isoforme, pur catalizzando la stessa reazione, evocano risposte cellulari opposte, mentre SphK1 promuove la sopravvivenza cellulare e la proliferazione [37,38], SphK2, almeno quando viene superespressa, induce l'arresto del ciclo cellulare e promuove l'apoptosi, in maniera indipendente dall'attivazione dei recettori per S1P [39,40]. È stato ipotizzato che alla base della differenza di funzione tra le due chinasi ci sia la loro diversa localizzazione subcellulare, che ha come conseguenza la produzione di S1P in distretti cellulari distinti [41,36]. Infatti, mentre la SphK1 si trova prevalentemente nel citoplasma e, in seguito ad opportuna stimolazione, trasloca a membrana, e sembra rappresentare la più importante fonte di S1P che viene rilasciata nel mezzo extracellulare [42,43]; al contrario, la SphK2 si trova principalmente associata agli organelli cellulari, in particolare al nucleo, per la presenza

di una sequenza di localizzazione nucleare, ed al reticolo endoplasmatico [39,40]. La localizzazione della SphK2 a livello del reticolo endoplasmatico potrebbe spiegare la sua azione pro-apoptotica: qui sono infatti presenti gli enzimi SPPasi e ceramide sintasi, che potrebbero essere responsabili della conversione della S1P prodotta dalla SphK2 a Sph e quindi a Cer, metabolita pro-apoptotico. In realtà rimane ancora da capire se gli effetti anti-mitogenici e pro-apoptotici di SphK2 siano da ascrivere alla produzione di S1P o all'attività dell'enzima stesso, che potrebbe essere direttamente coinvolto nell'inibizione della sintesi di DNA e nell'attivazione della via mitocondriale dell'apoptosi. A questo proposito è stato dimostrato che la localizzazione nucleare della SphK2 è associata all'arresto del ciclo cellulare in fase G₁/S [39] e che tale isoforma contiene una sequenza di 9 aminoacidi simile a quella presente nelle proteine pro-apoptotiche Bcl2-homology domain 3 (BH3)-only [40].

La regolazione della SphK è un evento fondamentale nella modulazione dei livelli intracellulari di S1P, e quindi dei suoi effetti biologici. La SphK1, studiata più approfonditamente rispetto alla SphK2, risulta essere regolata in maniera complessa attraverso meccanismi molecolari che non sono stati ancora completamente delucidati.

Sono stati individuati numerosi agenti extracellulari in grado di attivare quest'enzima, e di stimolare quindi la produzione di S1P [44]: ligandi per recettori accoppiati a proteine G, tra cui l'acetilcolina, l'acido lisofosfatidico e S1P stessa; ligandi per recettori con attività tirosinchinasica, quali il PDGF (Platelet-Derived Growth Factor), il VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), l'NGF (Nerve Growth Factor) e l'EGF (Epidermal Growth Factor); varie citochine, tra cui il TNF α (Tumor Necrosis Factor- α) ed il TGF β (Trasforming Growth Factor- β), ed ormoni, come estrogeni e glucocorticoidi. È stato dimostrato che l'inibizione della SphK, e quindi della produzione di S1P, blocca alcune delle vie di segnalazione a valle di tali agonisti, bloccandone quindi, almeno in parte, gli effetti biologici [45]. S1P rappresenta, pertanto, un importante mediatore dell'azione di molti fattori di crescita, citochine ed ormoni [46].

Soltanto recentemente i meccanismi molecolari alla base della regolazione della SphK1 da parte di questi agonisti hanno iniziato ad essere chiariti. È stato osservato che molti di questi stimoli hanno in comune la capacità di aumentare l'attività dell'enzima mediante meccanismi post-traduzionali, agendo sulla sua localizzazione, sul suo stato di fosforilazione o sulla sua interazione con altre proteine e/o con fosfolipidi. Vari agenti

extracellulari sono inoltre in grado di regolare l'attività di questo enzima modulandone i livelli intracellulari, agendo cioè a livello trascrizionale.

La regolazione della localizzazione della SphK1 rappresenta un meccanismo molto importante ai fini dell'attivazione dell'enzima [45]. In effetti, in molti casi l'attivazione dell'enzima è accompagnata dalla sua traslocazione dal citosol alla membrana plasmatica [36]. SphK1, infatti, in assenza di stimolazione mediata da agonista si trova per la maggior parte nel citoplasma, mentre il suo substrato, la Sph, è localizzato a livello del plasmalemma o delle membrane interne. Oltre che per il reclutamento del substrato dell'enzima, questa traslocazione potrebbe essere importante anche perché a livello della membrana SphK può interagire con lipidi anionici, principalmente la fosfatidilserina, in grado di stimolarne l'attività [47]. La traslocazione, inoltre, è importante non semplicemente per localizzare l'enzima a livello della membrana plasmatica, ma per determinarne la presenza in specifici microdomini: in cellule in migrazione, per esempio, il PDGF stimola la traslocazione della SphK1 nei lamellipodi [43], e questa specifica localizzazione è importante per la chemiotassi in risposta a tale fattore di crescita.

Ad oggi i meccanismi molecolari che mediano la traslocazione di SphK1 dal citosol alla membrana rimangono da chiarire. È stato ipotizzato il coinvolgimento di lipidi anionici di membrana, quali acido fosfatidico, che oltre a stimolarne l'attività potrebbero quindi funzionare anche come siti di legame per l'enzima, dirigendone la localizzazione al plasmalemma [36,48,49]. Sembra, inoltre, che la traslocazione della SphK1 coinvolga la sua associazione con altre proteine, tra cui la calmodulina [50]. I vari meccanismi di regolazione della SphK1 possono agire anche contemporaneamente nell'attivazione dell'enzima. Per esempio, la stimolazione dell'attività di SphK1 mediata da alcuni agonisti è dovuta alla fosforilazione del residuo di serina in posizione 225, che oltre ad essere sufficiente ad indurre un notevole incremento dell'attività catalitica dell'enzima [42], risulta essenziale per il suo reclutamento al plasmalemma, probabilmente perché ne promuove l'interazione con fosfolipidi acidi di membrana [51]. Inoltre è stato osservato che l'associazione dell'enzima con il doppio strato lipidico dipende, almeno in alcuni casi, dalla sua interazione con molecole di membrana, sia proteiche, come proteine di adesione [52], che lipidiche, come l'acido fosfatidico [49], che è anche in grado di stimolarne l'attività [47].

Un altro meccanismo di regolazione di SphK1 è basato sulla sua esportazione dalla cellula, con conseguente produzione di S1P direttamente nell'ambiente extracellulare [53].

Da notare che a seconda che SphK1 venga traslocata al plasmalemma o alle diverse membrane interne, oppure venga secreta, S1P viene prodotta nell'immediata vicinanza dei suoi recettori di superficie, oppure in corrispondenza di potenziali bersagli molecolari intracellulari. La regolazione della localizzazione dell'enzima potrebbe pertanto avere conseguenze importanti nel determinare gli effetti evocati dallo sfingolipide.

Alla modulazione dei livelli intracellulari di S1P contribuiscono, come già menzionato, anche gli enzimi responsabili della sua degradazione: Spl, SPPasi e, più generalmente, enzimi appartenenti alla famiglia delle lipide fosfato fosfatasi (LPP). I meccanismi di regolazione dell'attività di questi enzimi sono tuttavia scarsamente conosciuti.

Molto poco si conosce invece, sulla regolazione della SphK2. Recenti lavori riportano che EGF e gli esteri del forbolo (PMA) sono in grado di stimolarne l'attività [54]. Sembra molto probabile che ciò avvenga mediante fosforilazione su due siti dell'enzima, serina 351 e treonina 578, da parte di ERK1/2 MAPK. Inoltre altri suggeriscono che venga fosforilata dalla protein chinasi D, e questa modificazione ne permetta l'esportazione e la ri-localizzazione a livello nucleare, con conseguente inibizione della sintesi del DNA [55].

Modalità di azione di S1P

La S1P prodotta all'interno della cellula in risposta a vari stimoli, può funzionare sia come secondo messaggero, modulando l'attività di specifici bersagli intracellulari [13], sia come agonista extracellulare, attraverso l'interazione con specifici recettori localizzati sulla membrana plasmatica della stessa cellula da cui è stata prodotta, oppure delle cellule vicine, ossia con modalità autocrina o paracrina [56].

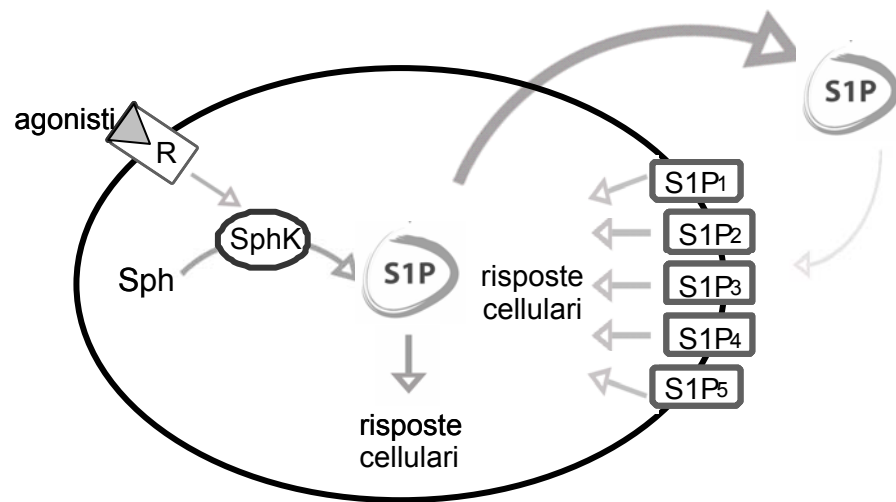


Figura 4 Azione intracellulare ed extracellulare di S1P.

Ovviamente, l'azione di S1P come agonista di recettori di membrana richiede che tale molecola venga rilasciata nell'ambiente extracellulare. Data la natura polare della testa di questo sfingolipide, si suppone che esso non attraversi facilmente la membrana, e che venga perciò esportato attraverso specifici trasportatori, probabilmente appartenenti alla famiglia ABCC1 (ATP-Binding Cassette transporter) [57]. Occorre poi ricordare che S1P può anche essere prodotta direttamente nell'ambiente extracellulare: è stato infatti dimostrato che almeno alcuni tipi cellulari possono secernere SphK [53], sfingomielinasi e ceramidasi [58,59] in forma cataliticamente attiva. È stata inoltre ipotizzata l'esistenza di un'isoforma di SphK integrata nella membrana plasmatica con il sito catalitico rivolto verso l'ambiente esterno, e capace quindi di agire come ectoenzima, anch'essa responsabile della produzione di S1P direttamente nel mezzo extracellulare [60].

Sebbene la maggior parte delle funzioni biologiche documentate per tale molecola siano legate all'attivazione dei recettori di membrana, è stato dimostrato che essa è in grado di mediare diversi processi cellulari in maniera indipendente da tali recettori, sebbene i bersagli molecolari dello sfingolipide non siano stati ancora identificati. Le risposte cellulari associate all'azione di S1P come secondo messaggero comprendono la mobilizzazione del Ca^{2+} dalle riserve intracellulari, in maniera indipendente dalla formazione di inositolo trisfosfato [61], la proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi [45]. In realtà, i dati relativi ai meccanismi attraverso i quali il lipide bioattivo regola la proliferazione e la sopravvivenza cellulare sono contrastanti, esistono infatti sia prove a favore di una azione intracellulare di S1P, sia prove che indicano invece il coinvolgimento dei suoi recettori. Questo fa ipotizzare che entrambe le

modalità di azione di S1P possano essere coinvolte nella regolazione di questi processi, o che questa molecola possa mediare uno stesso processo agendo con modalità diverse in tipi cellulari differenti.

Sebbene la dimostrazione definitiva della capacità di S1P di agire come secondo messaggero richieda che i suoi bersagli molecolari intracellulari vengano identificati, diverse evidenze sperimentali supportano una funzione dello sfingolipide come effettore intracellulare. È stato dimostrato che in alcuni tipi cellulari l'introduzione dello sfingolipide direttamente all'interno del citosol ha gli stessi effetti biologici della molecola aggiunta all'esterno, in termini di effetti sulla proliferazione e sulla sopravvivenza cellulare [62]. Inoltre alcuni effetti di S1P sono ottenuti solo con concentrazioni micromolari dello sfingolipide, molto più alte rispetto alla K_D dei recettori di membrana per S1P. Ancora, i lieviti e le piante, pur essendo privi di tali recettori, possiedono gli enzimi per il metabolismo dello sfingolipide e sono responsivi a tale molecola [63]. Attraverso l'attivazione di specifici recettori di membrana, lo sfingolipide regola processi come il riarrangiamento del citoscheletro [64], la migrazione cellulare [65,66], l'assemblaggio delle giunzioni cellulari [67], lo sviluppo embrionale [45], l'angiogenesi [68], la rigenerazione muscolare [69] e la risposta immunitaria [70].

È importante comunque sottolineare che non è possibile fare una netta distinzione tra i processi che S1P media agendo come secondo messaggero e quelli che, invece, media attraverso l'attivazione dei propri recettori, in quanto la regolazione di alcuni processi potrebbe coinvolgere entrambe le modalità di azione dello sfingolipide, magari a seconda del tipo cellulare considerato.

Inoltre è importante sottolineare che S1P esercita effetti diversi, talvolta addirittura opposti, a seconda dei tipi di recettori espressi dalla cellula su cui lo sfingolipide agisce, come sarà discusso in seguito.

Quelli elencati finora sono soltanto alcuni dei processi mediati da S1P. La letteratura relativa alle funzioni biologiche di questo sfingolipide è molto estesa, ed alcune di esse saranno descritte più dettagliatamente in seguito.

Oltre a regolare numerosi processi fisiologici, S1P può essere coinvolta anche in varie condizioni patologiche. È stato per esempio dimostrato che alterazioni nel metabolismo dello sfingolipide sono coinvolte in malattie autoimmuni e nel rigetto di trapianto, nella tumorigenesi, nell'infertilità femminile e nell'infarto del miocardio, a testimonianza del suo ruolo come mediatore pleiotropico.

Recettori per S1P

La maggior parte degli effetti mediati da S1P sono dovuti alla sua interazione con specifici recettori localizzati sulla membrana plasmatica. Nelle cellule di mammifero sono stati finora identificati cinque recettori in grado di legare S1P con alta affinità ($K_d=2-63$ nM), appartenenti alla famiglia Edg (Endothelial differentiation gene), recentemente rinominati come S1P₁, S1P₂, S1P₃, S1P₄ e S1P₅ dalla NC-IUPHAR (Nomenclature Committee of the International Union of Pharmacology) [71]. Si tratta di recettori accoppiati a proteine G, con una struttura che consiste di una porzione N-terminale extracellulare, molto probabilmente glicosilata, sette domini idrofobici transmembranari ed una porzione C-terminale citoplasmatica, importante per l'accoppiamento con le proteine G, che funzionano da trasduttori intracellulari del segnale [72].

Ogni sottotipo recettoriale è associato a specifiche proteine G, per cui l'interazione di S1P con ciascun recettore porta all'attivazione o all'inibizione di vie di segnalazione distinte, ed evoca quindi risposte cellulari differenti. Questo permette allo sfingolipide di mediare processi biologici diversi: la risposta funzionale di ciascuna cellula a S1P dipende infatti dal recettore con cui lo sfingolipide bioattivo interagisce, e quindi dai livelli relativi dei diversi sottotipi recettoriali espressi dalla cellula stessa.

È importante sottolineare che nonostante alcuni recettori per S1P siano accoppiati allo stesso tipo di proteina G ed abbiano quindi effettori a valle in comune, tra di essi non c'è una completa ridondanza di funzione, come dimostrato da studi *in vivo* su topi *knockout*, che indicano che l'assenza di un sottotipo recettoriale non sempre viene compensata dalla presenza degli altri. Questo potrebbe essere dovuto al fatto che ciascun recettore, pur essendo accoppiato a più proteine G, mostra una certa "preferenza" per una di esse, e che recettori distinti, pur attivando una stessa via di segnalazione, non lo fanno con la stessa efficacia. Ne consegue che i complessi formati da ciascun recettore per S1P con le proprie proteine effettrici sono sufficientemente diversi tra loro da indurre risposte biologiche distinte e mediare perciò effetti differenti dello sfingolipide.

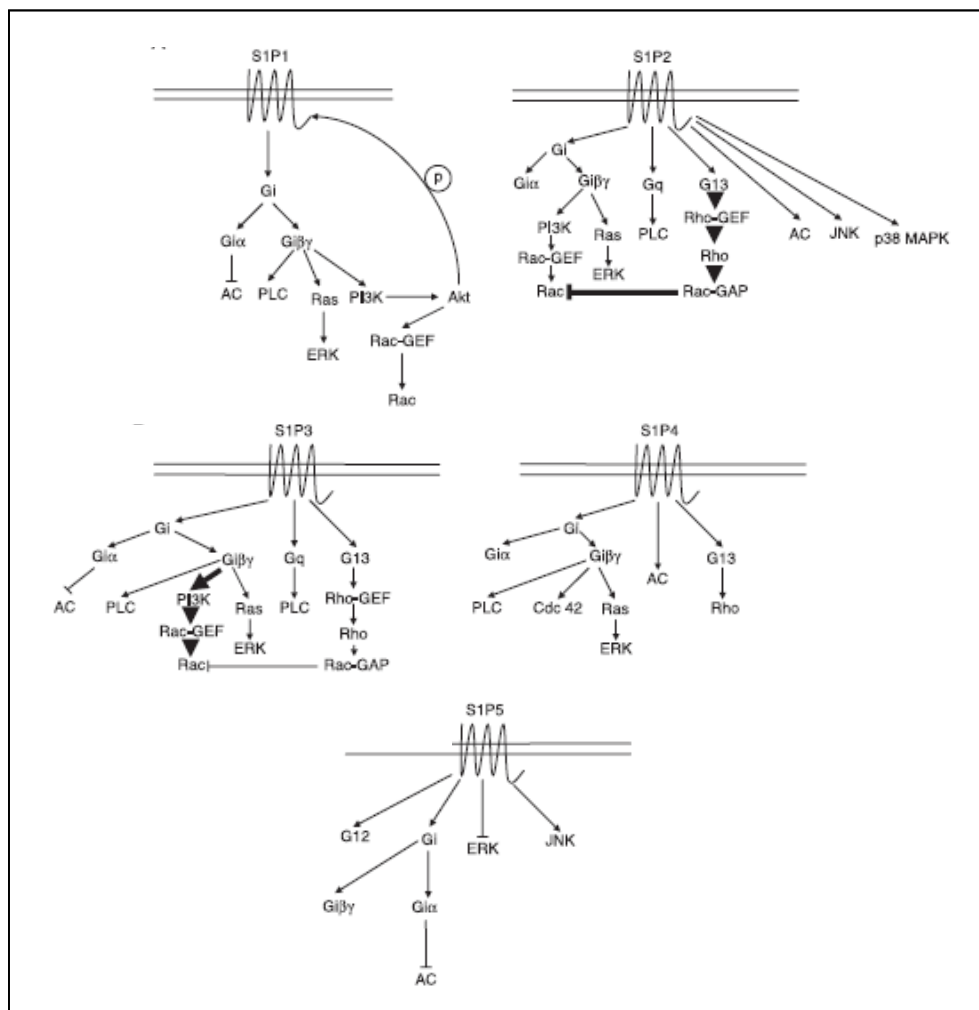


Figura 5 Vie di segnalazione attivate da S1P attraverso i suoi recettori.

Lo spegnimento del segnale recettoriale può realizzarsi attraverso diverse vie: la degradazione di S1P, catalizzata da fosfatasi di membrana, aventi il dominio catalitico rivolto verso l'ambiente extracellulare, che riducono i livelli extracellulari dello sfingolipide limitandone così la disponibilità per il legame ai recettori; la conversione delle proteine G nella forma inattiva per idrolisi del GTP a GDP; la desensitizzazione dei recettori, che ne riduce la responsività al ligando, dovuta al loro disaccoppiamento dalle proteine G in conseguenza della fosforilazione reversibile, catalizzata da specifiche chinasi, di determinati residui aminoacidici a livello della porzione citosolica del recettore, e la conseguente internalizzazione, per endocitosi, dei recettori fosforilati. I recettori per S1P mostrano una grande variabilità di espressione nei vari tipi cellulari. Questo in parte giustifica il fatto che lo sfingolipide esercita effetti diversi, talvolta addirittura opposti, nei vari tipi cellulari, attraverso l'interazione con sottotipi

recettoriali differenti, che ha come conseguenza l'attivazione di vie di segnalazione distinte. Inoltre il pattern di espressione dei recettori per S1P può variare, all'interno di uno stesso tipo cellulare, in relazione al grado di differenziamento. Questo è stato per esempio dimostrato nella linea cellulare C2C12, mentre i mioblasti esprimono i recettori S1P₁, S1P₂ e S1P₃, con il loro differenziamento a miotubi, si ha un aumento dei livelli di S1P₃ ed una diminuzione dei livelli di S1P₂ [73].

Attraverso vari approcci sperimentali, quali l'uso di agonisti ed antagonisti o di oligodeossinucleotidi antisenso (ODN-AS) specifici per i diversi recettori, l'uso di sistemi cellulari superesprimenti un particolare sottotipo recettoriale e studi *in vivo* su topi *knockout* per i geni codificanti i vari recettori, è stato possibile caratterizzare i recettori per S1P da un punto di vista funzionale, cioè comprenderne le funzioni fisiologiche.

S1P₁

S1P₁ è espresso in vari tipi cellulari, in tutto l'organismo, [74], il che suggerisce che tale recettore abbia numerosi ruoli fisiologici. S1P₁ è accoppiato solamente alla proteina G_i [75], per cui tutti gli effetti da esso mediati risultano sensibili alla tossina della pertosse (PTx). La segnalazione attraverso G_i ha vari effetti: l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), con conseguente aumento dei livelli intracellulari di Ca²⁺, importantissimo mediatore di vari processi cellulari; l'attivazione di Ras, seguita dall'attivazione di ERK1/2 MAPK (Extracellular-signal Regulated Kinase), associata alla promozione della proliferazione cellulare; l'attivazione della fosfatidilinositolo 3-chinasi (PI3K) e di Akt, che promuovono la sopravvivenza cellulare attraverso l'inibizione dell'apoptosi. Questi effetti sono mediati dalla subunità βγ di G_i, mentre la subunità α è responsabile dell'inibizione dell'adenilato ciclasi (AC) [76,77], con conseguente riduzione dei livelli intracellulari di cAMP.

È stato dimostrato che Akt, una volta attivata da PI3K, fosforila S1P₁, e questo evento risulta necessario per l'attivazione, mediata dal recettore, della proteina G monomeric Rac [78], che a sua volta promuove l'assemblaggio dell'actina corticale e la migrazione cellulare [79].

Attraverso l'attivazione di queste vie di trasduzione del segnale, il recettore S1P₁ media quindi eventi di proliferazione e sopravvivenza cellulare, riorganizzazione

citoscheletrica, migrazione e morfogenesi in risposta a S1P in molteplici sistemi cellulari.

È interessante notare che S1P₁ è coinvolto, in vari tipi cellulari, nella motilità cellulare indotta non soltanto da S1P, ma anche da altri chemioattrattanti, come il PDGF. È stato dimostrato che la migrazione cellulare in risposta a PDGF, coinvolge la transattivazione di S1P₁ da parte di tale fattore di crescita [80]. Il PDGF, infatti, attiva la SphK1, e quindi la produzione di S1P, che fuoriesce dalla cellula e si lega a S1P₁, attivando così cascate di segnalazione intracellulare che culminano nella modulazione dell'attività di molecole coinvolte nel processo di migrazione cellulare [81]. Quindi, S1P, prodotta in seguito a stimolazione da parte del PDGF, media la risposta cellulare a tale fattore di crescita, attraverso l'attivazione di S1P₁. Secondo un modello alternativo, la transattivazione di S1P₁ non richiederebbe la produzione di S1P, ma la formazione di una piattaforma di segnalazione, attraverso l'interazione fisica tra questo recettore ed il recettore per il PDGF [82]. Qualunque sia il meccanismo coinvolto, l'interazione funzionale tra vie di segnalazione differenti è stata descritta anche per altri fattori di crescita e citochine, come sarà discusso in seguito.

L'importanza fisiologica di questo recettore è stata confermata anche da studi *in vivo* su topi *knockout* per il gene *s1p1*, che muoiono tra il tredicesimo ed il quattordicesimo giorno dello sviluppo embrionale per emorragia dovuta ad un'incompleta maturazione del sistema vascolare, a causa di anomalie nella migrazione delle cellule della muscolatura liscia dei vasi e dei periciti intorno all'endotelio dei vasi nascenti [83]. Questi dati mostrano quindi che S1P₁ ha un ruolo fondamentale nei processi di sviluppo vascolare e di angiogenesi. È stato inoltre dimostrato che questo recettore, attraverso la sua capacità di mediare la risposta chemiotattica a S1P, risulta essenziale per l'uscita dei timociti dal timo e dei linfociti dagli organi linfoidei secondari, ed è perciò coinvolto nella risposta immunitaria [84].

S1P₂

Il recettore S1P₂, espresso in molti tipi cellulari [85], è associato a diverse proteine G: G_i, G_q e G₁₃ [86,87,75]. Ne consegue che l'attivazione di questo recettore è capace di regolare vie di segnalazione diverse, a seconda della proteina G coinvolta. Attraverso la subunità βγ di G_i, S1P₂ attiva ERK1/2 MAPK, mentre attraverso la subunità α di G_q

attiva la PLC. Mediante un meccanismo non noto, insensibile a PTx e che quindi non coinvolge G_i , questo recettore è inoltre in grado di attivare l'AC [88] e due chinasi attivate da mitogeni, JNK (c-Jun NH2-terminal kinase) e p38 MAPK [89]. Poiché $S1P_2$ non è accoppiato alla proteina G_s , l'attivazione dell'AC potrebbe dipendere da un evento indiretto di fosforilazione [90]. Questo recettore regola inoltre l'attività di Rho e di Rac, due proteine G monomeriche con ruoli importanti nel riarrangiamento del citoscheletro e nel movimento cellulare [91], e quindi nella risposta migratoria delle cellule a S1P: mentre Rho viene attivata dal legame di S1P a $S1P_2$, l'attività di Rac ne risulta inibita [92], con conseguente promozione della formazione delle fibre da stress e inibizione della migrazione cellulare. $S1P_2$ ha quindi un ruolo opposto rispetto a $S1P_1$ nella regolazione di questo processo: mentre $S1P_1$, attraverso l'attivazione di Rac, regola positivamente la migrazione cellulare in risposta ad S1P e ad altri chemioattrattanti, viceversa la superespressione di $S1P_2$ in cellule ovariche di criceto cinese (Chinese Hamster Ovary cells, CHO), non solo riduce la migrazione in risposta a S1P, ma inibisce anche la migrazione indotta da IGF-I (Insulin-like Growth Factor-I), un potente chemioattrattante [92].

È stato inoltre osservato che $S1P_2$ è in grado di regolare positivamente oppure negativamente i fenomeni di proliferazione e sopravvivenza cellulare a seconda del tipo cellulare considerato [93,94].

Topi *knockout* per il gene $s1p_2$ non mostrano gravi anomalie anatomiche né fisiologiche, fatta eccezione per una aumentata eccitabilità neuronale, che fa ipotizzare il coinvolgimento di $S1P_2$ nella regolazione di tale processo [95]. Inoltre, siccome $S1P_2$ è essenziale per un corretto funzionamento dell'udito e del sistema vestibolare, questi topi *knockout* per il gene $s1p_2$, risultano avere un udito ridotto o addirittura essere sordi [96,97].

S1P₃

$S1P_3$, come $S1P_2$, risulta essere ampiamente espresso in vari tipi cellulari ed è associato alle proteine G_i , G_q e $G_{12/13}$, per cui, in seguito all'interazione con S1P, attiva varie vie di segnalazione. L'accoppiamento di $S1P_3$ a G_i è responsabile dell'attivazione di Ras, che a sua volta attiva ERK1/2 MAPK, e di PI3K, che attiva Rac [98], e dell'inibizione dell'AC, mentre, attraverso la proteina G_q $S1P_3$ attiva la PLC. Questo evento risulta

tuttavia parzialmente bloccato da PTx, suggerendo il coinvolgimento anche di G_i [98]. Attraverso l'associazione con G_{12/13}, S1P₃ determina inoltre l'attivazione di Rho.

S1P₃ è in grado, in seguito a stimolazione da parte di S1P, di promuovere la migrazione in vari tipi cellulari, attraverso l'attivazione di Rac [78,83]. Questo recettore regola inoltre la riorganizzazione del citoscheletro, l'assemblaggio delle giunzioni aderenti ed il differenziamento morfogenetico [99]. Sono invece scarsi i dati riguardanti l'effetto della segnalazione di questo recettore sugli eventi di proliferazione e sopravvivenza indotti da S1P.

È interessante notare che S1P₂ ed S1P₃, pur essendo accoppiati alle stesse proteine G, hanno effetti opposti sull'attivazione di Rac e quindi sulla migrazione cellulare. Questo può essere spiegato assumendo che i due recettori mostrino "preferenze" diverse per le proteine G a cui sono associati, e che perciò attivino preferenzialmente vie di segnalazione differenti.

Topi *knockout* per il gene *s1p3* non presentano alcuna anomalia fenotipica [85], in analogia con quanto osservato per S1P₂. È comunque interessante notare che topi omozigoti mancanti di entrambi i recettori, S1P₂ e S1P₃, sono caratterizzati da una marcata mortalità post-natale che sopraggiunge entro la terza settimana [100]. Questo dimostra chiaramente che entrambi i recettori sono coinvolti nello sviluppo embrionale e che la segnalazione combinata tra i due ha un ruolo essenziale nel corretto sviluppo dell'embrione.

S1P₄

A differenza dei primi tre recettori, ampiamente distribuiti in vari tessuti e linee cellulari, S1P₄ e S1P₅ hanno un pattern di espressione molto ristretto [101].

L'espressione di S1P₄ risulta limitata essenzialmente ai tessuti e alle cellule del sistema ematopoietico [102]. Questa osservazione ha fatto fin da subito ipotizzare un suo coinvolgimento nella regolazione della risposta immunitaria. Studi condotti *in vitro* hanno in effetti dimostrato che, attraverso l'attivazione di questo recettore, S1P promuove la sopravvivenza dei linfociti T e B [70]. Ulteriori studi effettuati sui linfociti T hanno inoltre dimostrato che S1P₄ inibisce la proliferazione di queste cellule e la produzione di citochine immunostimolanti, mediando così effetti immunosoppressivi, anche attraverso la promozione della produzione di citochine immunosoppressive [103].

È stato inoltre dimostrato che S1P promuove la migrazione cellulare in cellule CHO superesprimenti il recettore S1P₄, attraverso un meccanismo dipendente dall'attivazione di Cdc42, una GTPasi monomeriche che, insieme a Rho e Rac, ha un ruolo importante nella migrazione [104]. I dati relativi al coinvolgimento di S1P₄ nella risposta migratoria dei linfociti T sono invece contrastanti. Matsuyuki e collaboratori, in accordo con quanto è stato dimostrato nelle cellule CHO, sostengono che tale recettore, insieme a S1P₁, abbia un ruolo importante nel mediare la risposta migratoria dei linfociti T verso S1P [105]. Al contrario, Wang e colleghi hanno dimostrato che S1P₄ non influenza la migrazione dei linfociti T in risposta né a S1P né alle chemochine [103]. È plausibile che questa discrepanza sia dovuta al fatto che nel secondo caso sono stati utilizzati modelli cellulari in cui l'unico recettore per S1P ad essere presente o funzionalmente rilevante era S1P₄, mentre Matsuyuki e collaboratori hanno proposto che l'interazione fisica tra questo recettore e S1P₁ potrebbe essere alla base della loro capacità di mediare la risposta migratoria dei linfociti T. In effetti è stato dimostrato che i recettori per S1P, analogamente a quanto osservato per altri recettori accoppiati a proteine G, sono in grado di associarsi tra loro a formare omo- o eterodimeri, sebbene le proprietà funzionali di questi complessi molecolari rimangono al momento ignote [106].

Il ruolo di S1P₄ nel sistema immunitario *in vivo* non è stato ancora studiato, e questo recettore risulta ancora scarsamente caratterizzato da un punto di vista funzionale.

S1P₄ è associato con le proteine G_i [107] e G_{12/13} [108]. Questo recettore, attraverso una via mediata dalla subunità βγ di G_i, stimola l'attivazione di Cdc42, della PLC e di ERK1/2 MAPK [107,104]. Attraverso la proteina G_{12/13}, S1P₄ attiva Rho, stimolando così il riarrangiamento del citoscheletro e regolando quindi la forma e la motilità cellulare [108]. Infine, S1P₄, pur non essendo accoppiato alla proteina G_s, attiva l'AC [85].

S1P₅

L'espressione di questo recettore è limitata essenzialmente al sistema nervoso centrale, e in particolare agli oligodendrociti e agli astrociti [109,85]. S1P₅ è accoppiato a G_i e a G_{12/13}. Attraverso la subunità α di G_i, questo recettore inibisce l'AC. Inoltre, fatto molto interessante, S1P₅ è l'unico, tra i recettori per S1P, ad inibire ERK1/2 MAPK [110]. In cellule CHO, l'attivazione di questo sottotipo recettoriale da parte dello specifico

ligando, inibisce l'attivazione di ERK1/2 MAPK, e quindi la proliferazione, indotta da siero, molto probabilmente attraverso un meccanismo che coinvolge una tirosina fosfatasi [111]. L'inibizione di ERK da parte di S1P₅ risulta indipendente dalla proteina G_i, così come l'attivazione di JNK mediata dallo stesso recettore. I ruoli fisiologici di questo recettore risultano ancora sconosciuti.

Funzioni biologiche di S1P

S1P è un mediatore pleiotropico, in grado di esercitare numerosi effetti diversi in tutto l'organismo, regolando processi cellulari quali mitogenesi, apoptosi, migrazione e differenziamento.

S1P agisce come mitogeno in molti tipi cellulari, inducendo la sintesi di DNA e la proliferazione cellulare [112,14,113,114]. Come accennato in precedenza, non è ancora chiaro se S1P eserciti questa funzione agendo come secondo messaggero oppure attraverso l'attivazione dei recettori di membrana, poiché i dati ottenuti a riguardo sono contrastanti. È stato infatti osservato che, in molti casi, la proliferazione cellulare indotta da S1P risulta bloccata da inibitori della proteina G_i, come la PTx [59,115], suggerendo il coinvolgimento di recettori di membrana e di vie di segnalazione attivate da proteine G_i. Viceversa, in altri sistemi cellulari S1P stimola la sintesi di DNA quando viene iniettata direttamente all'interno della cellula [62], indicando che il lipide bioattivo medi tale funzione agendo come secondo messaggero. Nonostante la ben documentata azione di stimolazione della proliferazione da parte di S1P, è stato dimostrato che in alcuni sistemi cellulari, tra cui miofibroblasti epatici umani ed epatociti di ratto, il lipide bioattivo ha un effetto anti-proliferativo [116,117,73]. S1P ha quindi un duplice effetto sulla proliferazione cellulare, stimolandola o inibendola a seconda del tipo cellulare su cui agisce. Ancora una volta, l'azione cellula-specifica dello sfingolipide dipende probabilmente dal pattern di espressione dei recettori per S1P nella cellula bersaglio.

S1P ha un ruolo fondamentale nella regolazione del processo apoptotico. A tale proposito, è interessante notare che questo sfingolipide ha effetti opposti rispetto ai suoi precursori, Cer e Sph, nella regolazione della proliferazione e della sopravvivenza cellulare; mentre S1P promuove i suddetti processi ed inibisce la morte cellulare, Cer e

Sph inducono l'arresto del ciclo cellulare e l'apoptosi [118]. Ciò, unito al fatto che queste molecole sono tra loro interconvertibili, suggerisce che il destino della cellula possa dipendere non tanto dalla concentrazione intracellulare assoluta di ciascuno di questi sfingolipidi, ma piuttosto dai loro livelli relativi. Secondo questo modello, noto come "reostato degli sfingolipidi", la modulazione dell'attività degli enzimi responsabili della conversione di queste molecole l'una nell'altra, e cioè ceramidasi, SphK e SPPasi, potrebbe avere un ruolo fondamentale nella "scelta" tra sopravvivenza e morte cellulare, attraverso la regolazione del rapporto tra i livelli intracellulari di Cer, Sph e S1P. La conversione del Cer e della Sph a S1P, infatti, non solo determina la formazione di una molecola anti-apoptotica, ma rimuove anche molecole pro-apoptotiche, e viceversa.



Figura 6 Modello del reostato degli sfingolipidi.

In effetti, mentre vari stress stimolano la sintesi de novo del Cer o attivano la sfingomielinasi e la ceramidasi, determinando un aumento dei livelli di Cer e Sph e portando così all'apoptosi; molti altri stimoli, in particolare fattori di crescita e di sopravvivenza, attivano la SphK, con conseguente aumento dei livelli di S1P e protezione dalla morte cellulare [119]. Una delle prime osservazioni relative al ruolo di questo sfingolipide come fattore mitogenico riguarda, appunto, la capacità del PDGF e del siero di stimolare la crescita attraverso l'attivazione della SphK e quindi la sintesi di S1P [120].

Coerentemente con questi dati, è stato osservato che cellule superesprimenti la SphK1 mostrano un tasso di proliferazione più elevato ed inoltre risultano protette dall'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero, dal TNF α o dalla somministrazione di Cer nel mezzo extracellulare [121,38]. Viceversa, la superespressione della SPPasi è associata ad aumentati livelli di Sph e Cer, ed ha un effetto pro-apoptotico [122].

Il ruolo della SphK1 e di S1P nell'apoptosi è stato confermato da diversi studi che mostrano come queste due molecole siano in grado di attenuare gli effetti di inibizione della crescita e di induzione della morte cellulare esercitati da vari stimoli, quali Cer, TNF α e ligandi di Fas [119]. Gli effetti pro-apoptotici di diversi agenti che promuovono la formazione del Cer nella cellula, risultano, infatti, significativamente attenuati quando SphK è superespressa o attivata da un agonista. Viceversa, l'inibizione della SphK1 provoca l'accumulo di Cer all'interno della cellula e la morte cellulare per apoptosi [123,124]. La capacità di SphK1 di inibire la morte cellulare indotta da vari stimoli, che provocano un aumento dei livelli intracellulari di Cer, non è dovuta semplicemente al fatto che questo enzima riduce i livelli cellulari di una molecola pro-apoptotica, il trattamento con S1P mima, infatti, l'effetto della superespressione dell'enzima, il che dimostra che questa molecola di per sé ha un ruolo attivo nella regolazione del processo apoptotico [125].

I meccanismi molecolari alla base dell'azione anti-apoptotica della SphK1 e di S1P coinvolgono diverse molecole chiave delle vie di sopravvivenza e morte cellulare. Uno dei meccanismi attraverso cui S1P promuove la sopravvivenza è la modulazione dell'attività di MAPK aventi effetti opposti sulla regolazione della morte cellulare: è stato dimostrato che lo sfingolipide inibisce MAPK pro-apoptotiche, come JNK mentre attiva MAPK anti-apoptotiche, come ERK1/2 [126]. Oltre ad avere un ruolo nel promuovere la proliferazione, infatti, ERK1/2 MAPK ha anche un ruolo diretto nel bloccare l'apoptosi [126]. ERK può infatti interferire con la via intrinseca di induzione dell'apoptosi sia a monte del rilascio di citocromo *c* dai mitocondri, attraverso l'inattivazione di Bad, membro pro-apoptotico della famiglia di Bcl-2; sia a valle del rilascio di citocromo *c*, inibendo l'attivazione delle caspasi [127]. Cer e Sph modulano l'attività delle MAPK coinvolte nella regolazione della morte cellulare in maniera opposta rispetto a S1P, attivando JNK ed inibendo ERK1/2 MAPK, il che, in parte, spiega gli effetti antagonisti esercitati da questi sfingolipidi nella regolazione dell'apoptosi [44].

S1P esercita un effetto pro-sopravvivenza anche attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione coinvolti nella regolazione della crescita cellulare e nella protezione contro l'apoptosi, quali AP-1 e NF- κ B [128,129], e di Akt [130], che inibisce l'apoptosi bloccando il rilascio del citocromo *c* dai mitocondri indotto da Bad.

Attraverso la regolazione dell'attività di queste molecole, S1P inibisce la morte cellulare indotta da vari stimoli pro-apoptotici, quali la deprivazione di siero, il Cer, il TNF α e i ligandi di Fas, interferendo con le vie di segnalazione da essi attivate.

È stato ipotizzato che S1P possa inibire, agendo direttamente o indirettamente, la serina palmitoiltransferasi o la ceramide sintasi, enzimi chiave nella biosintesi del Cer [131,41]. Questa ipotesi è rafforzata dalla recente dimostrazione che, *in vitro*, S1P è in grado di interagire con la ceramide sintasi e di inibirne l'attività enzimatica [132]. La regolazione negativa della biosintesi del Cer potrebbe rappresentare un altro meccanismo attraverso il quale S1P promuove la sopravvivenza ed inibisce l'apoptosi.

Come già discusso in precedenza, non è ancora chiaro se l'azione anti-apoptotica di S1P sia ascrivibile all'attivazione delle vie di segnalazione dipendenti dai recettori di membrana o, piuttosto alla sua azione come messaggero intracellulare o ad entrambi i meccanismi, poiché i dati esistenti a riguardo sono contrastanti.

Dato il ruolo del "reostato degli sfingolipidi" nella regolazione della crescita cellulare e dell'apoptosi, non è sorprendente che il metabolismo degli sfingolipidi sia spesso deregolato nel cancro, una patologia caratterizzata dall'aumento della proliferazione cellulare e/o dalla diminuzione dell'apoptosi. A questo proposito, è interessante osservare che la SphK1 è frequentemente superespressa in diversi tumori solidi, a sostegno di un importante ruolo della biosintesi di S1P e di un alterato metabolismo degli sfingolipidi in generale nella tumorigenesi [133]. Oltre a proteggere le cellule tumorali dall'apoptosi e a stimolarne la proliferazione, S1P esercita un ruolo importante nella progressione tumorale anche attraverso la sua capacità di promuovere l'angiogenesi [44]. In questo modo, infatti, lo sfingolipide favorisce la vascolarizzazione della massa tumorale; evento necessario sia per l'accrescimento dei tumori solidi, in quanto garantisce loro l'apporto di ossigeno e nutrienti; sia per la loro capacità di dare metastasi, offrendo alle cellule tumorali la possibilità di invadere il circolo sanguigno e quindi i tessuti circostanti.

Il ruolo di S1P nella tumorigenesi è stato studiato da Visentin e collaboratori [134], i quali hanno dimostrato, in modelli murini, che il trattamento con un anticorpo specifico per tale molecola è in grado di ridurre la progressione tumorale e in alcuni casi di

eliminare il tumore. L'inibizione della crescita tumorale è stata attribuita alla capacità dell'anticorpo di neutralizzare l'azione pro-angiogenica, anti-apoptotica e di promozione della proliferazione indotta da S1P. Tali risultati mostrano che l'impiego di un anticorpo specifico per il suddetto lipide potrebbe rappresentare un approccio promettente nella terapia del cancro.

S1P è un importante regolatore, in diversi tipi cellulari, della migrazione cellulare, processo chiave in vari contesti, sia fisiologici che patologici, quali lo sviluppo embrionale, l'organogenesi, l'angiogenesi, la riparazione delle ferite e la risposta immunitaria.

La migrazione cellulare è un processo estremamente complesso, che richiede la riorganizzazione del citoscheletro, l'estensione dei lamellipodi, il rimodellamento della membrana e la formazione delle fibre da stress. Tutti questi eventi sono in gran parte controllati da proteine appartenenti alla famiglia delle Rho GTPasi: Rac, Rho e Cdc42. Rac e Cdc42 regolano il rimodellamento della membrana e la formazione dei lamellipodi, mentre Rho regola soprattutto i riarrangiamenti del citoscheletro [99]. Attraverso l'attivazione delle vie di segnalazione a valle dei propri recettori, S1P è in grado di modulare l'attività di queste molecole, e di regolare quindi il processo di migrazione.

Gli effetti dello sfingolipide sulla migrazione cellulare sono diversi, a seconda dei sottotipi recettoriali espressi dalla cellula su cui esso agisce e dei loro livelli relativi. La maggior parte dei dati riportati in letteratura su questo argomento riguarda esperimenti su cellule CHO superesprimenti i diversi sottotipi recettoriali, che hanno permesso di dimostrare che i recettori S1P₁ e S1P₃ stimolano la migrazione cellulare, mentre il recettore S1P₂ la inibisce [88]. Analoghi risultati sono stati ottenuti su cellule non trasfettate: è stato infatti osservato che nelle cellule endoteliali, che esprimono più alti livelli di S1P₁ e S1P₃ rispetto a S1P₂, S1P ha un effetto di stimolazione della migrazione [135], mentre in cellule della muscolatura liscia, dove predomina l'espressione di S1P₂, lo sfingolipide ha un'azione inibitoria sulla chemiotassi [136]. In mioblasti C2C12, S1P esercita una forte inibizione della migrazione indotta da IGF-I, un potente chemioattrattante. Attraverso l'impiego di vari approcci metodologici, mirati alla modulazione dell'espressione dei recettori specifici per S1P, è stato dimostrato che tale effetto inibitorio dello sfingolipide sulla migrazione indotta da IGF-I è da attribuirsi ad un meccanismo che coinvolge il legame del lipide bioattivo al suo recettore, nel caso specifico S1P₂, che mediante l'attivazione di RhoA annulla il potente effetto

chemioattraente dell'IGF-I sulle cellule C2C12 [137]. Nel loro insieme, questi dati indicano che il rapporto tra i livelli di espressione di S1P₁, S1P₂ e S1P₃ è un fattore critico nel determinare la risposta migratoria di una cellula a S1P. Questo rappresenta quindi un esempio di come S1P, attraverso la sua interazione con sottotipi recettoriali differenti, possa esercitare effetti diversi, in questo caso opposti, sui vari tipi cellulari, e dell'importanza, quindi, dei livelli relativi dei vari recettori espressi dalla cellula nel determinare la risposta cellulare allo sfingolipide.

Sorprendentemente, è stato osservato che in cellule di carcinoma mammario S1P regola la migrazione cellulare attraverso un meccanismo indipendente dai recettori [138]. Ancora una volta appare chiaro, quindi, che non è sempre possibile fare una netta distinzione tra i processi che il lipide bioattivo media agendo come secondo messaggero e quelli che, invece, media attraverso l'attivazione dei propri recettori.

S1P svolge numerose e importanti funzioni nel sistema cardiovascolare. Per il suo ruolo nella regolazione della sopravvivenza, della proliferazione e della migrazione delle cellule endoteliali e delle cellule della muscolatura liscia dei vasi, inoltre promuove i processi di vasculogenesi e di angiogenesi, sia in stati fisiologici, come lo sviluppo embrionale e la riparazione delle ferite; che patologici, come la vascolarizzazione della massa tumorale [123]. S1P è coinvolta nel controllo del tono vascolare, inducendo vasocostrizione oppure vasodilatazione a seconda che agisca sulle cellule della muscolatura liscia dei vasi oppure sulle cellule endoteliali. Lo sfingolipide induce infatti la contrazione delle cellule muscolari [139,140], mentre nelle cellule endoteliali determina l'attivazione dell'enzima monossido di azoto sintasi endoteliale, con conseguente produzione e rilascio in circolo di monossido di azoto, responsabile della vasodilatazione [141,142]. S1P modula, inoltre, la permeabilità dei vasi, attraverso la sua capacità di regolare l'assemblaggio delle giunzioni aderenti tra le cellule endoteliali [78]. Infine, influenza fortemente lo sviluppo [143] ed il funzionamento [144,145] del cuore, oltre ad avere un'azione protettiva nei confronti dei cardiomiociti nel danno da ischemia o da riperfusione[146].

S1P rappresenta un importante mediatore della risposta immunitaria, attraverso la sua capacità di evocare numerose risposte funzionali nelle cellule del sistema immunitario. Gli effetti indotti dal lipide bioattivo su queste cellule, dipendono dalla concentrazione dello sfingolipide e dal pattern di espressione cellulare dei suoi recettori [147,148]. Inoltre, i livelli di espressione dei recettori per S1P nelle cellule del sistema immunitario possono variare a seconda dello stato di attivazione immunologica di queste cellule, e

ciò ha come conseguenza una variazione della loro responsività allo sfingolipide [149,150,151].

S1P controlla il traffico dei linfociti nel sistema linfoide e la loro distribuzione nei tessuti, eventi centrali nella risposta immunitaria specifica, attraverso la sua capacità di regolarne la migrazione [152,153,84,154,155]. È stato anche proposto che S1P possa controllare il traffico dei linfociti attraverso la sua capacità di modulare la permeabilità della barriera endoteliale, regolando l'assemblaggio delle giunzioni cellula-cellula [156,70]. Inoltre, regola il differenziamento dei timociti e la loro uscita dal timo [157,158,70] e la risposta chemiotattica dei linfociti alle chemochine e ad altre citochine [159,160]. S1P risulta anche necessaria per il differenziamento dei vari sottotipi di linfociti T [161] e per la loro funzione, agendo attraverso vari meccanismi [162], tra cui la loro interazione con le cellule dendritiche e con i linfociti B [163] e la modulazione della produzione di citochine [163,103].

Un'altra funzione ben caratterizzata di S1P nel sistema immunitario riguarda la sua azione sui mastociti. Attraverso la sua azione sui linfociti, lo sfingolipide promuove la produzione di immunoglobuline di classe E (IgE), responsabili dell'attivazione dei mastociti. In risposta alla stimolazione da parte delle IgE si ha l'attivazione, in queste cellule, della SphK, con conseguente produzione di S1P, che viene rilasciata all'esterno e, agendo con modalità autocrina, regola la chemiotassi dei mastociti e la loro degranolazione, con rilascio dei mediatori responsabili della reazione allergica [164,165].

A conferma dell'importanza di S1P nella regolazione della risposta immunitaria, è stato scoperto che il farmaco immunosoppressore FTY720, impiegato con successo nella terapia di malattie autoimmuni e per impedire il rigetto di trapianto [166,167], è substrato della SphK2 e, nella sua forma fosforilata (FTY720-P), agisce come potente agonista di tutti i recettori per S1P ad eccezione di S1P₂ [168,169]. FTY720 esercita un effetto immunosoppressivo grazie alla sua capacità di alterare il traffico dei linfociti, inducendo linfopenia ed inibendo di conseguenza la risposta immunitaria cellulo-mediata [166]. Questo viene realizzato attraverso due diversi meccanismi: il farmaco, infatti, da un lato induce il processo di *homing* dei linfociti, cioè il loro ritorno dal sangue negli organi linfoidei secondari, e dall'altro ne inibisce l'uscita dal timo e dai linfonodi verso il sangue [170,171]. È stato dimostrato che l'alterazione del traffico dei linfociti, provocata dal farmaco, è dovuta al fatto che, in queste cellule, esso induce

l'internalizzazione, seguita da degradazione, del recettore S1P₁, che risulta, invece necessaria per l'uscita dei linfociti dal timo e dai linfonodi [84].

Oltre che nella risposta immunitaria specifica, S1P è coinvolta anche nell'infiammazione. È stato infatti dimostrato che varie citochine pro-infiammatorie stimolano la SphK, e quindi la produzione di S1P, che a sua volta induce la produzione di numerosi mediatori dell'infiammazione, quali le prostaglandine, rendendo conto, in questo modo dell'azione di tali citochine [172,173].

Infine, il lipide bioattivo, è coinvolto nella regolazione dell'omeostasi del calcio, attraverso diversi meccanismi. Agendo come secondo messaggero, lo sfingolipide provoca la mobilizzazione del calcio dalle riserve intracellulari in maniera indipendente dalla formazione di inositolo trisfosfato [61]. È stato osservato che vari stimoli esterni, tra cui l'EGF, noti per regolare l'omeostasi del calcio senza attivare la PLC, agiscono stimolando la SphK, e quindi la produzione di S1P [174]. Tuttavia, i bersagli molecolari di questa azione dello sfingolipide non sono stati ancora identificati.

S1P regola l'omeostasi del calcio intracellulare anche in maniera dipendente dall'attivazione dei recettori di membrana: alcuni di essi portano all'attivazione della PLC, con conseguente rilascio di Ca²⁺ dalle riserve intracellulari causato da inositolo trisfosfato.

S1P e muscolo scheletrico

S1P esercita importanti effetti biologici sulle cellule muscolari scheletriche, come dimostrato sia *in vivo* che *in vitro*. Lo sfingolipide risulta infatti essenziale per l'attivazione delle cellule satelliti del muscolo e per il loro ingresso nel ciclo cellulare, e quindi nel processo di rigenerazione muscolare [69], è coinvolto nell'accoppiamento eccitazione-contrazione [175], esercita un'azione protettiva durante l'affaticamento muscolare [176] ed agisce come fattore trofico contrastando l'atrofia muscolare indotta da denervazione [177].

S1P ha un ruolo critico nella regolazione del differenziamento miogenico dei mioblasti della linea cellulare C2C12, influenzando negativamente la proliferazione e favorendone il differenziamento in miotubi [73]. È stato infatti dimostrato che il lipide bioattivo, in seguito all'interazione con il recettore S1P₂, è capace di inibire la proliferazione cellulare indotta da siero e di stimolare efficientemente la miogenesi.

L'identificazione di S1P come agente anti-proliferativo e pro-differenziante rappresenta un dato particolarmente rilevante, dal momento che il processo di miogenesi richiede due eventi distinti, temporalmente separati: l'uscita dei mioblasti dal ciclo cellulare e l'induzione del programma miogenico. Questa modalità di azione di S1P è peculiare, dato che l'IGF-I, fisiologicamente coinvolto nella regolazione della miogenesi, stimola sia la proliferazione che il differenziamento cellulare [178,179].

In numerosi tipi cellulari il lipide bioattivo agisce come mitogeno [14,113,114], sebbene in altre linee cellulari sia stato dimostrato un suo effetto anti-proliferativo [116,117]. L'effetto anti-mitogenico esercitato da S1P è mediato dal recettore S1P₂, coinvolge l'attivazione di ERK1/2 MAPK, già identificato come effettore a valle di tale recettore. Mentre in letteratura sono riportati numerosissimi dati relativi all'importante ruolo della via di p42/p44 MAPK nella regolazione positiva dei processi proliferativi, è stato dimostrato anche il coinvolgimento di questa via di trasduzione del segnale nell'inibizione della proliferazione e nell'arresto del ciclo cellulare [180,181].

E' da notare, però, un aspetto estremamente interessante: S1P esercita effetti diversi in cellule satelliti e in mioblasti, promuovendo la proliferazione nel primo tipo cellulare e il differenziamento nel secondo; questa differenza è stata confermata in uno studio [69,73] dove cellule reserve sono state studiate in parallelo con mioblasti. Infatti nelle cellule reserve S1P è capace di stimolare la proliferazione in terreno a basso contenuto di siero, mentre non è capace di esercitare lo stesso effetto, ma, anzi di avere un'azione anti-proliferativa in mioblasti C2C12 [182]. Il fatto che S1P abbia un effetto pleiotropico sul muscolo scheletrico, attraverso il quale è capace di stimolare la proliferazione di cellule reserve, cellule staminali residenti del muscolo, e di indurre il differenziamento miogenico in cellule progenitrici già commissionate, i mioblasti, risulta estremamente interessante ed unico. La comprensione dei diversi meccanismi molecolari alla base dell'azione di S1P sull'eterogenea popolazione di cellule satelliti, risulterà di notevole aiuto per l'identificazione di nuovi target per il miglioramento della risposta rigenerativa in seguito a danno muscolare.

L'induzione del differenziamento dei mioblasti C2C12, da parte di S1P, dipende dal recettore S1P₂, come dimostrato dal fatto che regolando negativamente l'espressione di tale recettore viene meno l'effetto pro-miogenico del lipide bioattivo; viceversa, la superespressione di S1P₂ ha come risultato una notevole induzione del differenziamento, anche in mioblasti non stimolati con S1P [73]. È stato inoltre osservato, attraverso la manipolazione dell'espressione dei recettori, che mentre S1P₁

non influenza il processo di miogenesi, S1P₃ inibisce il differenziamento cellulare, mediando quindi una risposta biologica di significato opposto rispetto a S1P₂. Questa osservazione, oltre a mettere in evidenza che anche nei mioblasti i diversi recettori per S1P mediano effetti biologici antitetici, dimostra che in queste cellule S1P₂ ha un ruolo dominante sugli altri sottotipi recettoriali, visto che lo sfingolipide, nonostante la presenza di S1P₃ e la sua specifica azione anti-differenziante, stimola in maniera evidente il differenziamento miogenico.

S1P potrebbe avere un importante ruolo fisiologico nella rigenerazione muscolare in seguito a danno, non solo attraverso la sua capacità di attivare le cellule satelliti del muscolo, ma anche per la sua azione pro-miogenica. Il muscolo lesionato può facilmente venire a contatto con la molecola lipidica presente nel sangue; inoltre è plausibile che la concentrazione locale di questa molecola aumenti per azione di citochine pro-infiammatorie liberate nella sede della lesione.

Coerentemente con l'effetto anti-mitogenico e pro-differenziante di S1P nei mioblasti C2C12, è stato dimostrato che SphK è necessaria per l'arresto della proliferazione e per il differenziamento miogenico di queste cellule [183]. L'attività e i livelli intracellulari di questo enzima risultano infatti aumentati durante il differenziamento a miotubi. Inoltre, la superespressione stabile dell'enzima SphK1 è in grado di regolare positivamente l'espressione delle proteine muscolo-specifiche; al contrario, in cellule che esprimono la forma cataliticamente inattiva della SphK1, che funziona da dominante negativo dell'enzima, si osserva un'inibizione della comparsa dei markers miogenici. Nel loro insieme, questi dati indicano chiaramente che l'asse SphK/S1P/S1PR ha un ruolo fondamentale nella biologia delle cellule muscolari.

Crosstalk tra vie di trasduzione del segnale

Evidenze sempre maggiori hanno portato al sorgere di un nuovo concetto, ormai ben affermato, che riguarda la capacità di agonisti di recettori accoppiati a proteine G (GPCR) di attivare i recettori tirosin-chinasici (RTK) in assenza dei loro ligandi. Questo fenomeno, chiamato transattivazione è un importante processo che contribuisce alla risposta mitogenica di ligandi i cui recettori sono associati a proteine G. Altrettanto

recentemente è stato dimostrato che tale fenomeno è reciproco o bidirezionale, ossia i ligandi per RTK sono in grado anch'essi di transattivare i GPCR.

I fenomeni di crosstalk tra vie di trasduzione del segnale differenti interessano la regolazione di processi cellulari importanti quali la proliferazione, il differenziamento e la migrazione, sia in condizioni fisiologiche che patologiche, come l'inflammatione ed il cancro.

Anche S1P è in grado di transattivare vie di segnalazione a valle di recettori per fattori di crescita e citochine, e viceversa, ligandi per RTK sono in grado di attivare vie di segnalazione a valle dei recettori per lo sfingolipide. Come descritto precedentemente, molte delle molecole suddette, sono in grado di stimolare l'attivazione di SphK1 e quindi la produzione di S1P, che risultano necessarie per almeno alcune delle risposte cellulari a tali agonisti, dimostrando l'importanza dell'asse SphK1/S1P nel mediare l'azione di queste molecole.

I meccanismi, al momento meglio conosciuti, con i quali i GPCR possono transattivare direttamente i RTK sono due: ligando-dipendente e ligando indipendente. Nel primo caso il recettore tirosin-chinasi viene attivato dal suo ligando generato dalla precedente attivazione di un GPCR. Un esempio di questa modalità di transattivazione, è quello del recettore per l'EGF. L'acido lisofosfatidico (LPA), legandosi al proprio recettore induce l'attivazione di alcune metalloproteasi, appartenenti alla famiglia delle ADAM, queste portano al rilascio, per mezzo di taglio proteolitico, di proteine di membrana che non sono altro che ligandi ancorati al plasmalemma (shedding di membrana) [184]. Si tratta di precursori, nel caso specifico, HB-EGF, che una volta rilasciati, essendo molecole solubili, vanno a legarsi al proprio recettore attivandolo [185,186].

Il meccanismo ligando dipendente, sembra essere un meccanismo generale con il quale anche altri ligandi per GPCR, come trombina, angiotensina II, endotelina e acetilcolina transattivano i RTK portando all'attivazione di ERK e alla conseguente risposta mitogenica.

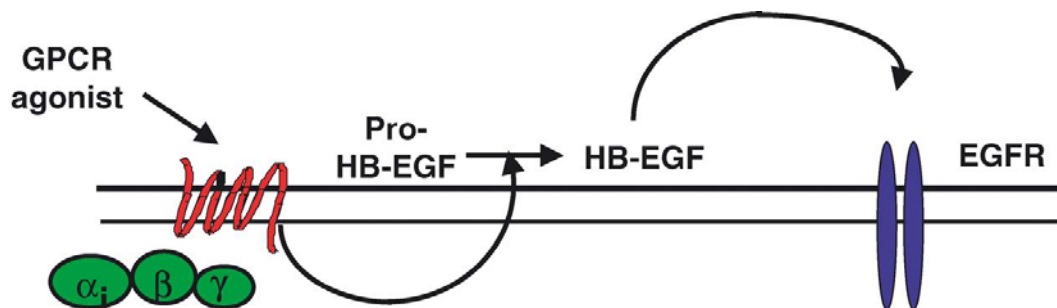


Figura 7 Schema della transattivazione del recettore dell'EGF per shedding di membrana.

Altra modalità è quella indipendente da ligando, che si può realizzare con la fosforilazione diretta, da parte del GPCR attivato, del recettore tirosin-chinasico; questo sembra che si attui attraverso l'attivazione, da parte del recettore accoppiato a proteine G, di chinasi citoplasmatiche come Pyk2 e Src, le quali fosforilerebbero il recettore tirosin-chinasico, attivandolo. Questa è un'altra modalità con la quale viene transattivato il recettore dell'EGF da parte di recettori accoppiati a proteine G attivati, in assenza del proprio ligando [187,188].

L'altra modalità di crosstalk richiede l'associazione fisica tra i due recettori, ossia GPCR e RTK sono associati fisicamente a formare una piattaforma di segnalazione. E' questo, per esempio, il caso che si realizza tra il recettore LPA₁ e il recettore TrkA, nella linea cellulare PC12. In questa linea cellulare tale modello risulta supportato da esperimenti in cui la fosforilazione di ERK1/2 MAPK, indotta da NGF (ligando del recettore tirosin-chinasico TrkA), risulta ridotta da pre-trattamento con Ki16425, un agonista inverso selettivo per il recettore LPA₁ [189].

Per l'NGF, come per altri fattori di crescita, succede anche il contrario, ossia la transattivazione, in questa linea cellulare dei recettori per S1P, S1P₁ e S1P₃, mediante il legame del fattore di crescita al recettore TrkA e successiva attivazione di SphK1; che sembra, NGF sia in grado di regolare sia a livello post-traduzionale che trascrizionale [190,191]. Nelle cellule PC12 questi due recettori attivano vie di segnalazione antagoniste che portano a differenti effetti sull'estensione del neurite, processo importante per la plasticità e il rimodellamento neuronale [190].

Come già accennato, molti fattori di crescita e citochine agiscono influenzando l'attività e/o l'espressione di SphK1 che porta conseguentemente alla produzione di S1P. Il primo esempio di questo tipo di crosstalk ad essere stato descritto riguarda l'interazione tra le vie di segnalazione di S1P e VEGF nelle cellule endoteliali.

Il VEGF, interagendo con i propri recettori di membrana, è in grado di attivare la SphK1 e di stimolare così la produzione di S1P, che promuove la sintesi di DNA e la proliferazione. Attraverso questo meccanismo, quindi, S1P media l'effetto mitogenico di tale fattore di crescita sulle cellule endoteliali [192]. D'altra parte, è stato dimostrato che almeno alcuni degli effetti esercitati dallo sfingolipide su queste cellule, sono dovuti alla sua capacità di transattivare i recettori per il VEGF [193,194]. S1P, attraverso l'interazione con i propri recettori di membrana, determina infatti la transattivazione dei recettori per il fattore di crescita, in maniera indipendente dal rilascio di VEGF, con conseguente attivazione delle vie di segnalazione a valle di tali recettori, coinvolte nella migrazione cellulare e nella produzione di monossido di azoto, che ha un ruolo fondamentale nella regolazione del tono vascolare e nell'angiogenesi.

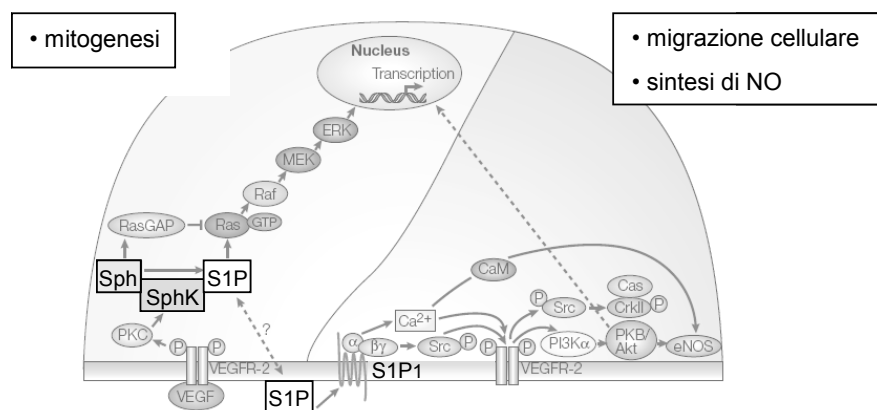


Figura 8 Crosstalk tra le vie di segnalazione di S1P e del VEGF.

Altri fattori di crescita e citochine come PDGF, IGF-I, e TNF α agiscono sull'enzima SphK1.

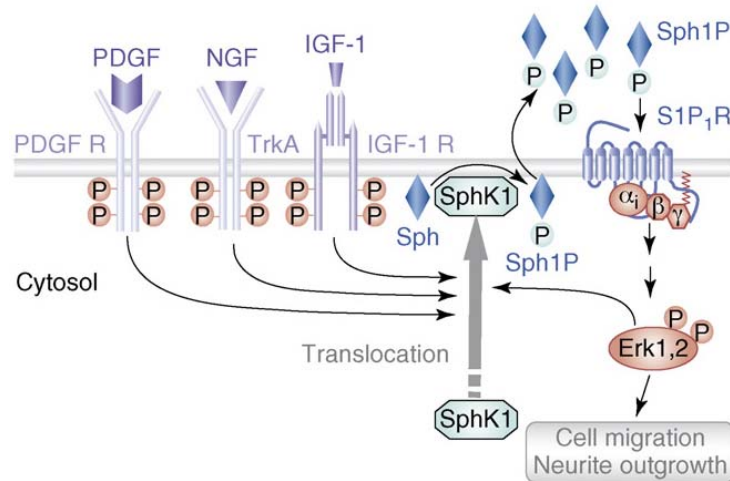


Figura 9 Crosstalk tra le vie di segnalazione di S1P e alcuni fattori di crescita.

Nel caso dell'attivazione di SphK1 da parte del $\text{TNF}\alpha$ è stato accertato che si realizza mediante fosforilazione di un residuo di serina (Ser225) ERK1/2 MAPK dipendente, quest'ultima attivata da TRAF-2 (una proteina associata al recettore del $\text{TNF}\alpha$), una volta che il $\text{TNF}\alpha$ si è legato al suo recettore [42]. Questo evento è sufficiente ad aumentare l'attività dell'enzima di ben 14 volte. Inoltre come già precedentemente detto, la fosforilazione sul residuo di serina della SphK1, favorendo l'interazione con fosfolipidi acidi di membrana, ne permette la sua rilocalizzazione in prossimità di quest'ultima, dov'è disponibile il substrato Sph. L'asse $\text{TNF}\alpha$ con SphK1/S1P sembra avere un ruolo molto importante nel processo di inizio e nel mantenimento dell'infiammazione in patologie polmonari [70,165,57,195,196]. Infatti, nei fibroblasti e nei macrofagi l'inibizione della SphK1 blocca la produzione e la secrezione di PGE_2 , indotta da $\text{TNF}\alpha$ [197,198].

Anche IGF-I attiva SphK1 in modo analogo al $\text{TNF}\alpha$, cioè in maniera ERK dipendente. L'attivazione della MAPK risulta però sia SphK1-dipendente, che S1P-dipendente, indicando che il crosstalk tra IGF e SphK1/S1P coinvolge un modello "inside out" di azione, cioè S1P agisce sia come secondo messaggero, che come messaggero extracellulare. Inoltre, molto probabilmente, in questo caso l'attivazione di SphK1 è sia a monte che a valle dell'attivazione di ERK, visto che il recettore tirosin-chinasico può di per sé attivare la MAPK la quale, risulta necessaria per l'attivazione di SphK1 [199]. Anche nel caso del PDGF è stato predetto un modello come descritto sopra, denominato da Hobson J. et al. "sequenziale". Al quale si contrappone quello "integrale" di Alderton

et al., in cui è prevista un' associazione stretta tra i due recettori, e cioè il recettore del PDGF (PDGF-R) e, nel caso specifico S1P₁.

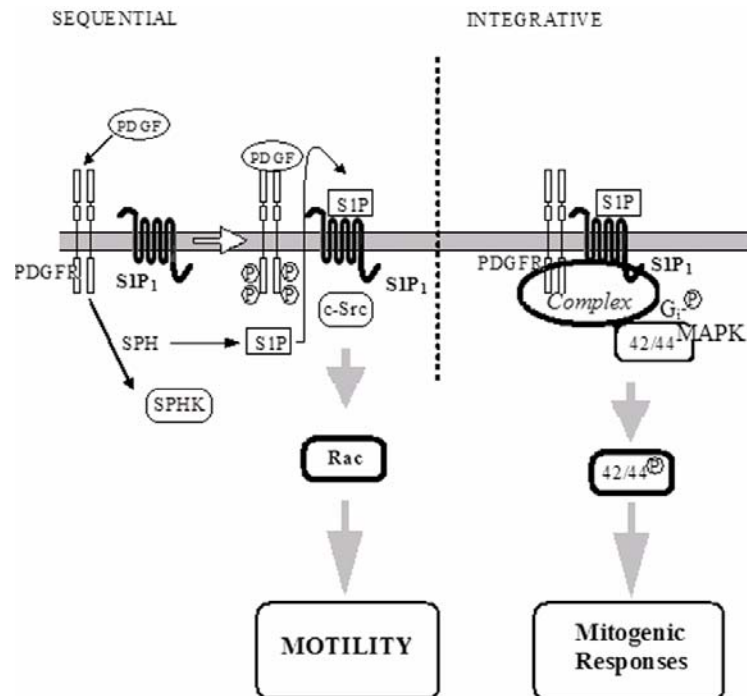


Figura 10 Modelli per il crosstalk tra le vie di segnalazione di S1P e il PDGF-R.

Quando il modello prevede la formazione di una piattaforma di segnalazione costituita dai due recettori, parte della segnalazione a valle del recettore per il fattore di crescita attivato, prevede il coinvolgimento delle proteine G [200]. Secondo questo modello la piattaforma è preformata, in quanto né l'aggiunta di S1P, né quella di PDGF ne variano la quantità [201]. Inoltre, il GPCR associato risulta costitutivamente attivo; ecco perché spesso vengono impiegati gli agonisti inversi, molecole capaci di inibire solo la quota di GPCR associata al recettore tirosin-chinasico, per poter distinguere i diversi meccanismi coinvolti. Molto probabilmente, una volta attivato, il recettore tirosin-chinasico fosforila la subunità α della proteina G eterotrimerica [202]. Ciò sarebbe reso possibile proprio dalla vicinanza dei due recettori. La subunità α fosforilata risulterebbe in uno stato in cui legherebbe preferenzialmente GTP piuttosto che GDP, per cui in uno stato attivato; inoltre la fosforilazione ne impedirebbe la riassociazione con la subunità $\beta\gamma$. Sembra che la subunità α possa così rappresentare un intermedio "attivo" con il quale il recettore del PDGF attiva ERK1/2 MAPK. Altra possibilità di meccanismo è il coinvolgimento della subunità $\beta\gamma$: una volta che la subunità α è stata fosforilata, la

subunità $\beta\gamma$ è resa disponibile per il PDGF-R e quindi in grado di interagire con proteine chinasiche come Src; questa associata alla subunità $\beta\gamma$ della proteina G eterotrimerica, fosforilerebbe Gab1, che è costitutivamente associata a Grb2. Questo processo sarebbe seguito dall'endocitosi clatrina- e dinaminaII-dipendente, del complesso S1P₁-PDGF-R. Ciò guiderebbe all'associazione della vescicola di endocitosi, contenente la piattaforma, con ERK 1/2 e con conseguente attivazione delle MAPK [203,204].

Anche la β -arrestina può essere attivata dai RTK, questa molecola di solito è coinvolta nell'internalizzazione dei GPCR per endocitosi clatrina-dipendente [202]. Questo avviene nei processi di desensitizzazione e downregolazione del recettore, ma anche nella propagazione del segnale attraverso interazione della vescicola con gli effettori citoplasmatici [205].

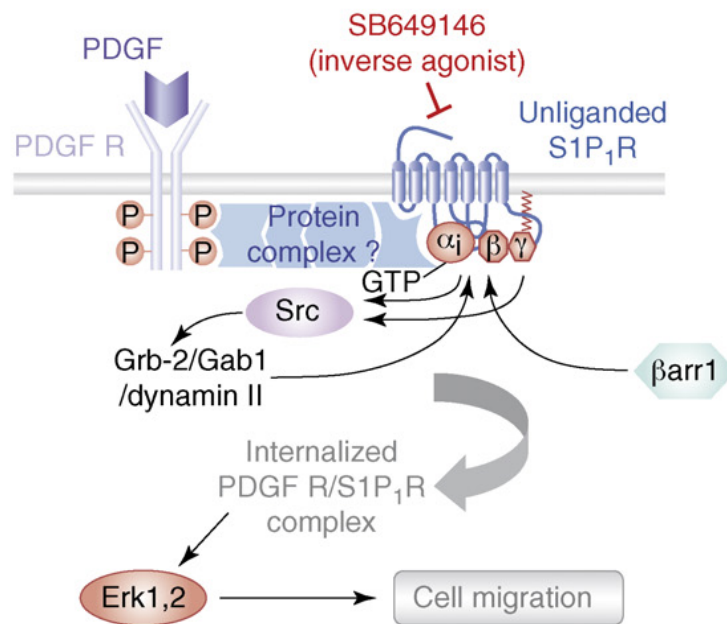


Figura 11 Modello per il crosstalk tra le vie di segnalazione di S1P₁ e il recettore del PDGF.

E' stato dimostrato che S1P₁ può essere fosforilato su un residuo di treonina da parte di Akt, attivato in modo G indipendente, e ciò risulta essenziale per l'attivazione di Rac che induce assemblaggio dell'actina corticale e la migrazione in cellule endoteliali esposte a S1P. E' possibile che ciò avvenga in cellule che esprimono Akt costitutivamente attivo; si può pensare che ligandi per RTK con a valle la via di

segnalazione PI3K-Akt, una volta legati ai propri recettori attivano tale via, e che, come bersaglio, tra gli altri, abbiano il recettore S1P₁ [79].

Anche nella sintesi degli ormoni steroidei gli sfingolipidi hanno un ruolo importante, ulteriormente avvalorato da studi in cui è stato dimostrato che Sph lega direttamente un fattore di trascrizione importante nell'espressione di enzimi chiave nella biosintesi del cortisolo; tale legame inibisce, infatti, la trascrizione di 17 α -idrossilasi/17,20-liasi, portando a una diminuzione della sintesi dell'ormone [206,207].

Quindi il bilanciamento tra i livelli di Sph e S1P può agire come un interruttore acceso/spento per la produzione degli ormoni steroidei in risposta all'ACTH (ormone adrenocorticotropo) nella corteccia surrenale.

D'altra parte nelle cellule MCF-7 è stato accertato che l'ormone steroideo 17 β -estradiolo (E2) stimola SphK1 in maniera dose dipendente e che l'attivazione dell'enzima è fondamentale per l'effetto mitogenico di E2 su queste cellule [208].

Ulteriori studi hanno messo in luce un nuovo meccanismo di crosstalk, denominato criss-cross: E2 attiva SphK e induce il rilascio di S1P, il quale successivamente si lega al recettore S1P₃ che porta all'attivazione delle metalloproteasi responsabili del rilascio di HB-EGF e infine della transattivazione del recettore dell'EGF [209].

Negli ultimi anni è stata dimostrata l'esistenza di un crosstalk anche tra le vie di segnalazione di S1P e del TGF β . Questa citochina esercita infatti alcuni dei propri effetti attraverso l'attivazione della SphK1 e la conseguente produzione di S1P. D'altra parte, alcune delle risposte cellulari indotte dallo sfingolipide sono dipendenti dall'attivazione delle proteine Smad, molecole chiave della via di segnalazione del TGF β . L'interazione reciproca tra la cascata segnalatoria di S1P e quella del TGF β ha un ruolo significativo in numerosi processi biologici.

Nei fibroblasti il TGF β provoca un incremento dell'attività di SphK1 indirettamente, inducendo un aumento dell'espressione dell'enzima [210]. Il TGF β causa inoltre la riduzione dell'espressione della SPPasi, con conseguente aumento dei livelli di S1P. Poiché l'induzione dell'espressione del gene della SphK1 in risposta al TGF β è relativamente precoce, Yamanaka e collaboratori hanno esaminato il coinvolgimento di tale enzima nella regolazione dell'attivazione trascrizionale indotta dalla citochina. È stato così dimostrato che la SphK1 media l'attivazione dell'espressione del gene codificante l'inibitore tissutale della metalloproteinasi-1 (TIMP-1, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1) indotta dal TGF β nei fibroblasti.

Il TGF β regola la SphK1, e quindi la produzione di S1P, anche nei miofibroblasti [97]. In queste cellule la citochina, oltre a stimolare l'espressione dell'enzima, ne aumenta anche l'attività catalitica attraverso meccanismi post-traduzionali, come dimostrato dal rapido incremento dei livelli intracellulari di S1P in risposta al trattamento con TGF β .

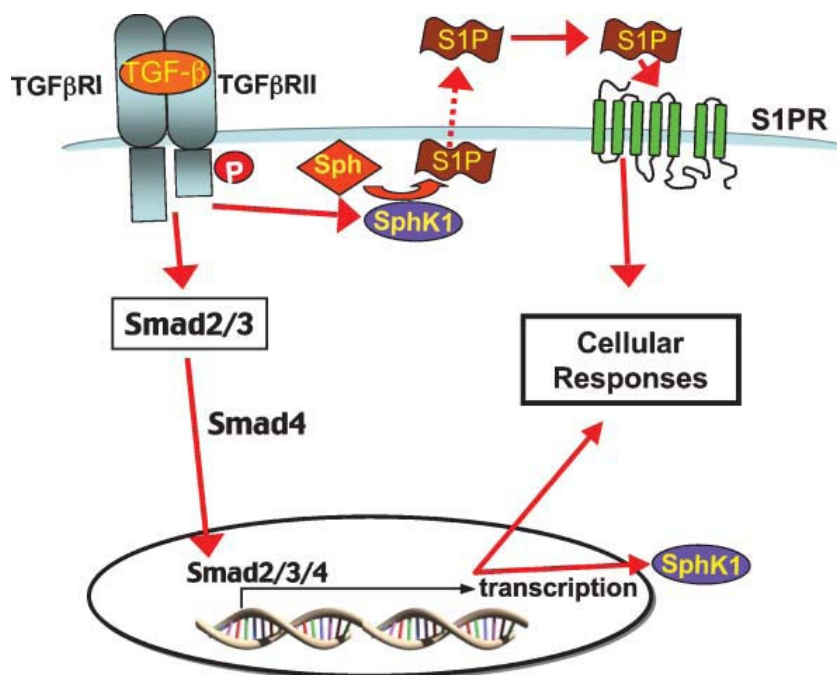


Figura 12 Modello per il crosstalk tra le vie di segnalazione di S1P e il recettore del TGF β .

La capacità di S1P di transattivare la via di segnalazione del TGF β è stata dimostrata per la prima volta nei cheratinociti umani e murini [211]. In questo tipo cellulare, lo sfingolipide induce la fosforilazione di Smad3, e quindi l'attivazione della capacità di tale proteina di regolare l'espressione genica e di indurre così risposte cellulari specifiche, in maniera indipendente dalla secrezione di TGF β . L'attivazione di Smad3 richiede la presenza sia dei recettori per S1P che di quelli per il TGF β , suggerendo una interazione fisica e funzionale tra questi recettori, che risulta essenziale per mediare gli effetti di S1P sui cheratinociti. In presenza di ODN-AS per Smad3, infatti, si ha una perdita dell'effetto chemiotattico e di inibizione della proliferazione esercitati da S1P su queste cellule. L'attivazione della cascata segnalatoria del TGF β gioca quindi un ruolo fondamentale nelle risposte biologiche indotte dallo sfingolipide, almeno nei cheratinociti. Similmente, studi effettuati su cellule dendritiche hanno dimostrato che quando l'espressione di Smad3 è inibita, S1P non è in grado di stimolare la migrazione

di queste cellule, indicando che anche in questo caso l'attivazione di tale proteina da parte di S1P, è essenziale nel mediare gli effetti indotti dallo sfingolipide [212].

Studi su miofibroblasti hanno dimostrato che l'agente immunomodulante FTY720, che nella sua forma fosforilata agisce come agonista dei recettori di S1P, (S1P₁ e S1P₃) induce il differenziamento di queste cellule in maniera dipendente da S1P₃ e dall'attivazione di Smad3 e indipendente dalla secrezione di TGFβ [213], confermando ulteriormente la sovrapposizione tra le vie di segnalazione di S1P e della citochina e la sua importanza nel mediare le risposte cellulari allo sfingolipide.

L'interazione tra le vie di S1P e del TGFβ è stata descritta anche in cellule mesangiali renali [214,215]. In queste cellule, S1P, attraverso il legame con i propri recettori, transattiva il recettore del TGFβ ed innesca così l'attivazione delle proteine Smad, con conseguente regolazione dell'espressione di specifici geni. Attraverso questo meccanismo lo sfingolipide è perciò in grado di mimare gli effetti indotti dalla citochina su queste cellule. Per spiegare l'attivazione delle Smad, dipendente da S1P, è stato proposto un modello secondo cui lo sfingolipide, indipendentemente dalla presenza di TGFβ, indurrebbe la formazione di un complesso recettoriale, costituito dai recettori per S1P e dal recettore TβR-II per il TGFβ.

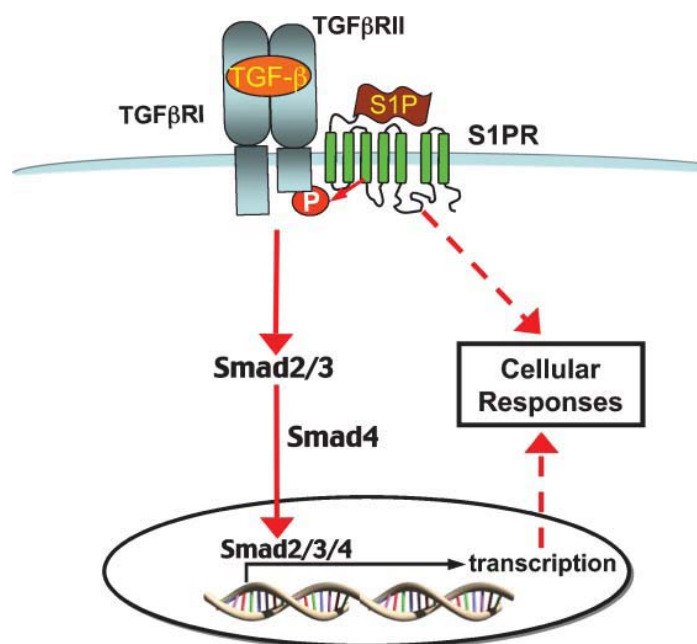


Figura 13 S1P induce la formazione di un complesso S1PR-TβR-II che interagisce con TβR-I.

Questo complesso sarebbe in grado di interagire con T β R-I, responsabile della fosforilazione delle Smad. È stato inoltre dimostrato che in cellule mesangiali renali anche FTY720 transattiva la via di segnalazione del TGF β e porta alla fosforilazione delle proteine Smad, ed è perciò in grado di evocare le risposte indotte dalla citochina in queste cellule [215].

Recentemente è stata dimostrata per la prima volta l'esistenza di fenomeni di crosstalk tra le vie di segnalazione di S1P e le vie di segnalazione del TGF β indipendenti dalle proteine Smad [216]. In cellule derivate da adenocarcinoma esofageo è stato infatti osservato che la capacità del TGF β di attivare ERK1/2 MAPK, e di promuovere quindi la migrazione e l'invasività cellulare, non coinvolge le proteine Smad, mentre dipende dall'attivazione della SphK1 da parte della citochina, e dalla conseguente produzione di S1P. In queste cellule, quindi, S1P, attraverso il legame al recettore S1P₂, media eventi di migrazione e di invasività cellulare indotti dal TGF β . Il crosstalk tra le vie di segnalazione dello sfingolipide e della citochina potrebbe pertanto avere un ruolo importante nella progressione tumorale. È interessante notare che l'attivazione della SphK1 indotta dal TGF β , potrebbe dipendere dalla fosforilazione dell'enzima da parte di ERK1/2 MAPK. D'altra parte, la SphK1 è necessaria per l'attivazione di ERK1/2 da parte del TGF β . È possibile, quindi, che la citochina inizialmente attivi p42/p44 MAPK in maniera indipendente dalla SphK1, attraverso meccanismi molecolari ancora sconosciuti. La conseguente attivazione della SphK1 potrebbe poi stimolare ulteriormente ERK1/2 MAPK in maniera dipendente dalla produzione di S1P e dal suo legame a S1P₂. Si verrebbe così a creare un meccanismo di regolazione positivo responsabile dell'amplificazione del segnale del TGF β . È interessante notare, infine, che sebbene il recettore S1P₂ sia generalmente associato all'inibizione della migrazione cellulare [217,218], nelle cellule di adenocarcinoma esofageo l'attivazione di tale recettore, da parte di S1P, risulta necessaria per la migrazione indotta dal TGF β . Ciò potrebbe essere dovuto al fatto che in queste cellule S1P₂ attiva preferenzialmente vie di segnalazione che promuovono la migrazione cellulare.

Appare quindi chiaro che il crosstalk tra le vie di segnalazione dei GPCR e dei RTK crea un network estremamente complesso. S1P media un ampio spettro di effetti biologici cellulo-specifici come conseguenza dei recettori specifici per lo sfingolipide espressi sulla superficie cellulare, ognuno dei quali attiva distinte vie di segnalazione. In più il crosstalk tra le vie di segnalazione di citochine, fattori di crescita e S1P è probabilmente in grado di spiegare le diverse risposte cellulo-specifiche. In questo

contesto molti ligandi per GPCR possono promuovere una risposta mitogenica transattivando RTK. In passato, recettori per molecole come IGF-I, PDGF e EGF che spesso mediano anche la crescita e la migrazione di cellule tumorali, e quindi in grado di mediare l'invasività e la capacità metastatica di quest'ultime, sono stati il bersaglio per nuovi farmaci chemioterapici. Data la varietà delle risposte cellulari indotte da tali fattori di crescita e l'importanza che queste esercitano sull'omeostasi cellulare, l'inibizione per lungo tempo di questi recettori non è però tollerata. Visto le recenti scoperte sulla transattivazione da parte di GPCR, l'uso di molecole, come per esempio gli agonisti inversi, potrebbe rappresentare, in futuro, un efficace approccio nella lotta contro il cancro. L'uso di queste molecole, infatti, inibirebbe solo la quota di recettori fisicamente e funzionalmente associati a formare un complesso e quindi potrebbe presentare effetti collaterali più tollerabili ed essere quindi, un promettente approccio nella cura dei tumori.

Fattore di necrosi tumorale α (TNF α)

Il fattore di necrosi tumorale α (TNF α) è una citochina con attività antitumorale e di modulazione della risposta immunitaria, prodotta principalmente da monociti e macrofagi [219].

Nella sua forma solubile il TNF agisce come omotrimerico, viene prima sintetizzato come pro-TNF, un peptide di 26 kDa ancorato alla membrana, che in seguito viene liberato grazie al taglio operato dall'enzima convertitore del TNF (TACE).

La famiglia dei recettori del TNF (TNF-R) può essere classificata in tre gruppi principali [220].

I recettori appartenenti ai primi due gruppi presentano, nella porzione citoplasmatica, dei domini che possono interagire con proteine adattatrici, capaci di attivare sia l'apoptosi, attraverso la cascata delle caspasi; sia la proliferazione e sopravvivenza, attraverso MAPK e NF- κ B.

I recettori del terzo gruppo non contengono domini o motivi con funzione di segnalazione intracellulare, ma competono con i recettori degli altri due gruppi per il ligando.

I recettori per il TNF α non hanno attività enzimatica e la trasduzione del segnale avviene attraverso il reclutamento di proteine effettrici. Il primo evento è il legame

dell'omotrimerico del TNF al dominio extracellulare del recettore, questo induce trimerizzazione del recettore stesso, e il rilascio delle proteine inibitrici dal dominio death (SODD) presente nella porzione citoplasmatica del recettore.

TRADD può, così, legarsi ai domini death e reclutare altre proteine adattatrici come RIP (receptor-interacting protein), TRAF-2 e FADD.

Attraverso FADD viene reclutata e attivata, presumibilmente con un meccanismo di autoprocessamento, la caspasi 8, che dà il via a una cascata di proteasi che porta all'apoptosi. TRAF-2, invece, recluta le proteine inibitrici dell'apoptosi-1,2 (IAP-1 e IAP-2); inizia, così, una via che porta alla fosforilazione/attivazione di fattori di trascrizione (c-Jun, c-Fos, ATF-2) grazie alle MAPK. Anche RIP viene attivata da TRAF-2 ed è importante per l'attivazione di NF- κ B.

L'attivazione di NF- κ B indotta dal TNF è dovuta alla poli-ubiquitinazione e degradazione, conseguente alla fosforilazione, dell'inibitore di NF- κ B (I κ B), che normalmente mantiene NF- κ B nel citoplasma [221]. La fosforilazione dell'inibitore è dovuta al complesso multiproteico della I κ B chinasi, che viene reclutato da TNF-R1 entro pochi minuti dalla somministrazione del TNF.

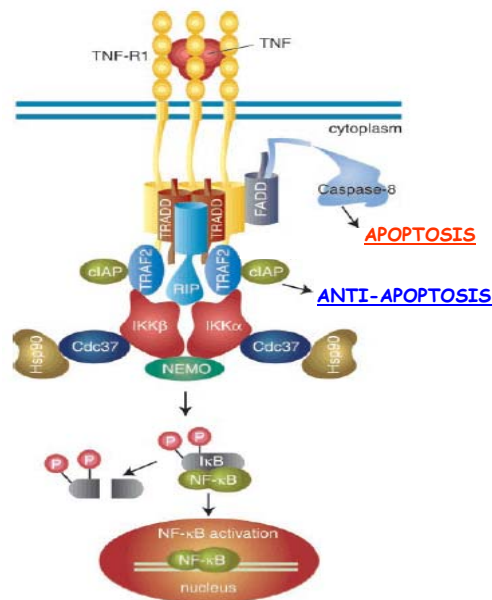


Figura 14 Via di trasduzione del segnale del TNF alpha.

Il TNF può indurre due forme di morte cellulare: (a) apoptosi, caratterizzata da condensazione e frammentazione della cromatina dovuta all'azione delle caspasi, formazione di estroflessioni nella membrana e di corpi apoptotici; (b) morte cellulare

simile alla necrosi, indipendente dalle caspasi, con poca condensazione della cromatina, mancanza di frammentazione nucleare e di interruzione dell'integrità della membrana [222].

La via di segnalazione di TNF-R1, però, può portare alla morte cellulare solo in alcune circostanze, infatti può promuovere la trascrizione e l'attivazione di geni infiammatori [223]. Questo suggerisce l'esistenza di un meccanismo che sopprime il segnale apoptotico: TNF-R1 può reclutare TRAF-2 e RIP e attivare una via che, attraverso NF- κ B e JNK, ha esito in senso infiammatorio, proliferativo e, quindi, anti-apoptotico [224].

Pertanto TNF-R1 è l'inizio di una complessa segnalazione che può promuovere sia la morte cellulare che la sopravvivenza.

Il TNF α è stato originariamente conosciuto come "cachectina", a lungo associato con patologie del muscolo scheletrico: elevati livelli cronici della citochina sono associati con patologie come AIDS e cancro e mediano il danno a livello del muscolo; nuove evidenze sperimentali hanno suggerito che il TNF α possa però, anche svolgere un ruolo fisiologico in questo tessuto, infatti nel muscolo scheletrico umano, sano e in quello di ratto viene sintetizzato TNF α [225], inoltre è stato osservato che il livello della citochina in circolo in individui sani, aumenta significativamente dopo uno sforzo [226,227].

Il TNF α può avere effetti simili a quelli di un fattore di crescita favorendo la proliferazione e il differenziamento in molti tipi cellulari [219]. In particolare, nei miociti cardiaci adulti, che hanno molte caratteristiche comuni ai miociti del muscolo scheletrico, il TNF α può provocare una crescita ipertrofica e favorire la sintesi di proteine muscolari, come la catena pesante della miosina (MHC) e l' α -actina [228].

Per lo sviluppo del muscolo scheletrico è importante la via di segnalazione che, attraverso TRAF-2, porta all'attivazione di NF- κ B [229,230]. Topi *knockout* per TRAF-2, infatti, nascono con una grave riduzione della massa muscolare, inoltre l'incremento dell'espressione di TRAF-2 durante il differenziamento di mioblasti C2C12 suggerisce la necessità di questa via di segnalazione per lo sviluppo normale del muscolo [231]. È stato visto che TRAF-2 può interagire con la SphK1 attivandola, il risultato sarebbe un incremento dei livelli di S1P, che potrebbe agire in modo autocrino e/o paracrino legandosi ai propri recettori e attivando le conseguenti vie di segnalazione, oppure agendo come secondo messaggero attivando, ad esempio, NF- κ B, essenziale per la prevenzione dell'apoptosi [232]. NF- κ B, fra le altre cose, incrementa l'attività del

fattore di risposta al siero (SRF) [233,234], un fattore di trascrizione essenziale per la miogenesi, che controlla l'espressione di geni muscolo-specifici come, per es. quelli per l' α -actina [235,236,237], per la catena leggera della miosina 1A [238] e per la distrofina [239]. Si può affermare, quindi, che SRF gioca un ruolo importante nella regolazione del differenziamento dei miociti.

È stato dimostrato che nei mioblasti C2C12 l'espressione del TNF α è incrementata notevolmente da uno stimolo differenziativo, come la deprivazione da siero; questo suggerisce che l'aumento della citochina, nei miociti sia un evento precoce durante la miogenesi [240]. Il TNF α endogeno promuove l'espressione di geni muscolo-specifici ed è richiesto per il normale differenziamento dei mioblasti, processo in cui interviene attivando NF-kB e SRF.

Fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF)

Il fattore di crescita derivato dalle piastrine (PDGF), fu isolato alla fine del 1970 come un fattore derivato, appunto, dalle piastrine in grado di promuovere la proliferazione di cellule mesenchimali [241,242,243,244]. Esistono due geni distinti che codificano per recettori in grado di legare il PDGF; due diverse subunità possono omo- o eterodimerizzare, dando origine a tre diversi recettori funzionalmente attivi PDGF-R $\alpha\alpha$, PDGF-R $\beta\beta$ e PDGF-R $\alpha\beta$. Teoricamente a questi recettori possono legarsi, non con la stessa affinità, cinque diverse forme di PDGF: PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC e PDGF-DD, ciascuna costituita da due catene polipeptidiche; comunque *in vivo* ci sono evidenze funzionali solo per alcune interazioni ligando-recettore: l'omodimero- $\alpha\alpha$ legherebbe solo PDGF-AA e -CC, mentre il recettore PDGF-R $\beta\beta$ legherebbe solo ed esclusivamente PDGF-BB [245].

Le isoforme PDGF-CC e PDGF-DD, a differenza delle altre, vengono secrete come forme inattive, e attivate in seguito a taglio proteolitico.

Originariamente identificato in quanto in grado di promuovere la proliferazione delle cellule mesenchimali, in seguito è stato appurato essere capace di indurre anche risposte come la migrazione cellulare e la sopravvivenza [246].

Il PDGF-R attivato induce varie risposte cellulari dipendenti dal tipo cellulare su cui agisce e dal microambiente locale.

In genere il PDGF esercita un effetto mitogenico e anti-apoptotico e in aggiunta promuove la migrazione cellulare; risulta perciò in grado di regolare molti processi cellulari sia fisiologici che patologici: svolge un ruolo importante durante lo sviluppo di alcuni tessuti e organi, durante il processo di riparazione tissutale, ma anche nella progressione cellulare e nel processo di metastatizzazione [245].

Il recettore del PDGF è un recettore tirosin-chinasico per cui, in seguito al legame con il proprio ligando, dimerizza, dopodichè si ha transfosforilazione su specifici residui di tirosina tra recettori vicini. Quest'evento è seguito dal reclutamento di proteine citosoliche, aventi motivi strutturali che permettono l'interazione fisica con i residui tirosinici fosforilati, come per es. Grb2, il quale, a sua volta, in seguito all'interazione con una proteina avente motivi SH3, Sos1 porta all'attivazione della via delle MAPK. La via delle MAPK attiva la trascrizione genica con conseguente stimolazione della proliferazione, del differenziamento e della migrazione cellulare [247,248].

Oppure il recettore, tramite la propria attività tirosinchinasica, attiva direttamente, mediante fosforilazione, proteine importanti, la più nota delle quali, è la PLC γ che causa incremento del Ca²⁺ intracellulare e conseguente attivazione della PKC. Gli effetti mediati dalla PLC γ attivata dal PDGF, includono la stimolazione della proliferazione e della motilità cellulare [249]. Altre proteine note nella via di segnalazione a valle del PDGF-R sono Src e PI3K, quest'ultima ha, fra i suoi effettori, Akt/PKB. L'attivazione della PI3K, causata dal PDGF induce la riorganizzazione dell'actina per il movimento cellulare, la proliferazione e inibisce l'apoptosi [250].

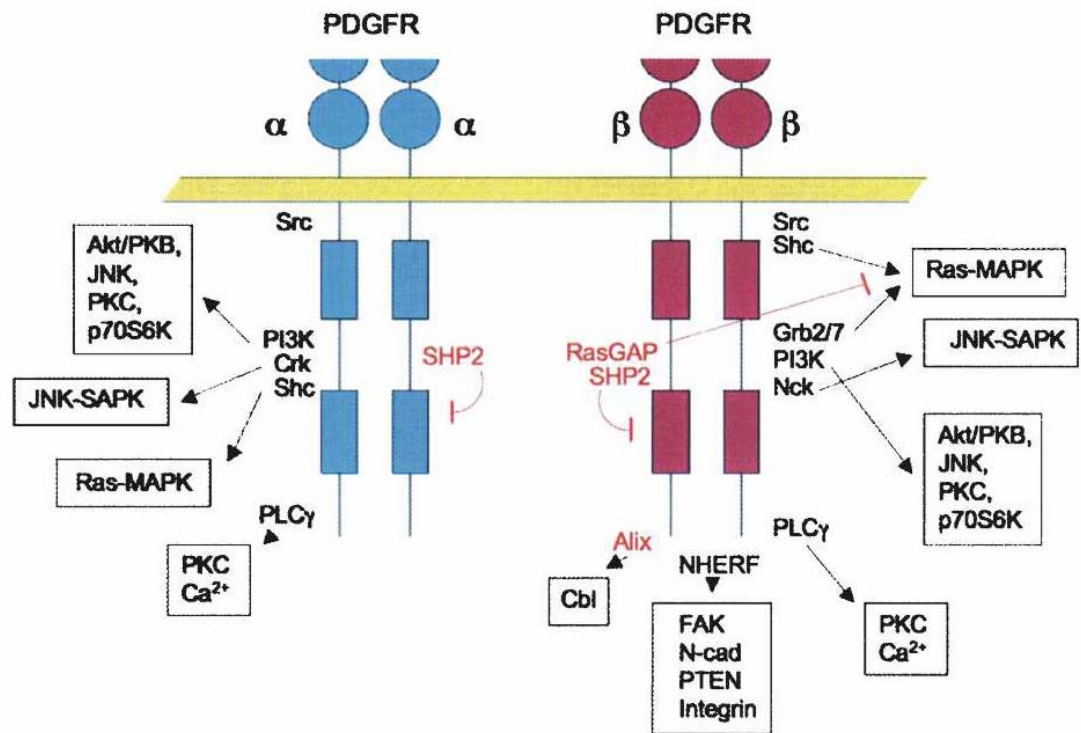


Figura 15 Via di trasduzione del segnale del PDGF.

PDGF-R interagisce anche con le integrine, le quali aumentano la proliferazione, la migrazione e la sopravvivenza cellulare [251,252].

L'interazione del PDGF-R con le integrine facilita la localizzazione del recettore e l'interazione di questo alle adesioni focali, che sono il sito di inizio di molte segnalazioni e del crosstalk [253].

E' stato dimostrato che IGF-I e PDGF svolgono un'azione simile sulla sopravvivenza dei mioblasti sfruttando però, due vie di segnalazione diverse: IGF-I induce una sostenuta attivazione della via PI3K/Akt e una transiente attivazione delle MAPK, PDGF provoca esattamente il contrario [254].

In mioblasti L6, PDGF agisce come mitogeno ma anche come potente inibitore del differenziamento miogenico. Infatti il trattamento di mioblasti L6 con PDGF-BB aumenta la velocità di sintesi del DNA e stimola la proliferazione, mentre in un terreno differenziante l'aggiunta di PDGF-BB previene la fusione di mioblasti confluenti e sopprime il processo di differenziamento [255].

Ci sono evidenze che il PDGF potrebbe agire incrementando il numero dei mioblasti coinvolti nella rigenerazione muscolare, in seguito a trauma, stimolandone la proliferazione e inibendone il differenziamento [256].

In miotubi ottenuti dalla fusione di mioblasti C2C12, si ha una notevole riduzione della segnalazione a valle del PDGF- β , rispetto ai mioblasti, la fosforilazione di specifiche tirosine risulta diminuita durante il differenziamento e quindi di conseguenza le vie come PI3K/Akt e MAPK sono regolate negativamente [257].

Il Fattore di Crescita Trasformante β (TGF β)

Il Fattore di Crescita Trasformante β (TGF β , Transforming Growth Factor β) è un membro di una famiglia di proteine multifunzionali strutturalmente correlate, la famiglia del TGF β , coinvolte nella regolazione di importanti processi cellulari, quali proliferazione, differenziamento, adesione, migrazione ed apoptosi, e dello sviluppo [258,259,260,261,262].

Il TGF β è prodotto da numerosi tipi cellulari e regola una vasta gamma di processi biologici, in numerosi tessuti [263]. Una caratteristica che contraddistingue questa citochina è la sua azione cellula-specifica, cioè la sua capacità di esercitare effetti diversi a seconda del tipo cellulare su cui agisce [264,265].

I membri della superfamiglia del TGF β sono omo- o eterodimeri, i cui monomeri sono legati da ponti disolfuro, che si formano per maturazione proteolitica di precursori inattivi che vengono secreti in forma monomerica nel mezzo extracellulare.

I membri della famiglia del TGF β funzionano come molecole segnale, extracellulari che trasducono il segnale mediante l'interazione con specifici recettori di membrana. Tali recettori possiedono un unico segmento transmembrana e sono caratterizzati da una porzione extracellulare glicosilata e da una porzione intracellulare nella cui regione C-terminale è presente un dominio catalitico chinasi, con specificità verso i residui di serina e treonina. Sulla base delle loro caratteristiche strutturali e funzionali, i recettori per questa famiglia di ligandi sono suddivisi in due sottofamiglie: i recettori di tipo I (T β R-I) ed i recettori di tipo II (T β R-II).

La caratteristica distintiva dei recettori di tipo I è data dalla presenza, immediatamente a monte del dominio catalitico, di una regione altamente conservata, indicata come dominio GS. In seguito al legame del TGF β , il dominio GS viene fosforilato, e questo evento ha un ruolo cruciale nell'attivazione del recettore stesso e di conseguenza, nella trasduzione del segnale [266]. I recettori di tipo II sono invece caratterizzati, dal punto

di vista funzionale, dal fatto che il loro dominio catalitico chinasi è costitutivamente attivo.

La via di trasduzione del segnale del TGF β richiede sia recettori di tipo I che di tipo II. Alcuni studi con recettori chimerici hanno infatti dimostrato che complessi omodimerici, costituiti da recettori di tipo I oppure di tipo II, sono incapaci di generare una risposta cellulare, mentre complessi contenenti i domini citoplasmatici di entrambi i tipi di recettore sono capaci di mediare la segnalazione del TGF β [267,268,269].

La ricerca, a livello della membrana cellulare, di molecole capaci di legare la citochina ha rivelato la presenza di un terzo tipo di recettori, indicati appunto come recettori di tipo III. Il betaglicano e l'endoglin sono entrambi capaci di legare il TGF β . Tali recettori, a differenza di quelli di tipo I e di tipo II, hanno un dominio intracellulare privo di qualsiasi sequenza che possa essere coinvolta nella trasduzione del segnale. Sembra che la loro funzione sia quella di legare il TGF β e presentarlo ai recettori di tipo I e II, coinvolti invece nella trasduzione del segnale [259].

La via di segnalazione del TGF β prevede che lo specifico ligando si leghi inizialmente a T β R-II. Questo legame provoca una variazione conformazionale del recettore, che ne permette il riconoscimento da parte di T β R-I. In presenza dello specifico ligando, i due tipi di recettori vengono quindi a trovarsi in stretta prossimità e a formare un complesso recettoriale eterodimerico. In realtà, essendo il ligando un dimero, attorno a ciascuna molecola si possono formare due complessi recettoriali. Il risultato è quindi la formazione di un complesso eterotetrameric per ciascuna molecola di ligando. In seguito alla oligomerizzazione dei recettori, T β R-II, costitutivamente attivo, fosforila tre residui di serina e due di treonina nel dominio GS di T β R-I, con conseguente attivazione del dominio ad attività serina/treonina chinasi di T β R-I. La fosforilazione del recettore ne aumenta l'affinità [270] per gli effettori intracellulari della via di trasduzione del segnale del TGF β , le proteine Smad, la cui attivazione dipende dalla fosforilazione da parte di T β R-I ed ha come risultato la regolazione dell'espressione di un numero elevato di geni.

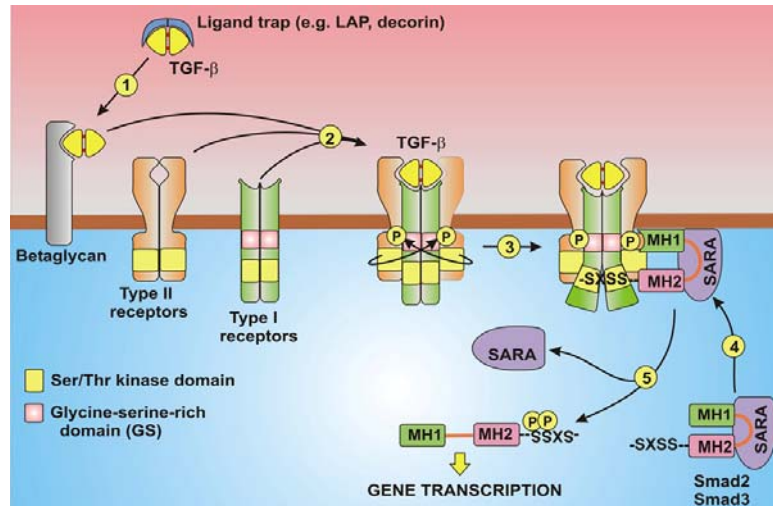


Figura 16 La via di trasduzione del segnale del TGFβ

Le proteine Smad, il cui nome deriva dai geni omologhi *Sma* (Small) e *MAD* (Mother Against Dpp) rappresentano una famiglia di fattori trascrizionali in grado di regolare l'espressione di geni distinti e di mediare quindi risposte cellulari diverse [271].

Le proteine Smad consistono di due domini globulari, indicati come MH1 e MH2 (Mad Homology 1 e 2), rispettivamente all'N-terminale e al C-terminale, collegati da una regione flessibile. Il dominio MH1 è responsabile del legame al DNA [272], mentre il dominio MH2 media l'interazione con varie proteine coinvolte nel funzionamento delle Smad [273,270,274].

Le proteine Smad sono suddivise in tre gruppi, sulla base delle loro caratteristiche strutturali e funzionali: cinque Smad regolate da recettore (R-Smad), una Smad mediatrice comune (Co-Smad) e due Smad inibitorie (I-Smad).

Le R-Smad comprendono le proteine Smad1, Smad2, Smad3, Smad5 e Smad8. La loro attivazione richiede che esse vengano fosforilate su due residui di serina del dominio MH2, dall'attività protein-chinasica del recettore di tipo I attivato dal legame con il ligando. Tale modificazione chimica causa un'alterazione strutturale delle R-Smad, abilitandole a formare complessi eterodimerici con Smad4 [274], appartenente alle proteine Co-Smad, non fosforilabili da alcun recettore, in quanto prive della sequenza che viene fosforilata all'MH2 delle R-Smad [275,276,277,278], ma indispensabili per la formazione di complessi trascrizionali funzionali [279].

Infine, le proteine Smad Inibitorie (I-Smads), comprendenti le proteine Smad6 e Smad7, agiscono in opposizione alle R-Smads e alle Co-Smads: esse formano infatti associazioni stabili con i recettori di tipo I attivati, prevenendo, in tal modo, la

fosforilazione delle R-Smads da parte di tali recettori. La proteina Smad7 è indotta dalla via di segnalazione del TGF β , e fa quindi parte di un meccanismo di regolazione negativo dipendente dal TGF β stesso [280,281]. La proteina Smad6 è traslocata dal nucleo al citoplasma dalla via di segnalazione del TGF β , e funziona anch'essa come regolatore negativo di tale via [282,283].

Le R-Smad, in particolare Smad2 e Smad3, nel loro stato non fosforilato sono ancorate ai recettori del TGF β attraverso una proteina di membrana, SARA (Smad Anchor for Receptor Activation) [273]. La presenza di questa proteina di ancoraggio risulta necessaria per la localizzazione delle proteine Smad in vicinanza dei recettori, e quindi per la loro attivazione.

In seguito alla fosforilazione da parte di T β R-I, attivato dallo specifico ligando, le R-Smad si dissociano da SARA e formano complessi con Smad4. Gli eterodimeri R-Smad/Smad4 traslocano dal citosol al nucleo, attraverso l'interazione con le proteine del complesso del poro nucleare [284], dove agiscono come fattori trascrizionali, regolando l'espressione di specifici geni bersaglio. Questi complessi eterodimerici possono legare direttamente il DNA a livello della sequenza CAGAC presente nell'elemento di legame delle Smad, SBE (Smad Binding Element) [285]. Nella maggior parte dei casi, tuttavia, la regolazione dell'espressione genica da parte delle Smad dipende dalla loro associazione in complessi trascrizionali con altri fattori di trascrizione e co-fattori [286,262]. A seconda dei "partner trascrizionali" con cui le Smad interagiscono, esse riconoscono sequenze regolatrici differenti, e modulano quindi l'espressione di geni diversi. I diversi membri della famiglia del TGF β inducono risposte cellulari differenti attraverso il reclutamento di diverse combinazioni di Smad e co-fattori trascrizionali. Inoltre, poiché la disponibilità di tali fattori può variare a seconda del tipo cellulare e del contesto, queste interazioni possono spiegare la diversità e la specificità delle risposte cellulari al TGF β in tipi cellulari e contesti differenti.

Infine, vari segnali extracellulari possono modulare la via di segnalazione del TGF β [260], per esempio attraverso l'attivazione di fattori di trascrizione in grado di cooperare con le proteine Smad nella regolazione dell'espressione genica. La specificità della via di trasduzione del segnale è perciò determinata mediante l'integrazione di segnali diversi a livello dell'attivazione di fattori trascrizionali.

La terminazione del segnale avviene mediante defosforilazione, e conseguente inattivazione, o ubiquitinazione, seguita da degradazione proteasoma-dipendente, delle

proteine Smad fosforilate, che sono substrato di fosfatasi e di ubiquitina-ligasi, rispettivamente.

Per concludere, è stato dimostrato che sebbene la maggior parte delle risposte al TGF β siano mediate dalle proteine Smad, alcune vie di segnalazione attivate da tale citochina sono indipendenti da tali mediatori [287].

Mesoangioblasti e distrofia muscolare

Le cellule satelliti sono normalmente quiescenti e cominciano a proliferare in seguito ad attivazione, in risposta ad uno stimolo di crescita, rimodellamento o trauma muscolare. Quando attivate, infatti, le cellule satelliti vanno incontro ad un certo numero di divisioni cellulari originando cellule in grado di fondersi le une con le altre o con la fibra danneggiata portando alla formazione di miotubi (elementi plurinucleati sinciziali) e alla rigenerazione di fibre muscolari; alcune cellule, invece, tornano quiescenti mantenendo in tal modo il *pool* dei progenitori [288]. Nei mioblasti il differenziamento può essere indotto *in vitro* mediante la privazione di fattori di crescita. La miogenesi è regolata dai fattori trascrizionali MyoD, Myf-5, miogenina e MRF4, appartenenti alla famiglia di proteine con dominio basico elica-ansa-elica (bHLH) [289]. Sebbene tali proteine abbiano caratteristiche comuni, la loro espressione spaziale e temporale risulta essere diversa [290]: Myf-5 e MyoD sono espressi sia nei mioblasti che nei miotubi, miogenina e MRF4 sono espressi solo durante il differenziamento, risultando importanti in tale processo, come per il mantenimento della linea.

Le cellule satelliti esprimono *markers* miogenici quali MyoD, c-Met, desmina e, inaspettatamente, le cellule satelliti derivate dall'adulto esprimono anche *markers* vascolari-endoteliali quali VE-caderina, P-selectina, α M-integrina, Flk1, α -SMA [291]. Benché l'origine embrionale di tali cellule risieda nei somiti, questa sembra non essere l'unica possibile fonte, non mancano, infatti, evidenze del differenziamento miogenico di cellule di origine non somitica, durante il tardo sviluppo fetale e post-natale [292]. La co-espressione di alcuni *markers* endoteliali e miogenici è stata osservata anche in cellule non differenziate derivanti dall'aorta embrionale [291] che, se trapiantate, partecipano alla crescita e alla rigenerazione muscolare post-natale, suggerendo che una sotto-popolazione di cellule satelliti possa derivare dal sistema vascolare.

Più recentemente è stata mostrata la capacità di differenziare a muscolo scheletrico anche di cellule staminali e progenitori individuati in tessuti fra loro non embriologicamente imparentati, come midollo osseo, cervello, tessuto connettivale muscolare e tessuto sinoviale [293,294,295,296]. Alcuni di questi tipi cellulari sono in grado di espandersi in coltura mantenendo la pluripotenza; ciò ha indirizzato la ricerca per un loro possibile utilizzo nella terapia delle patologie degenerative della muscolatura scheletrica. Non è ancora chiaro se i vari tipi di cellule staminali acquisiscano un fenotipo miogenico simile a quello delle cellule satelliti prima della fusione a miotubi, o attraverso un processo di trans-differenziazione in conseguenza della fusione stessa e del contatto dei nuclei donatori con fattori come MyoD, espressi nelle cellule differenzianti a muscolo scheletrico.

MyoD, come Myf-5, è uno dei principali regolatori miogenici richiesto per la determinazione di un fenotipo mioblastico, caratterizza una fase precoce dell'attivazione del differenziamento e viene espresso dalle cellule satelliti dopo 24 ore in coltura [297]. I mesoangioblasti differenziano a muscolo scheletrico in co-coltura con mioblasti C2C12, indicando che l'attivazione della miogenesi nei mesoangioblasti, è mediata da segnali rilasciati da cellule differenzianti [298]. Mesoangioblasti in co-coltura con mioblasti C2C12 esprimono mRNA codificante per MyoD, indicando il commissionamento in atto [295]. I processi previsti dalle fasi precoci del differenziamento miogenico delle cellule satelliti, quali l'iperpolarizzazione di membrana, la sensibilità all'acetilcolina e la formazione di giunzioni gap, sono stati presi come *markers* per lo studio del differenziamento a muscolo scheletrico nei mesoangioblasti [295]. Tramite la tecnica del *patch-clamp* è stato dimostrato che cellule D16 (mesoangioblasti murini) in co-coltura con miotubi stabiliscono contatti cellulari con essi, acquisiscono un potenziale di riposo iperpolarizzato e una corrente di membrana in risposta all'acetilcolina comparabili a quelli osservati nei mioblasti. Il differenziamento dei mesoangioblasti è piuttosto rapido, non è determinato dall'interazione con fattori presenti sulla membrana dei miotubi ma necessita dell'interazione con cellule miogeniche intatte e vitali.

L'attivazione di cellule satelliti in coltura porta ad un accoppiamento elettrico tramite giunzioni gap che viene virtualmente perso dopo la fusione; mioblasti e miotubi, dunque, sono solo occasionalmente accoppiati. L'iniezione intracellulare di coloranti fluorescenti in grado di diffondere attraverso le giunzioni gap ha permesso di dimostrare che durante il commissionamento miogenico di mesoangioblasti in co-coltura con

miotubi C2C12, aumenta l'accoppiamento elettrico fra le cellule D16, ma non tra queste e i miotubi C2C12. Mediante la tecnica del *patch-clamp* si è inoltre dimostrato che sulla membrana dei mesoangioblasti in queste condizioni è presente il recettore dell'acetilcolina la cui espressione, nelle cellule miogeniche differenzianti, dipende dall'attivazione trascrizionale di MyoD. In mesoangioblasti mononucleati non ancora fusi, la determinazione dell'espressione di MyoD ha richiesto l'utilizzo della RT-PCR, una tecnica più sensibile del Western blot, in quanto tale processo avviene a livelli molto bassi e tuttavia sufficienti ad attivare il programma miogenico, indipendentemente dalla fusione [295].

I mesoangioblasti hanno potenzialità rigenerative simili alle cellule satelliti, inserendosi, quindi, in un possibile approccio nella terapia della distrofia muscolare, una malattia degenerativa che colpisce i muscoli. Le distrofie muscolari sono malattie eterogenee dal punto di vista clinico e molecolare, caratterizzate da un'atrofizzazione di base dei muscoli scheletrici che compromette la mobilità del paziente. Il caso più grave è rappresentato dalla distrofia muscolare di Duchenne, causata dalla mutazione del gene che codifica per la distrofina, una proteina vitale per il mantenimento della struttura e funzione muscolare. In tale patologia sono affette le funzioni cardiache e respiratorie, portando a scompensi respiratori e a morte prematura [299].

In molti casi di distrofia la mutazione colpisce le proteine che formano un legame tra citoscheletro e lamina basale. Il complesso distrofina-glicoproteine di membrana (dystroglicano-sarcoglicano) rappresenta una specializzazione della membrana del muscolo cardiaco e scheletrico che connette l'actina del citoscheletro delle miofibre alla matrice extracellulare e media l'integrazione fra le strutture contrattili del muscolo.

I mesoangioblasti si sono rivelati una linea cellulare molto promettente per la terapia cellulare della distrofia muscolare poiché l'iniezione per via arteriosa di cellule D16 in un topo che non esprime la proteina α -sarcoglicano (un organismo modello di distrofia muscolare degli arti), è in grado di indurre correzioni morfologiche e funzionali del fenotipo distrofico nei muscoli a valle dell'inoculo [300]. Dopo 24 ore dall'iniezione di mesoangioblasti fluorescenti nell'arteria femorale di topi distrofici di un mese, questi si ritrovano associati alla parete dei vasi e all'interno della matrice extracellulare di tutti i muscoli a valle dell'inoculo, in particolare nelle aree che manifestano fenomeni di degenerazione e riparazione; al contrario, cellule satelliti fluorescenti inoculate, incapaci di attraversare la barriera endoteliale, si ritrovano adese alla parete dei vasi. I mesoangioblasti inoculati si ritrovano inoltre al di sotto della membrana basale delle

fibre rigeneranti ed esprimono M-caderina e c-Met, tipici *markers* di cellule satelliti [301].

Il trattamento con mesoangioblasti restituisce per i tre mesi successivi ad una singola iniezione, l'espressione nei muscoli della proteina α -sarcoglicano, assente nei controlli non trattati; e degli altri membri del complesso di membrana distrofina/glicoproteine, senza determinare una forte reazione immunitaria contro le fibre ricostituite. In seguito a tre inoculi di mesoangioblasti si ha un incremento del numero di fibre, apparentemente normali e un miglioramento della morfologia scheletrica, alla base di un elevato recupero di funzioni in termini di forza e motilità [300].

Per aggirare il problema del rigetto da parte dell'ospite è stata analizzata la possibilità di utilizzare cellule autologhe geneticamente corrette: i mesoangioblasti sono ottenuti con una frequenza più bassa dai vasi dell'adulto, rispetto all'embrione e crescono più lentamente ma sono equivalenti, in termini di espressione genica e potenziale differenziativo, ai corrispettivi embrionali. In seguito all'iniezione nell'arteria femorale, di topi distrofici di mesoangioblasti, isolati dal topo stesso e trasfettati con un vettore lentivirale contenente cDNA per α -sarcoglicano e per GFP, si osserva la ricostruzione del tessuto muscolare scheletrico mediata dai mesoangioblasti trasfettati, in modo simile a ciò che avviene in seguito al trattamento con mesoangioblasti *wild-type*, in assenza di alcuna risposta immune [300].

Iniettati nel sangue circolante, dunque, i mesoangioblasti, dopo essersi largamente dispersi tramite le arterie, si accumulano nei primi filtri capillari che incontrano e sono in grado di migrare al di fuori dei vasi solo in caso di processi infiammatori in atto, come quelli presenti nei muscoli distrofici e nelle fibre muscolari rigeneranti. Queste caratteristiche, unite alla facilità e sicurezza della procedura, ne fanno una terapia promettente per l'uomo, anche se alcuni punti restano insoluti (mesoangioblasti umani sono stati isolati da vasi fetali ma, non ancora da vasi propri dei pazienti distrofici).

Il limite dei risultati ottenuti sui topi distrofici sta nel fatto che i topi affetti da distrofia muscolare non mostrano i segni clinici caratteristici di tale patologia, e pertanto rappresentano un modello animale di distrofia muscolare particolare, quindi non adeguato per l'impiego in ricerche cliniche, nell'ottica di possibili sviluppi futuri. Invece, si è mostrato un valido modello per la distrofia muscolare di Duchenne quello dei cani Golden retriever affetti da distrofia (GRMD) [302,303]. Come precedentemente accennato, la distrofia muscolare di Duchenne è una patologia genetica attualmente incurabile che limita severamente la deambulazione e l'aspettativa di vita dei bambini

affetti da tale patologia. A causa della mancanza di distrofina, questi individui presentano una grave degenerazione delle fibre della muscolatura scheletrica con progressiva paralisi e morte. Questi GRMD presentano una forma estremamente grave la quale interessa arti, muscoli respiratori, cuore ma anche muscoli del tratto faringeo; e benchè all'interno della stessa mutazione esista un'ampia variabilità di sintomi tra animali affetti, comunque, da 8 mesi di età la maggior parte dei cuccioli ha grossi problemi di deambulazione. Il gruppo di Cossu [304] ha perciò impiegato tale modello in esperimenti in cui venivano iniettati nell'aorta femorale di questi cani, mesoangioblasti autologhi geneticamente corretti, mediante inserimento di vettori con gene per la microdistrofina (una forma troncata ma funzionale) con lentivirus, oppure mesoangioblasti da donatore *wild-type*. Mentre approcci di terapia genica o cellulare per GRMD finora non avevano dato risultati, o assai modesti, questi cani, trattati con iniezione di mesoangioblasti, presentavano un'estesa ricostituzione di fibre esprimenti distrofina, un miglioramento nella forza di contrazione e, in molti casi la capacità di preservare la deambulazione. Come osservato nel precedente lavoro sui topi, [300,305] i mesoangioblasti risultavano capaci di attraversare la parete dei vasi, invadere lo spazio interstiziale dei tessuti e fondere per rigenerare le fibre.

Questi risultati sono assai confortanti e rappresentano le premesse per futuri esperimenti clinici e quindi per un possibile e auspicabile impiego dei mesoangioblasti nella cura della distrofia muscolare di Duchenne.

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) era acquistato dalla Cambrex Corp. (NJ, USA), il siero di vitello era acquistato presso Euroclone (Pero, Italia). I reagenti per le colture cellulari, il TriReagent, la Taq DNA polimerasi, gli inibitori di proteasi, il C2-ceramide, la staurosporina, l'albumina di siero bovino (BSA), Mega Cell Dulbecco's Modified Eagle's Medium, l'anticorpo anti-FLAG (M2), l'anticorpo monoclonale contro la catena pesante della miosina muscolare (MHC) e N-Ter Nanoparticle siRNA sono stati acquistati dalla Sigma (St.Louis, USA), il reattivo di Bradford (Blue Coomassie G 250 in soluzione acido/alcolica) dalla Bio-Rad (Hercules, USA). Il TGF β -1, bFGF, TNF α e il PDGF- $\beta\beta$ sono stati comprati dalla PeproTech (Londra, Regno Unito), D-*erythro*-S1P, l'inibitore VI della PI3-K β (TGX-221), l'inibitore VIII di Akt (Akti 1/2), l'inibitore di SphK (SKI o CII) [2-(p-idrossianilino)-4-(p-clorofenil)tiazolo] e l'antagonista specifico per S1P₁, SEW2871, sono stati acquistati dalla Calbiochem (S.Diego, USA). Il [³²P] γ -ATP (3000 Ci/mmol), [³H]timidina, il reattivo ECL e i film Kodak Biomax-ray sono stati acquistati dalla Amersham Pharmacia Biotech (Uppsala, Svezia). Gli antagonisti dei S1PR, VPC23019 e JTE-013 e gli inibitori di p38 MAPK, p42/p44 MAPK, e di PI3K, SB203580, U0126 e LY294001 sono stati acquistati presso la Tocris (Bristol, Regno Unito). La dimetilsfingosina (DMS) e la tossina della Pertosse (PTx) erano acquistate da Alexis Corporation (San Diego, USA). La trascrittasi inversa Superscript II, la OligofectamineTM Reagent e la LipofectamineTM 2000 venivano acquistati presso Invitrogen Corporation (Carlsbad, USA). L'anticorpo monoclonale anti β -actina veniva acquistato presso Cytoskeleton Inc. (Denver, USA). Il plasmide codificante la forma cataliticamente inattiva della SphK1, DNSphK1^{G82D} e il plasmide codificante la forma wild-type di SphK1, WTSphK1, sono stati gentilmente forniti dal Dr. S. Pitson, Hanson Institute, Adelaide, Australia. Il vettore pGEX2T codificante la forma dominante negativo di ERK1/p42 MAPK, ERK1 K71R, è stato gentilmente fornito dal Dr. K-L. Guan, Department of Pharmacology and Moores Cancer Center, University of California, La Jolla, USA. Le immunoglobuline anti-topo, anti-coniglio ed anti-capra coniugate con perossidasi di rafano, l'anticorpo anti miogenina e il Blotto venivano comprate dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (CA, USA). Gli anticorpi policlonali specifici per gli ultimi 16 residui aminoacidici della sequenza murina della

SphK1 sono stati gentilmente forniti dalla Dott.ssa Y. Banno, Department of Biochemistry, Gifu University School of Medicine, Gifu, Japan. Gli anticorpi policlonali specifici per SphK2 sono stati gentilmente forniti dal Dr. S. Nakamura, Department of Molecular and Cellular Biology, University Graduate School of Medicine, Kobe, Japan. Il vettore pcDNA contenente il cDNA di S1P₁ è stato gentilmente fornito dal Prof. Y. Igarashi, Hokkaido University, Sapporo, Giappone. Gli anticorpi di p42/44 MAPK, phospho-p42/p44 MAPK, PKB/Akt and phospho-PKB/Akt erano acquistati presso Cell Signalling Technology, Inc., (Beverly, USA). L'anticorpo anti caveolina-3 (cav-3) è stato acquistato presso la Transduction Laboratories (Lexington, USA). Il substrato per la caspasi-3, Ac-DEVD-AFC era acquistato da Biomol Research Laboratories Inc. (PA, USA), PE-Annessina V era comprata da Bender Medsystem (Burlingame, USA) e 7-amino-actinomicina D (7ADD) era acquistata da Beckman Coulter (Fullerton, USA). L'antagonista specifico per S1P₁, W146 era acquistato presso Avanti Polar (Alabaster, USA), l'anticorpo specifico contro S1P₁ era comprato da Abcam (Cambridge, Regno Unito). Due brevi sequenze di RNA a doppio filamento specifiche per due sequenze target di:

SphK1 murina (5'-UAGGAACUGUGGCCUCUAATT-3'
5'-GUGUUAUGCAUCUGUUCUATT-3'),
SphK2 murina (5'-GCCUACUUCUGCAUCUACATT-3';
5'-CCUCAUACAGACAGAACGATT-3'),
S1P₁ murino (5'-UCAUCCUACUACUGUUAGATT-3';
5'-CUUGCUAACUAUUUGGAAATT-3'),
S1P₂ murino (5'-AAGGTCAAGCTCTACGGCAGT-3';
5'-GACUAAUCAGAUUGUAGUATT-3'),

lo scrambled di controllo

(5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUTT-3'),

e le sequenze degli oligodeossinucleotidi antisenso (ODN-AS) fosfotoniati, complementari a regioni corrispondenti al codone di inizio traduzione dei recettori:

S1P₁ (5'-AGTGGACACCATAGCTGCTAA-3');

S1P₂ (5'-GTATAAGCCGCCCATGGTGGG-3')

e S1P₃ (5'-ATGCGTGGTTGCCATGGCTTC-3'),

oltre a quelle di controllo, erano acquistate da Sigma-Proligo (Texas, USA).

Colture cellulari

Mesoangioblasti umani, isolati da biopsie di individui adulti e mesoangioblasti di topo, quest'ultimi appartenenti al clone cellulare D16 sono stati gentilmente forniti dal Prof. Giulio Cossu, Istituto per le cellule staminali, Ospedale San Raffaele, Milano. Le cellule D16 venivano mantenute in coltura in terreno Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) addizionato con il 20% di siero fetale di vitello (FCS), scomplementato mediante trattamento a 56°C per 30 min; con penicillina 72 µg/ml, streptomicina 100 µg/ml e glutammina 20 mM. Mesoangioblasti umani venivano mantenuti in coltura in terreno Mega Cell Dulbecco's Modified Eagle's Medium addizionato con il 5% di siero fetale di vitello (FCS), anch'esso scomplementato e con addizionato bFGF 5 ng/ml. Le piastre venivano mantenute in incubatore a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂ e il 95% di aria.

Quando le cellule erano sub-confluenti venivano staccate dalla piastra con una soluzione di tripsina 0,05%-EDTA 0,02% , contate nella camera di Bürker e piastrate in terreno fresco. Il numero di passaggi in coltura delle cellule è stato utilizzato come indice di invecchiamento della popolazione stessa.

I mioblasti di topo della linea cellulare C2C12 sono stati ottenuti dall'American Type Culture Collection, (Manassas, VA, USA). Le cellule erano mantenute in coltura in terreno DMEM addizionato con FCS al 10%, con aggiunta di penicillina 72µg/ml, streptomicina 100µg/ml e glutammina 20 mM. Le piastre erano mantenute in incubatore a 37°C in un'atmosfera contenente il 5% di CO₂ e il 95% di aria.

Quando le cellule erano confluenti venivano staccate dalla piastra con tripsina 0,4%, contate nella camera di Burker e piastrate in terreno fresco.

Il numero di duplicazioni della popolazione cellulare (PDL) veniva calcolato secondo la formula:

$$n = (\log N_t - \log N_0) / \log 2$$

dove: N_0 = numero di cellule inizialmente piastrate

N_t = numero di cellule raccolte alla confluenza

ed adoperato come indice di invecchiamento della popolazione stessa.

Preparazione dei lisati cellulari

Le cellule venivano lavate 2 volte con Phosphate Buffered Saline (PBS) freddo e quindi raccolte, in ghiaccio, in un tampone di lisi contenente Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, NaCl 120 mM, EDTA 1 mM, EGTA 6 mM, NaP₂O₇ 15 mM, NaF 20 mM, Nonidet 1% ed inibitori di proteasi. In seguito i campioni venivano incubati per 30 min a 4°C prima di essere centrifugati per 15 min a 10,000 g a 4°C. Il supernatante rappresentava il lisato cellulare totale di cui veniva determinato il contenuto proteico prima di essere risospeso in Sample Buffer (Tris-HCl 63 mM, pH 6,8, glicerolo 10%, blu di bromofenolo 0,0025%, SDS 2%, β-mercaptoetanololo 5%) e sottoposto (15-40 µg) a separazione elettroforetica.

Frazionamento cellulare

Il frazionamento cellulare consente di individuare la proteina di interesse in un compartimento sub-cellulare e di seguirne la localizzazione in seguito a stimoli esterni. In particolare si ottenevano frazioni corrispondenti al citoplasma e alle membrane cellulari totali.

Le cellule venivano fatte crescere fino alla confluenza del 100% in piastre Petri (100 mm di diametro). Raggiunta la confluenza opportuna venivano lavate 2 volte con PBS e private di siero per 24 h in 5 ml di DMEM contenente BSA 0,1%. Le cellule venivano quindi stimulate con TNFα 0,2 ng/ml per i tempi indicati nella sezione Risultati.

Al termine della stimolazione il mezzo veniva rimosso e le cellule lavate per 2 volte con PBS freddo e raccolte in un tampone di omogeneizzazione contenente: Hepes 20 mM, pH 7,4, EGTA 2 mM, EDTA 1 mM, saccarosio 250mM, NaN₃ 5 mM ed inibitori di proteasi quali AEBSF 1,04 mM, aprotinina 0,08 µM, leupeptina 0,02mM, bestatina 0,04 mM, pepstatina A 15 µM ed E-64 14 µM.

Le cellule venivano poi lisate meccanicamente nel tampone con 80 colpi in un omogeneizzatore Dounce in ghiaccio.

Il lisato, trasferito in provette Eppendorf, veniva centrifugato per 10 min a 750 g per far precipitare i nuclei. Il supernatante ottenuto veniva centrifugato a 200,000 g per 1 h a 4°C, ottenendo la frazione citoplasmatica ed un precipitato corrispondente alle

“membrane cellulari totali”. Queste frazioni venivano dosate con il metodo di Bradford per valutarne il contenuto proteico e poi analizzate mediante Western blotting.

Dosaggio di proteine

La determinazione del contenuto proteico, espresso in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, veniva eseguita mediante l'uso del reattivo di Bradford (Blue Coomassie G 250 in soluzione acido/alcolica).

Nel caso del micrometodo, che consente di determinare concentrazioni comprese tra 0 e 16 μg di proteine, si allestiva la curva standard prelevando aliquote crescenti da una soluzione di 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ di BSA.

Al campione si aggiungeva H_2O fino ad un volume di 800 μl , quindi si aggiungevano 200 μl di reattivo di Bradford non diluito.

Dopo un'agitazione al vortex, si attendevano 10 min e nello stesso ordine con cui le miscele erano state preparate, si effettuava la lettura dell'assorbimento allo spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 595 nm.

Elettroforesi su gel di poliacrilammide e Western Blotting

Le proteine venivano separate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti SDS-PAGE secondo la metodica di Laemmli. Essa prevede la preparazione di 2 diversi gel di poliacrilammide:

- lo “stacking gel” ad una concentrazione finale fissa di 4% di acrilammide;
- il “separating gel” con una concentrazione di acrilammide solitamente variabile tra il 5% ed il 15% a seconda del peso molecolare delle proteine da separare; per gli esperimenti sono stati impiegati gel di separazione con acrilammide al 10% o al 12%.

Entrambe le soluzioni venivano lasciate polimerizzare all'interno di lastre di vetro.

I campioni, risospesi in Sample Buffer, venivano bolliti per 5 min per denaturare le proteine e centrifugati a 14,000 g per 1 min prima di essere applicati sul gel.

Le proteine rivestite uniformemente di sodio dodecil solfato (SDS), un detergente anionico che conferisce loro una carica negativa, migravano in funzione della loro dimensione.

Nel gel venivano caricati anche standard di peso molecolare noto (New England Biolabs, Inc., Boston, USA) per l'identificazione della banda corrispondente alla

proteina di interesse. La corsa elettroforetica avveniva in un'opportuna soluzione tampone (Tris-HCl 25 mM, glicina 0,2 M) per circa 1 h e 30 min, applicando un voltaggio costante di circa 150 Volts.

Si procedeva quindi con la tecnica del Western blotting per rivelare la presenza di proteine specifiche mediante l'uso di anticorpi.

Terminata la corsa, le proteine separate elettroforeticamente venivano trasferite dal gel su un foglio di PVDF sotto la spinta di un campo elettrico (100 mA) generato da 2 elettrodi paralleli.

Il trasferimento avveniva in un'apposita soluzione tampone (Tris-HCl 24 mM, glicina 192 mM, metanolo 20%) per circa 1 h, applicando un amperaggio costante di 100 mA.

Per ridurre il legame degli anticorpi a siti aspecifici, il PVDF veniva saturato per 1 h a temperatura ambiente con TTBS 0,1% (Tris-HCl 20 mM, pH 7,5, NaCl 150 mM, contenente lo 0,1% di Tween 20, TTBS, pH 7,5) ed il 5% di *non-fat dry milk* (Blotto, non-fat dry milk) o l'1% di BSA a seconda dell'anticorpo impiegato.

Seguiva quindi l'incubazione con l'anticorpo specifico per un'intera notte. La mattina seguente, dopo aver effettuato 3 lavaggi di 5 min con TTBS 0,1% per rimuovere l'anticorpo non legato, si procedeva all'incubazione con un anticorpo secondario, un'immunoglobulina anti-topo, o anti-coniglio, oppure anti-capra a seconda del tipo di anticorpo primario utilizzato, coniugata a perossidasi, diluito 1:5000, per 1 h.

In seguito la membrana di PVDF veniva sottoposta a 3 lavaggi di 5 min ciascuno con TTBS 0,1% e ad un lavaggio di 15 min con TBS 1X. La membrana veniva messa a contatto con il reattivo ECL per circa 1 min. A questo punto l'attività della perossidasi sviluppava chemiluminescenza.

La membrana veniva esposta con un film Kodak Biomax-ray per un tempo variabile a seconda dell'intensità del segnale luminoso e la pellicola veniva infine, sviluppata e fissata. Le bande di interesse venivano poi sottoposte ad analisi densitometrica quantitativa mediante il programma Quantity One (Bio-Rad).

Retrotrascrizione da RNA totale e reazione a catena della polimerasi

L' RNA totale veniva isolato mediante TriReagent secondo il protocollo della ditta produttrice ed 1 µg veniva utilizzato per la reazione di trascrizione inversa in presenza di 4 µl di dNTP 2,5 mM, e 1 µl di random primers 0,5 mg/ml. La reazione era catalizzata dalla trascrittasi inversa Superscript II a 42°C per 60 min. Un'aliquota della

reazione (4 µl) veniva poi utilizzata per amplificare, tramite PCR, di circa 1000 bp per S1P₁, 600 bp per S1P₂, 225 bp per S1P₃, 325 bp per S1P₄ e 750 bp per S1P₅. I campioni di cDNA, in presenza di entrambi i primer (240 nM), MgCl₂ (1,5 mM) e di Taq DNA polimerasi, risospesi in un volume totale di 50 µl di tampone contenente Tris-HCl 20 mM, pH 8,4, KCl 50 mM, venivano sottoposti a 40 cicli di amplificazione ad una temperatura di *annealing* di 52°C.

I primers (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svezia) utilizzati erano i seguenti:

S1P₁ forward

5'-GTGTCCACTAGCATCCCGGAGGTTAAAGCTCTCCGCAGCTCA-3'

S1P₁ reverse 5'-CCCAACAGGGGTAGCAGGAAGACCCC-3'

S1P₂ forward 5'-TCGCGAATGCTGATGCTCATCGGG-3'

S1P₂ reverse 5'-TCAGACCACCGTGTGCCCCTCCAG-3'

S1P₃ forward 5'-GCAACCACGCATGCGCAGGGCCAC-3'

S1P₃ reverse 5'-GCGGTTGTGAAATTTATTGTTTTTCCAG-3'

S1P₄ forward 5'-CTGCTGCCCCTCTACTCCAA-3'

S1P₄ reverse 5'-ATTAATGGCTGAGTTGAACAC-3'

S1P₅ forward 5'-GAGCGCCACCTTACCATG-3'

S1P₅ reverse 5'-GGAGCAGCTGGTGTCCAT-3'

I prodotti della reazione venivano poi separati mediante elettroforesi in un gel di agarosio al 1,2% contenente bromuro di etidio, un intercalante delle basi del DNA, fluorescente che ne permette la rilevazione, e le loro dimensioni confrontate con appositi markers, PCR 100 bp Low Ladder (Sigma). Per normalizzare i livelli di espressione come controllo interno di riferimento veniva amplificato un frammento di circa 250 bp corrispondente all'mRNA della β-actina utilizzando i seguenti primers:

β-actina forward 5'-GCGGGAAATCGTGCGTGACATT-3'

β-actina reverse 5'-GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG-3'

Real Time PCR

Al fine di valutare quantitativamente i livelli di espressione dell'mRNA specifico per i recettori S1P₁, S1P₂ e S1P₃ sono stati condotti esperimenti di PCR quantitativa (Real Time PCR) mediante il sistema ABI Prism 7700 SDS (Sequence Detection System, Applied Biosystem, Foster City, USA); esso è il risultato della combinazione, in un

unico strumento, di un thermal cycler, di un rilevatore a fluorescenza laser e di un software applicativo specifico. Lo strumento consente l'amplificazione tramite PCR e la contemporanea rivelazione dei suoi prodotti. Tutti i campioni venivano testati in triplicato in piastre standard di reazione da 96 pozzetti, muniti di tappi ottici (Applied Biosystem). Il cDNA, estratto e retrotrascritto dall'RNA, come precedentemente descritto, e diluito 200 volte, veniva sottoposto al processo di amplificazione in soluzione con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) e con i primer per S1P₁ (codice d'identificazione Mn00514644_m1) S1P₂ (codice d'identificazione Mn01177794_m1) S1P₃ (codice d'identificazione Mn00515669_m1) marcati mediante sonde fluorescenti. Per ogni campione di cDNA veniva amplificata la sequenza della subunità 18S del ribosoma (codice d'identificazione Hs99999901_s1) considerata come normalizzatore, e l'efficienza di ogni sonda era stata precedentemente testata con un controllo positivo. Inoltre, per evidenziare eventuali contaminazioni di DNA estraneo al campione, venivano preparati pozzetti contenenti tutti i reagenti eccetto il cDNA. Il processo di amplificazione prevede una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 min, seguita da 50 cicli composti da un primo step di 15" a 95°C e da un secondo step di annealing ed estensione a 60°C per 1 min. Lo strumento eccita i fluorocromi legati alle sonde ed effettua la lettura della fluorescenza per ogni pozzetto ad ogni ciclo; le varie letture vengono rielaborate dal software e la fluorescenza emessa, in funzione del numero di cicli di amplificazione eseguiti, viene riportata in un plot sul quale viene fissato il valore opportuno di ciclo soglia (Ct), corrispondente al numero di cicli in cui l'andamento della fluorescenza diviene logaritmico. L'analisi quantitativa è stata effettuata con il metodo comparativo (metodo del $\Delta\Delta Ct$ [Livak, K. and Schmittgen, T. (2001) METHODS 25:402-408]) dalle medie dei Ct dei triplicati: è stato prima calcolato il valore ΔCt , dalla differenza, in cicli soglia, tra il campione amplificato per la sequenza bersaglio e quello amplificato per la sequenza rRNA 18S, secondo la seguente formula:

$$\Delta Ct = C_{t,x} - C_{t,n}$$

con x = target e n = normalizzatore.

Poi è stato calcolato il valore $\Delta\Delta Ct$ dalla differenza fra ΔCt del campione e il ΔCt del campione preso come calibratore, secondo la seguente formula:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta C_{t,s} - \Delta C_{t,c}$$

con s = campione e c = calibratore.

La quantità di sequenza bersaglio, confrontata con il normalizzatore e con il calibratore, è data dalla seguente formula:

$$2^{-\Delta\Delta Ct}$$

che è indicativa della variazione del numero di copie della sequenza bersaglio, posta uguale a 1 nel campione calibratore.

Valutazione della proliferazione cellulare mediante incorporazione di [³H]timidina

Le cellule C2C12 venivano piastrate in multiwell da 12 pozzetti in numero di c.a. $3,5 \times 10^4$ per pozzetto in 1 ml di DMEM contenente FCS al 10% in modo che, il giorno dopo fossero nelle fase esponenziale di proliferazione (c.a. 40-50% di confluenza). Il giorno seguente le cellule venivano starvate, ossia messe in DMEM contenente 0,1% di BSA per 24 h. Poi venivano stimulate con PDGF 30 ng/ml per 16 h. Le ultime due ore veniva aggiunta [³H] timidina (0,5 o 1 μ Ci per pozzetto).

I mesoangioblasti venivano anch'essi piastrati in multiwell da 12 pozzetti al 40-50% di confluenza, c.a. $1,6 \times 10^4$, starvati per c.a. 16 h e poi trattati con S1P 1 μ M per 24h e marcati con [³H]timidina (1 o 2 μ Ci per pozzetto) le ultime due ore di incubazione.

Trascorso il tempo suddetto si lavavano i pozzetti per 2 volte con PBS freddo e si aggiungevano 500 μ l di acido tricloroacetico al 10% lasciando 5 min in ghiaccio per far precipitare le proteine. Si aspirava e infine veniva aggiunta (250 μ l per pozzetto) una miscela di Etanolo:Etere (3:1) sotto cappa aspirante fino a completa evaporazione.

Le cellule venivano raccolte dopo 1 h di incubazione a 37°C in NaOH 0,2 N (500 μ l per pozzetto).

Infine, veniva prelevata un'aliquota di 200 μ l di ogni campione, unita a 3,5 ml di liquido di scintillazione e misurata la radioattività, e quindi l'incorporazione di [³H]timidina, tramite scintillatore in fase liquida.

Valutazione della proliferazione cellulare in mesoangioblasti D16 mediante conta delle cellule

Per valutare la proliferazione dei mesongioblasti D16 veniva anche effettuata una conta delle cellule. Mesoangioblasti D16 (c.a. 1×10^5) venivano piastrati in multiwells da 6 pozzetti. Le cellule venivano poi starvate per 24 ore mediante DMEM contenente 0,1% di BSA e stimulate con S1P 1 μ M.

A tempi indicati nella sezione Risultati si eseguivano 2 lavaggi con 2 ml di PBS non sterile. Le cellule venivano poi staccate mediante tripsina allo 0,05% (0,5 ml per

pozzetto) per 1 minuto a 37 °C. Dopo aver aggiunto 3 ml di DMEM con FCS al 20%, a ciascun pozzetto per neutralizzare l'effetto della tripsina, si passava alla conta delle cellule in camera di Bürker.

Dosaggio di attività della SphK

L'attività della SphK veniva dosata secondo il metodo descritto da Olivera e collaboratori [306]. Le cellule venivano lavate due volte con PBS freddo e raccolte in un tampone contenente Tris 20 mM, pH 7,4, glicerolo 5%, β -mercaptoetanolo 1 mM, EDTA 1 mM, ortovanadato di sodio 1 mM, β -glicerofosfato 40 mM, NaF 15 mM, 4-deossipiridossina 0,5 mM, fenil-metil-sulfonil-fluoruro 1 mM ed inibitori delle proteasi. Il lisato cellulare veniva ottenuto mediante 15 cicli di congelamento e scongelamento in azoto liquido. Le cellule non rotte venivano rimosse mediante centrifugazione a 750 g per 10 min a 4°C. Il dosaggio *in vitro* veniva effettuato utilizzando c.a. 60 μ g di lisato, in un volume totale di 100 μ l, in presenza di D-erythro-sfingosina 50 μ M in BSA 4 mg/ml, MgCl₂ 10mM, ATP freddo 1mM e [γ ³²P]-ATP (0,5 μ Ci) 1 mM per 30 min a 37°C. La reazione veniva bloccata in ghiaccio mediante aggiunta di 10 μ l di HCl 1 M. Si procedeva quindi all'estrazione lipidica. Ai campioni venivano aggiunti 0,9 ml di cloroformio:metanolo:HCl (100:200:1 v/v), 240 μ l di cloroformio e infine 240 μ l di KCl 1 M; ciascuna aggiunta era seguita da una breve agitazione al vortex per favorire l'estrazione. Le due fasi venivano quindi separate centrifugando a 1,000 g per 10 min. 500 μ l della fase organica, quella inferiore, erano trasferiti in una provetta di vetro e portati a secco sotto un flusso di azoto. I lipidi venivano poi dissolti in 100 μ l di una miscela cloroformio:metanolo (2:1 v/v) e separati mediante cromatografia su strato sottile su lastre di silice su supporto di alluminio, precedentemente attivate in stufa a 100°C per 1 h. Le lastre erano poi sviluppate con una miscela costituita da 1-butanol:metanolo:acido acetico:acqua (80:20:10:20 v/v).

Mediante autoradiografia veniva individuata la macchia corrispondente a [³²P]S1P sulla lastra di silice che, successivamente veniva tagliata e trasferita in vials; la radioattività veniva misurata tramite scintillazione in fase liquida. L'attività specifica della sfingosina chinasi veniva espressa come pmol di sfingosina-1-fosfato (S1P) formata per min per mg di proteine.

Valutazione dell'effetto anti-apoptotico di S1P e TGFβ

Mesoangioblasti D16 venivano piastrati e lasciati crescere in DMEM contenente il 20% di FCS in modo che il giorno dopo fossero sub-confluenti (circa 80% di confluenza).

L'effetto anti-apoptotico di S1P o TGFβ veniva valutato sia in cellule cresciute in DMEM contenente il 20% di FCS che in cellule private di siero per 24 h, coltivate in DMEM contenente 0,1% di BSA. Il C2-ceramide (10 μM) veniva somministrato per 24 h alle cellule un'ora dopo la privazione di siero mentre la staurosporina (0,5 μM) veniva somministrata le ultime 4 h di starvazione. Il trattamento con S1P 1 μM o TGFβ 5 ng/ml veniva ripetuto due volte, 30 minuti e 18 h dopo l'inizio della starvazione. La valutazione dell'effetto antiapoptotico di S1P o TGFβ è stata effettuata mediante varie tecniche.

-Valutazione dell'apoptosi mediante conta del numero di cellule

Cellule D16 venivano piastrate in numero di c.a. 1×10^5 per pozzetto, in multiwell da 6 pozzetti e trattate come sopra descritto. Le cellule venivano quindi lavate due volte con PBS non sterile a 37°C e staccate incubandole per 1 min a 37°C con 0,5 ml di tripsina 0,05%. Quando il monostrato si era staccato l'azione della tripsina era inibita aggiungendo 3 ml di terreno con FCS al 20%. Il conteggio del numero di cellule veniva effettuato in camera di Bürker.

L'effetto anti-apoptotico di S1P e del TGFβ veniva quantificato come incremento percentuale del numero di cellule totali sopravvissute alla starvazione o al trattamento con ceramide o staurosporina rispetto ai controlli.

-Valutazione dell'apoptosi mediante dosaggio di attività della caspasi-3

Mesoangioblasti D16 venivano piastrati in numero di c.a. 1×10^5 in multiwell da 6 pozzetti e trattati come sopra descritto. Le cellule venivano quindi lavate due volte con PBS e lisate per 20 min a 4°C in un tampone contenente Tris-HCl 20 mM, pH 7,4, NaCl 250 mM, EDTA 2 mM, Triton X-100 0,1%, aprotinina 5 μg/ml, leupeptina 5 μg/ml, fenilmetilsulfonilfluoruro 0,5 mM, sodio vanadato 4 mM e DTT 1 mM. La lisi veniva completata mediante due cicli di sonicazione della durata di 10 sec. Il contenuto totale di proteine del sovrantante, ottenuto da una centrifugazione a 16,000 g per 5 min a

4°C, veniva determinato con il reagente Bradford. Aliquote di 50 µg delle proteine totali venivano diluite in un tampone contenente Hepes-KOH 50 mM, pH 7,0, glicerolo 10%, 3-[(3-colamidopropil)-dimetilammonio]-1-propansulfonato 0,1%, EDTA 2,0 mM, e DTT 10 mM. L'attività della caspasi-3 veniva determinata incubando i campioni per 4 h a 37°C in presenza di 30 µM di substrato fluorogenico Ac-DEVD-AFC (AFC) e valutando quindi, mediante fluorimetria, la fluorescenza emessa a 505 nm (eccitazione 400 nm). Per determinare la degradazione non specifica del substrato, il dosaggio veniva anche effettuato preincubando i campioni per 15 min a 37°C in presenza o in assenza dell'inibitore specifico della caspasi-3, Ac-DEVD-CHO 200 nM, prima dell'aggiunta del substrato. L'attività della caspasi-3 veniva riportata come percentuale sui controlli.

-Valutazione dell'apoptosi mediante saggio ELISA

Per la determinazione qualitativa e quantitativa dei frammenti di DNA associato a istoni (mono- e oligonucleosomi) presenti nel citoplasma in seguito all'induzione dell'apoptosi, è stato utilizzato un saggio ELISA (*Enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizzando il kit Cell Death Detection ELISA^{PLUS} (Roche Applied Science, Germania) che si basa sull'utilizzo di anticorpi monoclonali anti-istone coniugato a biotina e anti-DNA coniugato alla perossidasi.

Cellule D16 venivano piastrate e trattate come sopra descritto. Le cellule venivano quindi lavate due volte con PBS freddo e lisate in 500 µl del tampone di lisi per 30 min a temperatura ambiente. Il lisato cellulare veniva quindi centrifugato a 200 g per 10 min, il supernatante ottenuto corrispondeva alla frazione citoplasmatica. Per eseguire l'analisi 20 µl del supernatante venivano trasferiti in pozzetti di micropiastre da 96 pozzetti rivestiti da streptavidina. Ad ognuno di essi venivano quindi aggiunti 80 µl di immunoreagente preparato poco prima dell'uso e costituito da anti-DNA coniugato alla perossidasi 1/20 in volume, anti-istone coniugato a biotina 1/20 in volume e tampone di incubazione 18/20 in volume. I multiwell venivano coperti ed incubati in agitazione per 2 h a temperatura ambiente. La soluzione veniva rimossa e ogni pozzetto veniva lavato con 250-300 µl di tampone di incubazione. In seguito venivano aggiunti 100 µl di soluzione contenente il substrato cromogenico ABTS per ogni pozzetto. Dopo circa 10 min venivano effettuate le misurazioni usando un lettore ELISA (Bio-Rad, Hercules,

CA, USA) a una lunghezza d'onda di 405 nm e sottraendo la lettura di riferimento a 490 nm. La soluzione substrato ABTS veniva utilizzata come bianco.

-Valutazione dell'apoptosi mediante l'impiego di PE-Annessina V

Inoltre per ottenere una stima quantitativa della frazione di cellule in apoptosi, l'esposizione della fosfatidilserina (PS), che viene a trovarsi sul versante esterno del plasmalemma di cellule in apoptosi, altrimenti assente, era monitorata mettendo ad incubare 6×10^4 cellule c.a. con PE-Annessina V $1 \mu\text{g/ml}$, una proteina che lega, in maniera Ca^{2+} dipendente la PS; per 45 min a temperatura ambiente in PBS contenente Ca^{2+} e Mg^{2+} , proteggendo i campioni dalla luce. Nella stessa soluzione d'incubazione veniva anche aggiunto 7-amino-actinomicina D (7ADD) $1 \mu\text{g/ml}$, un colorante vitale. Le cellule in uno stato di apoptosi ancora iniziale non si colorano con 7ADD ma venivano rivelate con annessina V, le cellule in uno stato conclamato di apoptosi non escludevano 7ADD, per cui erano evidenziate sia dal colorante che da annessina V, mentre le cellule vitali risultavano negative ad entrambi i sistemi di rivelazione. Le cellule venivano poi analizzate usando un sorter a fluorescenza (FACStar Plus, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

Gli esperimenti *in vivo* volti a valutare la sopravvivenza dei mesoangioblasti D16 iniettati in topi distrofici sono stati fatti dalla Dott.ssa S. Brunelli del gruppo di G. Cossu, presso l'Ospedale S. Raffaele di Milano.

Superespressione di plasmidi contenenti cDNA di sequenze di interesse

I plasmidi pcDNA3.1, contenenti il cDNA codificante per il recettore murino S1P₁, con il peptide FLAG inserito all'N-terminale e quello specifico di emoagglutinina HA al C-terminale, per la forma wild-type di SphK1 e per la forma mutata DNSphK1^{G82D} aventi la sequenza del peptide FLAG come tag e il vettore pGEX2T-ERK1 K71R, contenente la forma mutata di ERK1/p42 MAPK, sono stati utilizzati per trasfettare mioblasti C2C12 e mesoangioblasti D16 con Lipofectamine 2000 (1mg/ml) (LF2000). Questo reagente è costituito da lipidi cationici e può essere utilizzato per trasfettare le cellule in presenza di siero ma non in presenza di antibiotici. I complessi che si formano (LF2000-

DNA) possono essere aggiunti direttamente nel terreno di coltura; inoltre, non è necessario rimuovere i complessi o cambiare il terreno dopo la trasfezione.

Per ogni pozzetto si diluivano DNA plasmidico (μg) e LF2000 (μl) in rapporto 1:2 in terreno senza FCS; seguiva un'incubazione di pochi minuti. Poi si combinavano i due costituenti e si lasciavano per 20 min a temperatura ambiente.

Successivamente si aggiungevano i complessi LF2000-DNA direttamente in piastra nel terreno di coltura (500 μl). Poi si incubavano le cellule a 37°C in un incubatore a CO₂ per un totale di 24 h; le cellule erano quindi raccolte per analizzare l'espressione di SphK1 mediante Western blotting, utilizzando anticorpi anti-FLAG o anti-p42/p44 MAPK, quest'ultimi necessari per verificare l'avvenuta trasfezione del plasmide pGEX2T- ERK1 K71R.

Per comprendere meglio il ruolo del recettore S1P₁, durante l'effetto mitogenico del PDGF, venivano selezionate le cellule che superesprimevano stabilmente tale recettore; l'isolamento di queste cellule richiedeva l'applicazione di un agente selettivo per un gene marcatore trasfettato: il gene aminoglicoside fosfotransferasi (APH) conferisce resistenza all'antibiotico selettivo geneticina (G418) attraverso la sintesi dell'enzima APH, che inattiva il farmaco attraverso fosforilazione. Questo provocava la morte di tutte le cellule che non avevano integrato DNA trasfettato, consentendo alle cellule integranti di crescere in ampie colonie isolate (cloni), che potevano essere recuperate per analisi successive. Dopo 21 giorni veniva selezionato il clone stabile superesprimente S1P₁. La superespressione del recettore era verificata mediante analisi Western su lisati cellulari mediante l'impiego dell' anticorpo specifico per il recettore S1P₁.

Trasfezione con oligodeossinucleotidi antisenso per i recettori di S1P

Per inibire l'espressione dei diversi tipi di recettore per S1P in mioblasti C2C12, veniva utilizzata la tecnica di trasfezione con ODN-AS. Gli ODN-AS venivano sintetizzati come brevi sequenze complementari a regioni non conservate e non ripetute di sequenze nucleotidiche corrispondenti al codone di inizio traduzione dei recettori S1P₁, S1P₂ ed S1P₃. Erano utilizzati anche ODN di controllo. La trasfezione era effettuata in presenza di Oligofectamine Reagent, quando le cellule avevano raggiunto il 30-40% di confluenza; la formazione dei complessi Oligofectamine-DNA avveniva a temperatura ambiente per 20 min, come suggerito dalla ditta produttrice. In seguito i complessi

erano somministrati alle cellule piastrate il giorno prima della trasfezione. La concentrazione finale degli ODN-AS era di 20 μ M. Il trattamento si protraeva per 6 h in solo DMEM e poi il terreno era sostituito con DMEM contenente FCS al 10% per altre 24 h.

Trasfezione con siRNA specifici e di controllo

Il silenziamento dell'espressione di S1P₁, S1P₂, SphK1 e di SphK2 è stato effettuato mediante l'impiego di 2 brevi sequenze di RNA (siRNA) di 21 paia di basi. Un siRNA aspecifico era usato come controllo (scrambled).

Mioblasti C2C12 (50.000 cellule/pozzetto), erano piastrati in multiwell da 6 pozzetti in DMEM contenente FCS al 10%, mentre mesoangioblasti erano piastrati c.a. 80.000 per pozzetto, sempre in multiwell da 6 pozzetti in DMEM con FCS al 20% scomplementato. Venivano quindi trasfettati impiegando Oligofectamine Reagent o N-Ter Nanoparticle siRNA, in accordo con il protocollo. Oligofectamine Reagent era incubato con SphK1-siRNA, SphK2-siRNA e SphK1-siRNA (200nM) a temperatura ambiente per 20 min e successivamente i complessi lipidi/RNA erano aggiunti, previa delicata agitazione alle cellule in terreno senza siero. Dopo 48 h dalla trasfezione le cellule venivano usate per gli esperimenti. L'efficienza dello specifico silenziamento di S1P₂ era valutata sulla frazione delle membrane ottenute da mioblasti trasfettati con S1P₂-siRNA e con siRNA di controllo con immunoblot usando gli specifici anticorpi anti-S1P₂. Per S1P₁ il silenziamento era verificato mediante real time PCR. L'efficienza del silenziamento di SphK1 e di SphK2 era valutata mediante immunoblot su lisati cellulari totali usando gli specifici anticorpi anti-SphK1 e anti-SphK2.

Presentazione dei dati ed analisi statistica

I dati sono stati analizzati mediante il Test *t* Student ed un $p < 0.05$ è stato considerato significativo. Gli Western Blot sono rappresentativi di almeno tre blot con risultati analoghi.

-SFINGOSINA 1-FOSFATO MEDIA PROLIFERAZIONE E SOPRAVVIVENZA DI MESOANGIOBLASTI

Come già precedentemente detto, i mesoangioblasti sono cellule staminali in grado, perciò, di auto-rinnovarsi, derivate dall'aorta dorsale di embrione di topo e possono differenziare sia *in vivo* che *in vitro* in differenti tipi cellulari, come muscolo, tessuto osseo e tessuto adiposo, in risposta a specifici segnali extracellulari.

Proprio per le loro peculiarità, rappresentano attualmente dei possibili candidati per la terapia cellulare di patologie degenerative muscolari e per l'infarto del miocardio.

Nonostante i promettenti risultati ottenuti per il possibile impiego dei mesoangioblasti nell'ambito terapeutico, persistono problemi riguardanti l'espansione *in vitro* di tali cellule, il loro impianto e sopravvivenza nel microambiente, "tossico", del muscolo danneggiato. Appare quindi chiaro che la caratterizzazione di agonisti capaci di regolare la proliferazione e la sopravvivenza diventa sempre più di fondamentale importanza. Siccome le conoscenze su agenti extracellulari capaci di regolare processi biologici chiave nei mesoangioblasti sono limitate, in questa tesi è stato studiato l'effetto di S1P sulla proliferazione e sulla protezione dall'apoptosi indotta attraverso vari stimoli.

Per prima cosa è stato analizzato il pattern di recettori per S1P espressi nei mesoangioblasti murini D16. La presenza del trascritto dei diversi tipi di recettori è stata analizzata mediante retro-trascrizione da RNA totale e successiva PCR con specifici primers. Come si può osservare in figura 17 l'analisi mediante RT-PCR ha rilevato che in questo tipo cellulare erano espressi i recettori S1P₁, S1P₂, S1P₃ come dimostrato dalla presenza di frammenti di cDNA rispettivamente di 1000 bp, 600 bp, 225 bp, mentre non risultano espressi i sottotipi recettoriali S1P₄ e S1P₅. Per normalizzare i livelli di espressione come controllo interno di riferimento veniva amplificato un frammento di circa 250 bp corrispondente all'isoforma β dell'actina.

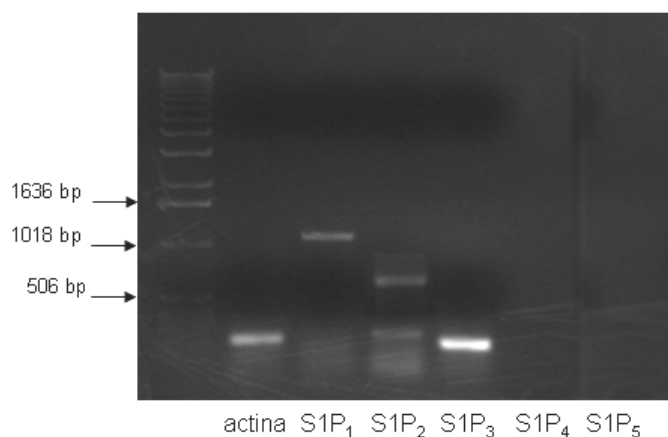


Figura 17 Analisi dell'espressione dei recettori SIP mediante RT-PCR in mesoangioblasti D16. Elettroforesi su gel di agarosio, colorato con bromuro di etidio, dei prodotti ottenuti mediante RT-PCR come descritto nella sezione materiali e metodi, confrontati con appositi markers 100bp PCR Low Ladder. L'amplificazione della β -actina veniva usata come controllo interno per normalizzare i livelli di espressione. Il gel mostrato è rappresentativo di tre esperimenti con risultati analoghi.

L'analisi quantitativa dei recettori, effettuata mediante Real-time PCR e normalizzata rispetto a SIP_1 ha appurato che, a livello di mRNA SIP_3 è il recettore più espresso seguito dal recettore SIP_1 e infine il meno espresso risulta essere SIP_2 (figura 18).

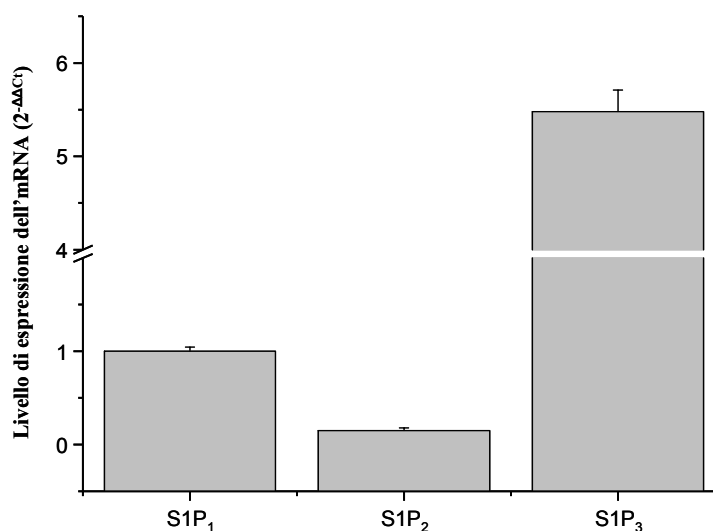


Figura 18 Analisi dell'espressione dell'mRNA per i SIPR mediante real time PCR in mesoangioblasti. I livelli di espressione per i recettori SIP_1 , SIP_2 e SIP_3 sono riportati in grafico mediante il metodo del $2^{-\Delta\Delta C_t}$ in cui come gene calibratore è stato considerato il gene per SIP_1 . I valori di Ct sono la media \pm S.D. dei triplicati di un esperimento significativo ripetuto tre volte con risultati analoghi.

Successivamente è stato esaminato l'effetto di SIP sulla proliferazione cellulare, valutando la capacità del lipide bioattivo di influenzare l'incorporazione di [3 H]timidina nel DNA di mesoangioblasti, opportunamente starvati per circa 16 h e incubati per 24 h

con diverse concentrazioni di S1P. Come riportato in figura 19, l'azione di S1P era dose dipendente con un effetto massimo alla concentrazione di 1 μ M.

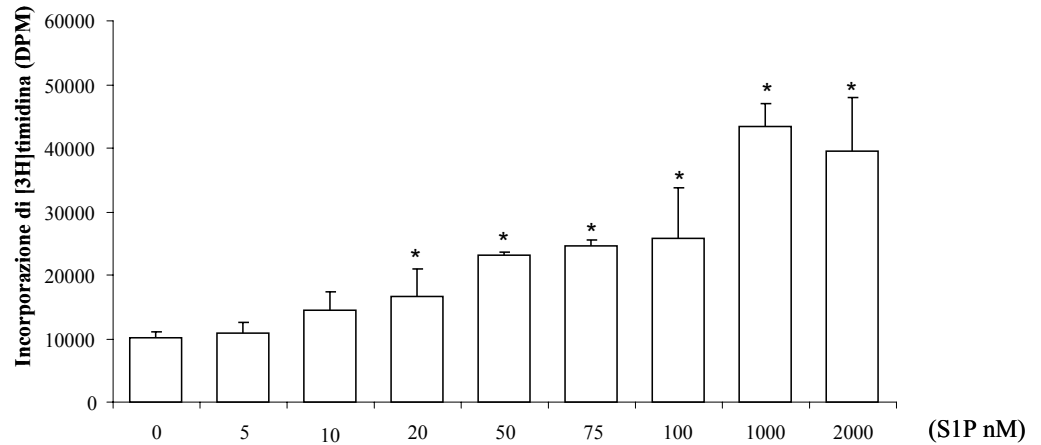


Figura 19 Dose dipendenza di S1P sulla proliferazione cellulare di mesoangioblasti valutata mediante incorporazione di [3H]timidina. I dati riportati sono le medie \pm S.D. dei triplicati di un esperimento significativo ripetuto tre volte con risultati analoghi. L'effetto di S1P era ritenuto statisticamente significativo [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

L'effetto mitogenico dello sfingolipide era confermato anche da esperimenti di conta cellulare dove il lipide bioattivo era capace di incrementare il numero delle cellule fino a 96 h di incubazione. Questi risultati dimostrano che S1P, in queste cellule, si comporta da mitogeno, inducendone la proliferazione (figura 20).

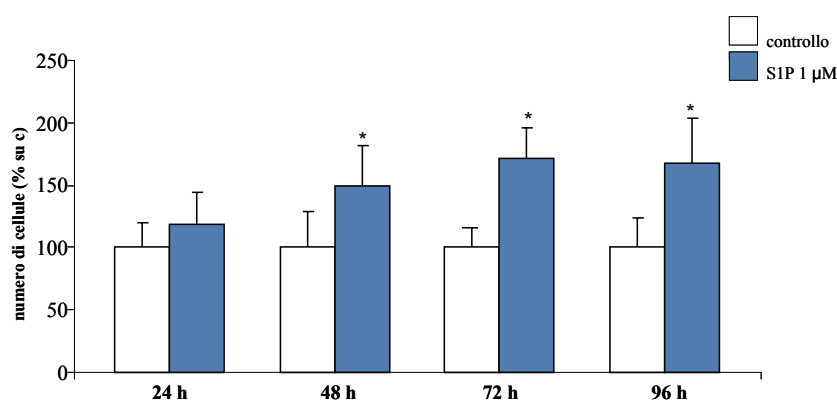


Figura 20 Effetto di S1P 1 μM sulla proliferazione di mesoangioblasti valutato mediante conteggio (in camera di Bürker) del numero di cellule a diversi tempi di stimolazione. I dati riportati corrispondono alla media ± S.D., espressa come variazione percentuale sul controllo (BSA 0,1%) preso uguale a 100. L'esperimento mostrato è rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti. [(*) $p < 0,05$, Test *t* di Student].

Siccome tutti i recettori di S1P espressi dai mesoangioblasti sono stati implicati nella risposta mitogenica esercitata dallo sfingolipide in diversi tipi cellulari, siamo andati ad indagare il ruolo dei singoli recettori mediante l'impiego di agonisti e antagonisti selettivi per ciascun recettore.

Nella figura 21 è mostrato che il trattamento per 24 h con SEW2871, agonista specifico di S1P₁, usato a diverse concentrazioni: 1, 10, 30 μM, non aveva alcun effetto sulla proliferazione cellulare, escludendo quindi il coinvolgimento di tale recettore nella risposta mitogenica.

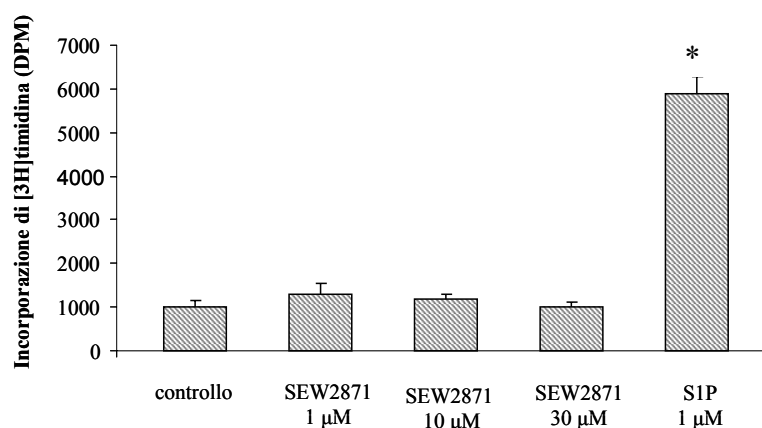


Figura 21 Effetto di SEW7821 e di S1P alle concentrazioni indicate, sulla proliferazione di mesoangioblasti. Le cellule venivano starvate per 24 h e trattate per le successive 24 h con l'agonista specifico di S1P₁, SEW7821 o con S1P. I dati sono le medie ± S.E.M. di almeno 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. [(*) $p < 0,05$, Test *t* di Student].

E' stato quindi impiegato JTE-013, l'antagonista selettivo per $S1P_2$, 30 minuti prima del trattamento con S1P e successiva incubazione per 24 h.

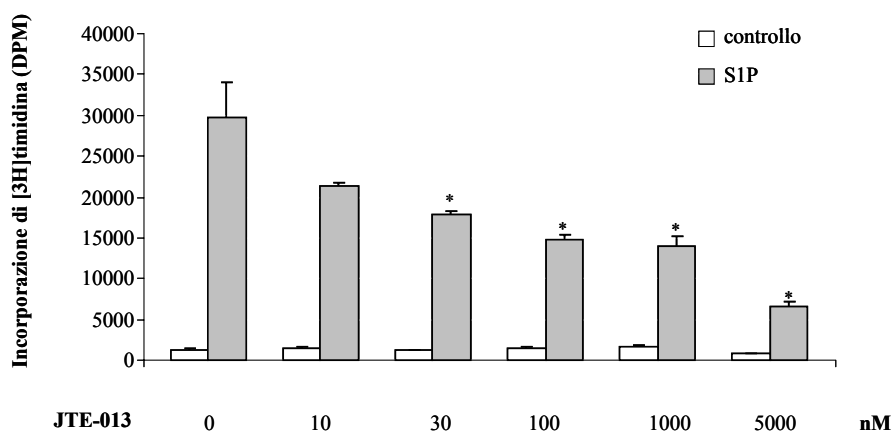


Figura 22 Effetto di JTE-013, antagonista specifico del recettore $S1P_2$ sulla proliferazione indotta da S1P in mesoangioblasti. Le cellule, opportunamente starvate, venivano trattate con JTE-013 30 min prima della somministrazione di S1P 1 μ M. I dati sono le medie \pm S.E.M. di almeno 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto di JTE-013 era statisticamente significativo già a una concentrazione uguale a 30 nM. [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

La somministrazione di JTE-013 riduceva notevolmente l'effetto proliferativo di S1P già a una concentrazione di 30 nM (figura 22), mentre il trattamento con VPC23019, 100 nM, un antagonista per $S1P_1/S1P_3$, con la stessa modalità, aumentava l'incorporazione basale di [3 H]timidina e diminuiva leggermente, ma non in maniera significativa, l'azione proliferativa dello sfingolipide, suggerendo un eventuale ruolo, secondario, di $S1P_3$ (figura 23).

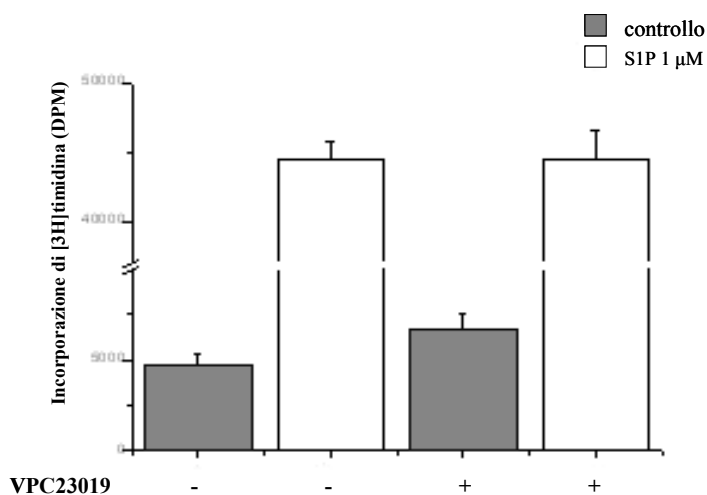


Figura 23 Effetto di VPC23019, antagonista specifico dei recettori $S1P_1/S1P_3$ sulla proliferazione indotta da S1P in mesoangioblasti. Le cellule starvate per privazione di siero, venivano trattate con VPC23019 100 nM 30 min prima della somministrazione di S1P 1 μ M. I dati sono le medie \pm S.E.M. di almeno 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato.

Questi dati dimostrano, pertanto, che S1P ha un'azione mitogenica in mesoangioblasti e che tale azione è mediata principalmente dal legame del lipide con il recettore $S1P_2$.

In letteratura è ampiamente riportato che in molti tipi cellulari S1P agisce come fattore anti-apoptotico promuovendo la sopravvivenza e la proliferazione cellulare [44].

Quindi l'effetto di S1P sulla proliferazione poteva essere associato ad una sua azione, sulla sopravvivenza dei mesoangioblasti; pertanto siamo andati a studiare i potenziali effetti anti-apoptotici di S1P in mesoangioblasti.

A tale scopo è stato analizzato se nei mesoangioblasti la stimolazione con S1P esercitasse un effetto protettivo sull'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero e dagli agenti pro-apoptotici C2-ceramide e staurosporina. L'effetto anti-apoptotico di S1P è stato valutato in cellule subconfluenti private di siero per 24 h. Le cellule venivano trattate con gli agenti pro-apoptotici C2-ceramide (10 μ M) e staurosporina (0,5 μ M), in condizioni di privazione di siero. Il C2-ceramide (10 μ M) veniva somministrato per 24 h alle cellule, un'ora dopo la privazione di siero mentre la staurosporina (0,5 μ M) veniva somministrata dopo 20 h dall'inizio della starvazione, per 4 h. Il trattamento con S1P 1 μ M veniva ripetuto due volte, 30 minuti e 18 h dopo l'inizio della starvazione.

Inizialmente è stata determinata la capacità di S1P di ridurre la formazione di mono- e oligonucleosomi citoplasmatici.

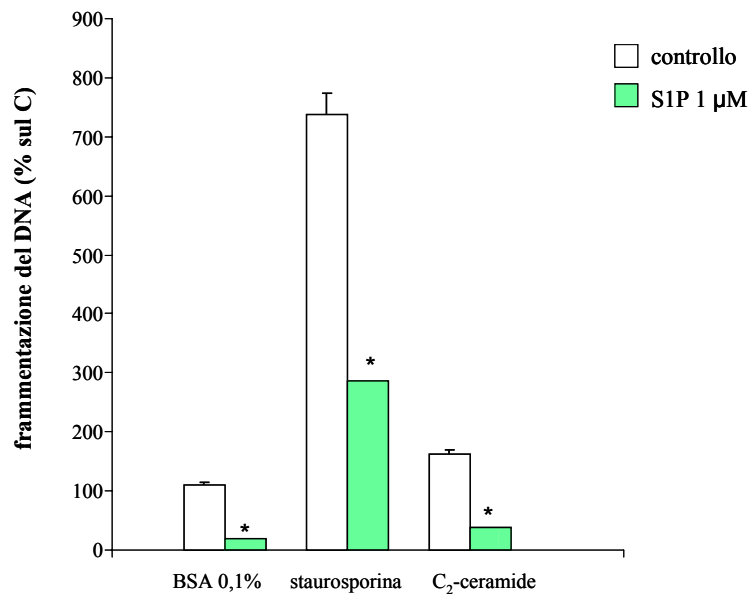


Figura 24 Effetto anti-apoptotico del trattamento con S1P 1 μ M in mesoangioblasti D16 subconfluenti, valutato mediante quantificazione dei nucleosomi presenti nel citosol. Le cellule erano cresciute in presenza di siero; l'apoptosi veniva indotta dalla privazione di siero o dal trattamento con staurosporina 0,5 μ M o con C2-ceramide 10 μ M. I dati sono riportati come percentuale relativa alla quantità di nucleosomi presenti nel citoplasma del controllo (BSA 0,1%, non stimolato) presa uguale a 100. I dati riportati sono le medie \pm S.D. relative ad un esperimento condotto in doppio rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi. [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

In figura 24 si può osservare che il trattamento con staurosporina 0,5 μ M o con C2-ceramide 10 μ M aumentavano il contenuto di nucleosomi nel citosol rispetto al controllo, confermando il ruolo pro-apoptotico di tali agenti nei mesoangioblasti. Da questo tipo di analisi veniva inoltre rilevato il ruolo della staurosporina come più efficiente agente pro-apoptotico tra quelli analizzati in questo tipo cellulare.

Il trattamento con S1P 1 μ M riduceva la presenza di nucleosomi nel citoplasma in tutte le condizioni sperimentali analizzate. In particolare, il trattamento con S1P 1 μ M revertiva completamente l'effetto pro-apoptotico dovuto alla privazione di siero e al trattamento con C2-ceramide 10 μ M, mentre riduceva del 65% l'induzione dell'apoptosi dovuta al trattamento con staurosporina 0,5 μ M.

Risultati analoghi si ottenevano mediante saggio di attività della caspasi-3. Caspasi-3 è una caspasi effettrice del processo apoptotico avente peso molecolare 32 kDa. Durante l'apoptosi l'attivazione proteolitica della caspasi-3 genera due frammenti

rispettivamente di 17 e 11 kDa, ne valutavamo l'attività enzimatica nelle stesse condizioni sperimentali utilizzate precedentemente.

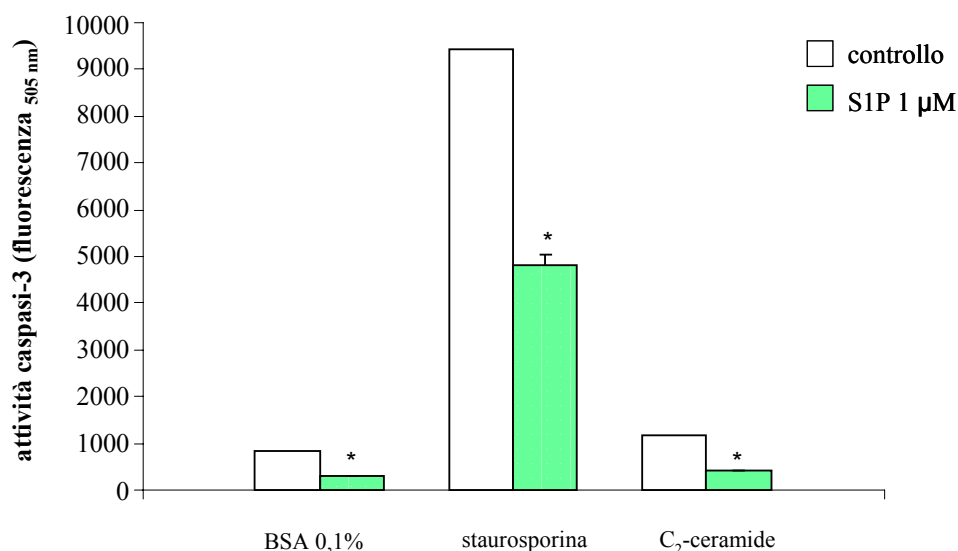


Figura 25 Effetto anti-apoptotico del trattamento con S1P 1 μ M in mesoangioblasti subconfluenti, valutato mediante dosaggio dell'attività enzimatica della caspasi-3. L'apoptosi veniva indotta mediante privazione di siero, dal trattamento con staurosporina (0,5 μ M) o C2-ceramide (10 μ M). L'attività enzimatica della caspasi-3 è stata dosata misurando, mediante fluorimetria, la fluorescenza emessa dal substrato fluorogenico Ac-DEVD-AFC (AFC) secondo il protocollo descritto nella sezione materiali e metodi. I dati riportati sono le medie \pm S.D. relative ad un esperimento condotto in doppio rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi. [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

Il trattamento con S1P 1 μ M, riduceva l'attività della caspasi-3 in tutte le condizioni sperimentali riportate. In particolare il trattamento con lo sfingolipide riduceva del 60% l'aumento dell'attività della caspasi-3 in seguito alla starvazione e al trattamento con C2-ceramide 10 μ M, e del 50% quello dovuto al trattamento con staurosporina 0,5 μ M. Dall'analisi dei dati riportati, veniva inoltre confermato che nei mesoangioblasti lo stimolo pro-apoptotico più efficiente tra quelli analizzati era il trattamento con staurosporina 0,5 μ M che causava l'aumento dell'attività della caspasi-3 di circa 90 volte rispetto al controllo (figura 25).

L'effetto anti-apoptotico di S1P è stato analizzato infine valutando l'incremento del numero di cellule totali sopravvissute alla morte cellulare programmata, indotta dalla privazione di nutrienti o dal trattamento con staurosporina 0,5 μ M.

In entrambe le condizioni sperimentali la stimolazione con S1P aumentava il numero di cellule totali sopravvissute (figura 26).

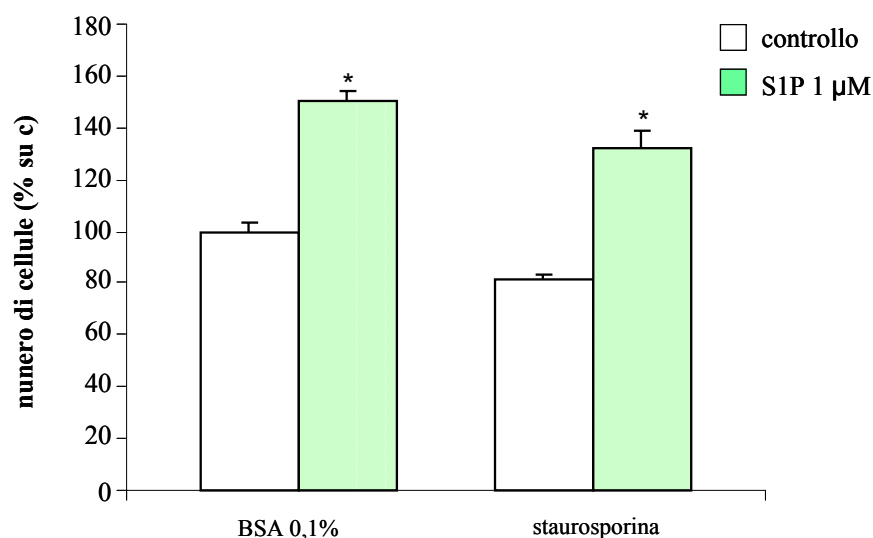


Figura 26 Effetto anti-apoptotico del trattamento con S1P 1 μ M in mesoangioblasti D16 valutato mediante conteggio in camera di Bürker del numero di cellule. L'apoptosi veniva indotta mediante privazione di siero e dal trattamento con staurosporina (0,5 μ M). I dati ottenuti sono riportati come variazione percentuale sul controllo (BSA 0,1%, non stimolato) preso uguale a 100. L'esperimento mostrato è rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti, i dati sono le medie \pm S.D. [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

L'effetto esercitato da S1P sulla sopravvivenza cellulare veniva valutato anche in esperimenti *in vivo*. Mesoangioblasti resi fluorescenti in seguito a trasfezione con un vettore codificante per GFP (Green Fluorescent Protein) erano pre-trattati con S1P 1 μ M per 12 h, ed iniettati (c.a. 1×10^5) direttamente nel muscolo tibiale anteriore destro di topi distrofici per la mancanza della proteina α -sarcoglicano. Il muscolo tibiale destro e il controlaterale (controllo) erano analizzati per valutare la morte cellulare programmata, mediante TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick-end labeling). Come mostrato in figura 27 il muscolo distrofico presentava segni di apoptosi e di morte cellulare. I mesoangioblasti che avevano subito il trattamento con S1P, prima di essere iniettati nel topo, presentavano una riduzione del $51\% \pm 4,3\%$ del processo apoptotico; dimostrando così che lo sfingolipide esercitava un'azione sulla sopravvivenza cellulare anche *in vivo*.

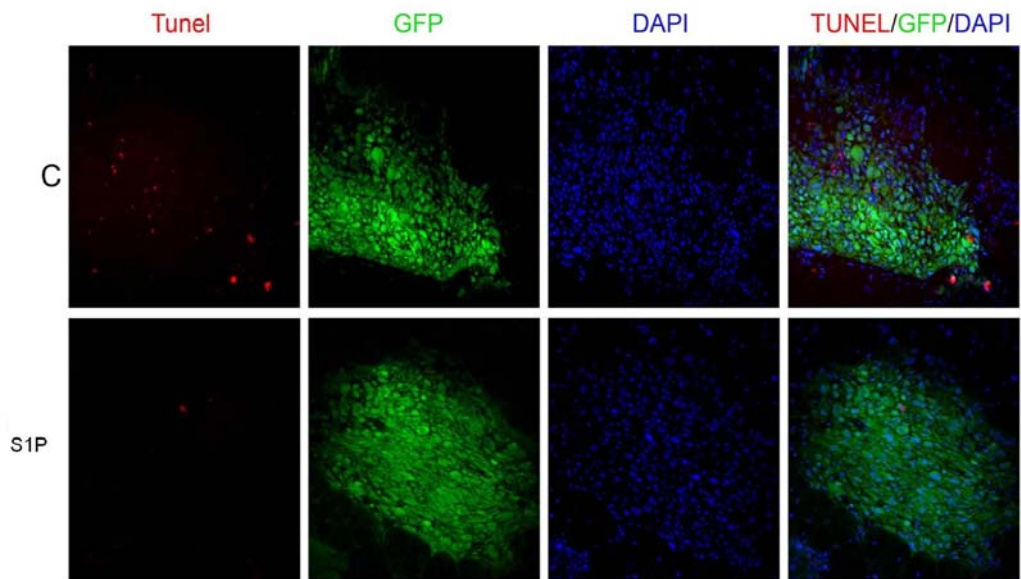


Figura 27 Effetto di S1P sulla sopravvivenza di mesoangioblasti superesprimenti GFP pre-trattati e non con S1P 1 μ M per 12 h. Le cellule venivano poi iniettate nel tibiale anteriore di un topo di 4 mesi knockout per α -sarcoglicano e dopo 12 h analizzate per valutare l'apoptosi mediante la tecnica TUNEL. L'immagine mostrata è rappresentativa di 4 esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Successivamente veniva analizzato il ruolo dei recettori per S1P nell'effetto anti-apoptotico esercitato dallo sfingolipide.

Inizialmente veniva impiegato SEW2871 (1 μ M) che, come mostrato dalla figura 28 non impediva la formazione, nel citoplasma, dei frammenti di DNA associato a istoni, indotta da staurosporina (0,5 μ M), escludendo perciò un possibile coinvolgimento di tale recettore nell'effetto anti-apoptotico dello sfingolipide. Venivano poi impiegati JTE-013 (1 μ M) e VPC23019 (100 nM) nelle stesse condizioni sopra descritte. La staurosporina veniva somministrata nelle ultime 4 h di deprivazione da siero, mentre S1P veniva sempre somministrata due volte.

L'effetto protettivo di S1P risultava solo leggermente diminuito dal trattamento con JTE-013 o VPC23019 scartando così anche un eventuale ruolo dei recettori S1P₂ e S1P₃ (figura 28).

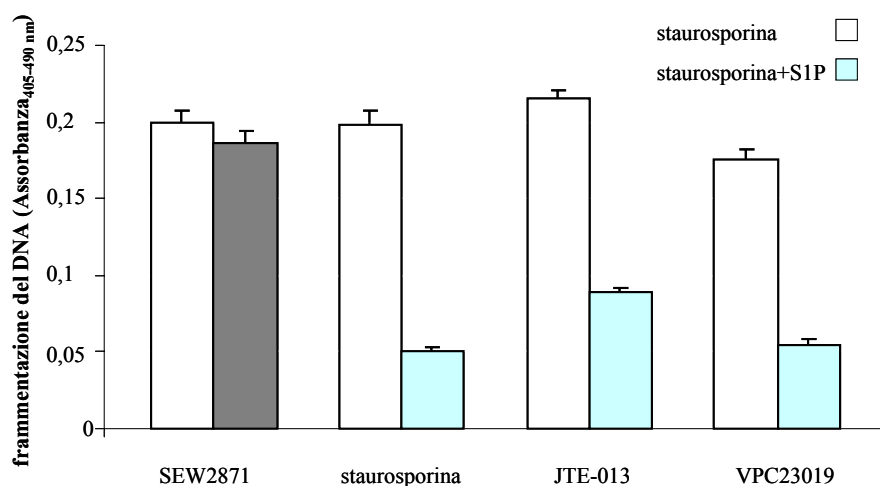


Figura 28 Effetto dell'agonista SEW2871 e degli antagonisti dei recettori di S1P, JTE-013 e VPC23019 sull'apoptosi indotta da staurosporina 0,5 μ M, valutato mediante quantificazione dei nucleosomi presenti nel citosol. Mesoangioblasti, venivano trattati con staurosporina 0,5 μ M per indurre l'apoptosi. Gli antagonisti dei S1PR erano somministrati 30 min prima del trattamento con S1P 1 μ M. I dati riportati sono le medie \pm S.D. della differenza di assorbanza tra 405 e 490 nm dei triplicati di un esperimento rappresentativo.

Ipotizziamo pertanto, sulla base dei dati ottenuti, che l'azione anti-apoptotica di S1P sia anche indipendente dal legame con i suoi recettori. Abbiamo cercato di comprendere quale potesse essere il meccanismo molecolare coinvolto nell'effetto biologico esercitato dallo sfingolipide in mesoangioblasti. Studiando, in particolare, l'eventuale coinvolgimento delle MAPK, sia nell'effetto mitogenico che di protezione dall'apoptosi. Per questo scopo venivano impiegati U0126 (10 μ M) e SB203580 (5 μ M) inibitori specifici delle chinasi a monte dell'attivazione di ERK1/2 e di p38 MAPK, rispettivamente.

Entrambi gli inibitori venivano somministrati 30 minuti prima del trattamento con S1P 1 μ M, in cellule che erano state precedentemente starvate in terreno privo di siero.

S1P induceva fosforilazione di p38 MAPK già dopo 1 minuto dal trattamento, anche se risultava massima dopo 5 minuti e permaneva fino a 30 minuti dalla stimolazione. Per quanto riguarda ERK1/2 MAPK la fosforilazione indotta da S1P era già massima dopo 5 minuti dalla somministrazione dello sfingolipide e si riscontrava anche successivamente dopo 30 minuti d'incubazione. Entrambi gli inibitori, U0126 e SB203580, come si può vedere dalla figura 29, erano in grado di inibire rispettivamente e specificatamente la fosforilazione di ERK1/2 e p38 MAPK.

Se le cellule venivano pre-trattate con JTE-013 (2 μ M), la fosforilazione di ERK1/2 e p38 MAPK, indotta da S1P, era significativamente ridotta dopo 10 minuti dal trattamento con il lipide bioattivo.

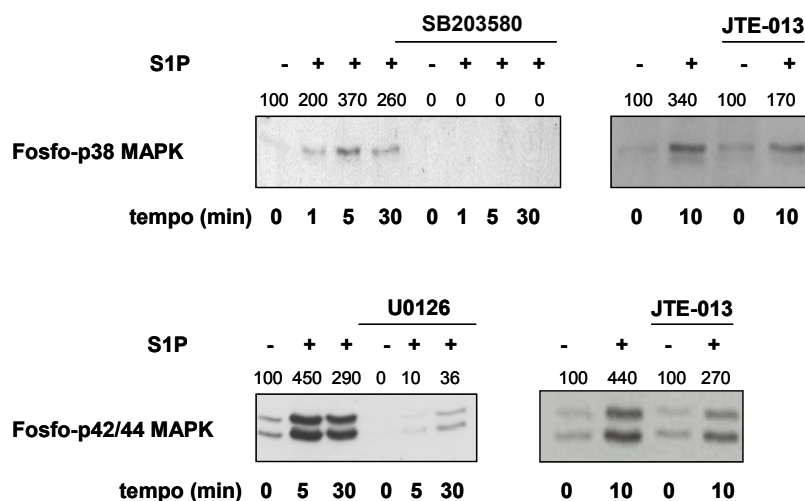


Figura 29 Analisi Western dell'azione degli inibitori U0126 (10 μ M) e SB203580 (5 μ M) sull'attivazione rispettivamente di ERK1/2 e p38 MAPK indotta da S1P 1 μ M, ed effetto del pre-trattamento di JTE-013 2 μ M sull'attivazione di ERK1/2 e p38 MAPK, da parte di S1P. L'intensità della banda corrispondente alla proteina fosforilata è riportata come percentuale relativa al proprio controllo, preso uguale a 100. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Inoltre il trattamento con U0126 riduceva fortemente l'incorporazione basale di [3 H]timidina e attenuava la stimolazione della sintesi di DNA indotta da S1P. Contrariamente SB203580 non aveva alcun effetto sull'azione proliferativa di S1P (figura 30).

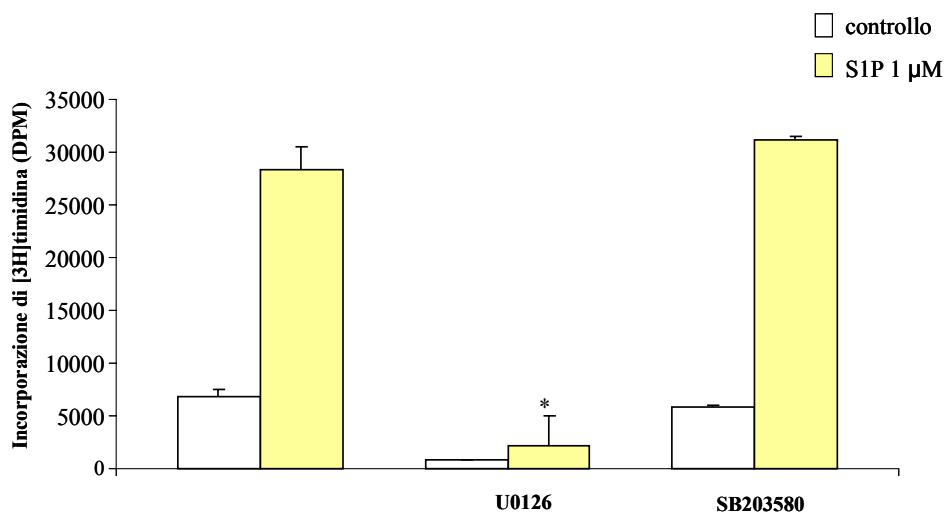


Figura 30 Effetto degli inibitori U0126 (10 μ M) e SB203580 (5 μ M), inibitori rispettivamente della chinasi a monte di ERK1/2 e p38 MAPK, sulla proliferazione indotta da S1P in mesoangioblasti. Le cellule starvate per privazione di siero, venivano trattate con i suddetti inibitori 30 min prima della somministrazione di S1P 1 μ M. I dati sono le medie \pm S.E.M. di almeno 3 esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto di U0126 era statisticamente significativo [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

Nessuno dei due inibitori invece, aveva effetto sull'azione protettiva dello sfingolipide sulla morte cellulare programmata, indotta da staurosporina, valutata mediante determinazione qualitativa e quantitativa dei frammenti di DNA associato a istoni, presenti nel citoplasma (figura 31).

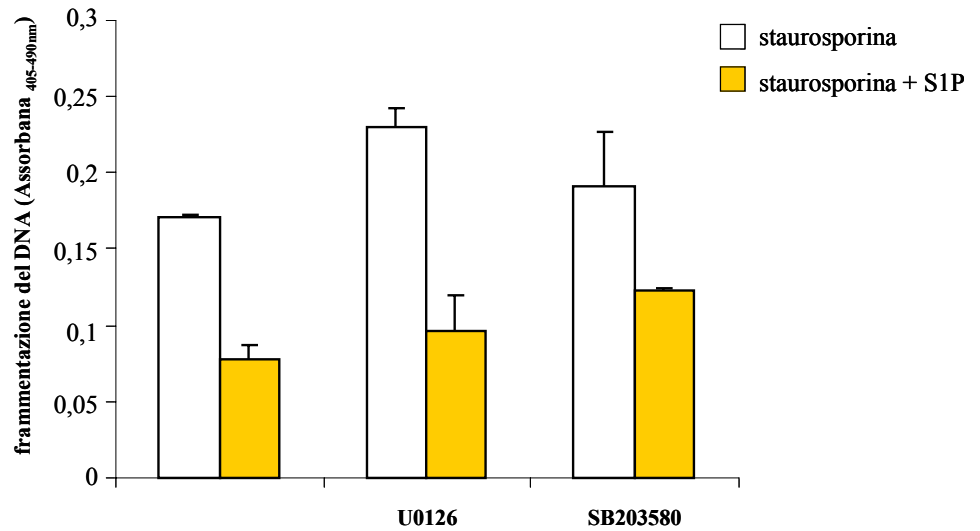


Figura 31 Effetto anti-apoptotico del trattamento con S1P 1 μ M in presenza degli inibitori U0126 e SB203580 in mesoangioblasti D16, valutato mediante quantificazione dei nucleosomi presenti nel citosol. L'apoptosi veniva indotta dal trattamento con staurosporina 0,5 μ M. I dati riportati sono le medie \pm S.D. della differenza di assorbanza tra 405 e 490 nm dei triplicati di un esperimento rappresentativo.

Risultava dunque chiaro da questi dati, che S1P attivava sia ERK1/2 che p38 MAPK, e che la via di segnalazione che prevedeva l'attivazione di ERK1/2 MAPK era coinvolta nell'effetto mitogenico di S1P in mesoangioblasti, mentre l'azione protettiva nei confronti dell'apoptosi, esercitata dallo sfingolipide, risultava indipendente dall'attivazione delle MAPK.

Infine, per una futura e promettente applicazione di queste cellule nella terapia cellulare, in pazienti affetti da malattie muscolari degenerative, abbiamo indagato se gli effetti esercitati da S1P su mesoangioblasti murini, si riscontravano anche in cellule di origine umana.

Di conseguenza abbiamo sottoposto queste cellule a trattamento con S1P 1 μ M, e nelle stesse condizioni adottate per i mesoangioblasti murini, siamo andati a valutarne l'effetto sulla proliferazione, mediante incorporazione di [3 H]timidina. Nella figura 32 viene

mostrato che anche nel caso dei mesoangioblasti umani il lipide bioattivo era in grado di indurre la sintesi di DNA esercitando un potente effetto mitogenico.

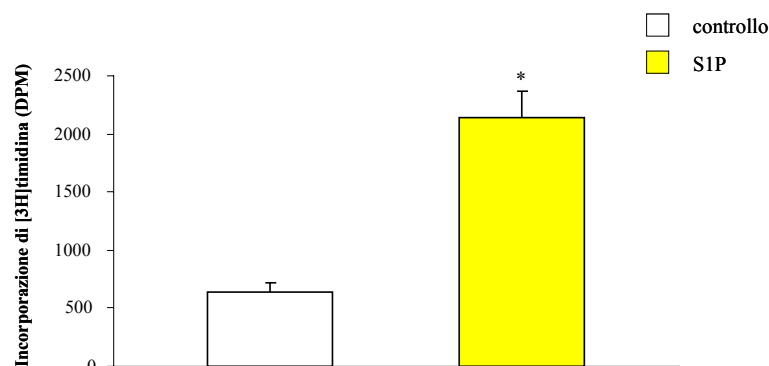


Figura 32 Effetto di SIP sulla proliferazione cellulare di mesoangioblasti umani valutata mediante incorporazione di [3H]timidina. I dati riportati sono le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto di SIP era ritenuto statisticamente significativo [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

Abbiamo inoltre verificato che lo sfingolipide era in grado di proteggere mesoangioblasti umani dall'apoptosi indotta per deprivazione di siero di c.a. un 70% e con staurosporina (0,5 μ M) di un 45%. Da notare che gli effetti, sia mitogenico che di protezione nei confronti dell'apoptosi, esercitati da SIP, erano comparabili a quelli riscontrati nei mesoangioblasti murini (figura 33).

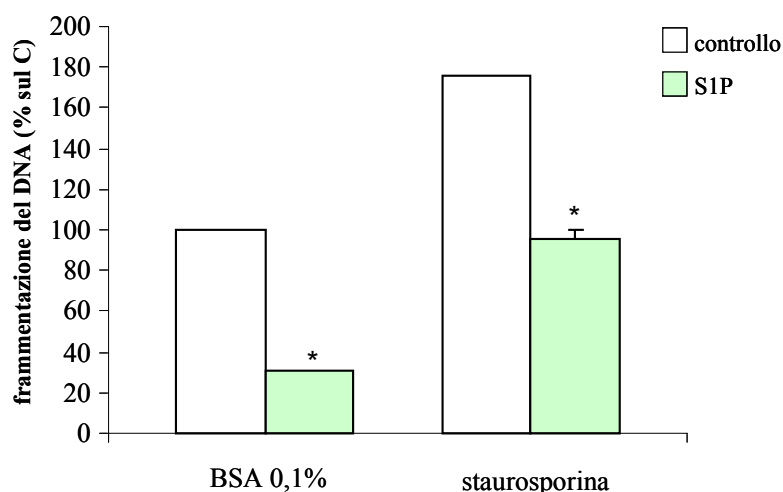


Figura 33 Effetto anti-apoptotico del trattamento con SIP 1 μ M in mesoangioblasti umani, valutato mediante quantificazione dei nucleosomi presenti nel citosol. Le cellule erano cresciute in presenza di siero; l'apoptosi veniva indotta dalla privazione di siero o dal trattamento con staurosporina 0,5 μ M. I dati sono riportati come percentuale relativa alla quantità di nucleosomi presenti nel citoplasma del controllo (BSA 0,1%, non stimolato) presa uguale a 100. I dati riportati sono le medie \pm S.D. relative ad un esperimento condotto in doppio rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi. [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

-TGFB PROTEGGE MESOANGIOBLASTI D16 DALL'APOPTOSI MEDIANTE REGOLAZIONE DI SPHK-1

I mesoangioblasti sono una nuova classe di cellule staminali che possono differenziare in cellule della muscolatura liscia in risposta al TGF β . Essi esprimono, infatti, ad alti livelli, alcuni membri della via di segnalazione della citochina compresi i recettori T β R-I e T β R-II e le proteine effettrici Smad [307]. Inoltre, è stato dimostrato che il trattamento di mesoangioblasti D16 con TGF β porta all'induzione di due proteine, *ncdina* e *msx2*, responsabili dell'attivazione della trascrizione di specifici geni coinvolti nel programma di differenziamento a muscolo liscio [308]. Le proteine appartenenti alla famiglia del TGF β sono molecole che svolgono un ruolo essenziale in processi cellulari come differenziamento, migrazione e sopravvivenza, così come in processi fisiologici che includono lo sviluppo embrionale, l'angiogenesi e i processi di riparazione da danno. Da sottolineare però, che in base al tipo cellulare, allo stato di differenziamento delle cellule e al microambiente in cui esse si trovano, la citochina può promuovere o inibire processi come la proliferazione cellulare, l'apoptosi e il differenziamento. In alcuni tipi cellulari TGF β è in grado di regolare positivamente l'attività e l'espressione di SphK1, enzima chiave nella produzione di S1P e, in accordo con il ruolo biologico esercitato dallo sfingolipide, regolare crescita cellulare e sopravvivenza [212,210]. Il crosstalk tra le vie di segnalazione di S1P e TGF β , recentemente ben illustrato, [309] impiega molteplici meccanismi che vanno, appunto dalla regolazione positiva dell'espressione di SphK1 e della sua attività da parte del TGF β , all'attivazione delle proteine Smad da parte di S1P.

Ben poco invece, si sa, attualmente, per quanto concerne l'effetto del TGF β sulla sopravvivenza di cellule staminali [310].

Quindi, data l'importanza della citochina nella biologia dei mesoangioblasti D16, le recenti evidenze sull'azione mitogenica e anti-apoptotica di S1P, e le interazioni funzionali tra le vie di segnalazione degli sfingolipidi, ed in particolare S1P e TGF β , abbiamo ritenuto interessante valutare l'effetto del TGF β sulla sopravvivenza di mesoangioblasti murini.

Per prima cosa è stato analizzato se la citochina, anche in questo tipo cellulare, avesse un effetto protettivo sull'apoptosi. A tal fine è stato perciò esaminato se il trattamento con TGF β 5ng/ml inibisse l'apoptosi indotta dalla deprivazione di siero e dall'agente

pro-apoptotico staurosporina, in condizioni sperimentali analoghe a quelle che hanno evidenziato l'effetto anti-apoptotico di S1P, nei mesoangioblasti.

L'effetto anti-apoptotico del TGF β è stato studiato mediante due diverse metodologie.

Come mostrato in figura 34 il trattamento con la citochina revertiva completamente il processo apoptotico indotto dalla privazione di siero o dal trattamento con staurosporina 0,5 μ M.

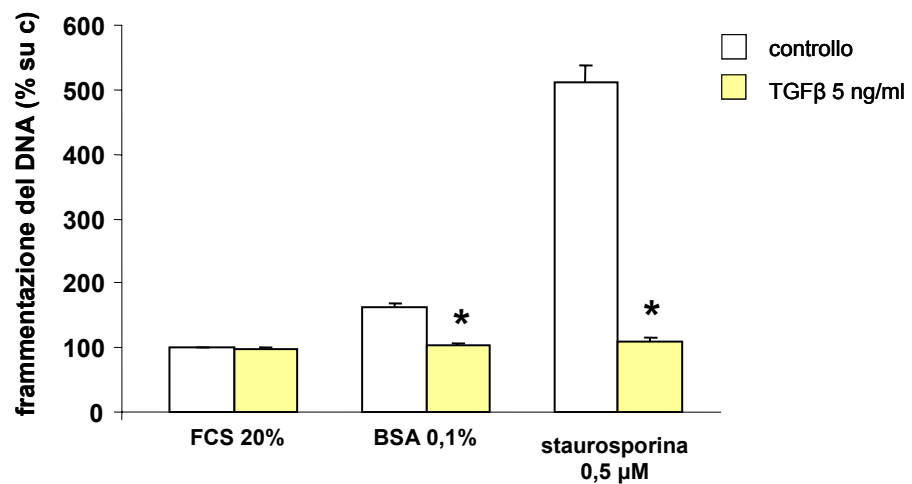


Figura 34 Effetto anti-apoptotico del trattamento con TGF β 5 ng/ml in mesoangioblasti murini subconfluenti, valutato mediante quantificazione dei nucleosomi presenti nel citosol. Le cellule erano cresciute in presenza di siero; l'apoptosi veniva indotta dalla privazione di siero o dal trattamento con staurosporina 0,5 μ M. I dati sono riportati come percentuale relativa alla quantità di nucleosomi presenti nel citoplasma del controllo (FCS 20%, non stimolato) presa uguale a 100. I dati riportati sono le medie \pm S.D. relative ad un esperimento condotto in doppio rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi. [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

Esperimenti successivi, in cui veniva valutata l'attività della caspasi-3, erano in pieno accordo con questi risultati: il TGF β riduceva fortemente l'attività della caspasi effettore del processo apoptotico presa in esame, in entrambe le condizioni sperimentali analizzate: deprivazione di siero e staurosporina 0,5 μ M (figura 35).

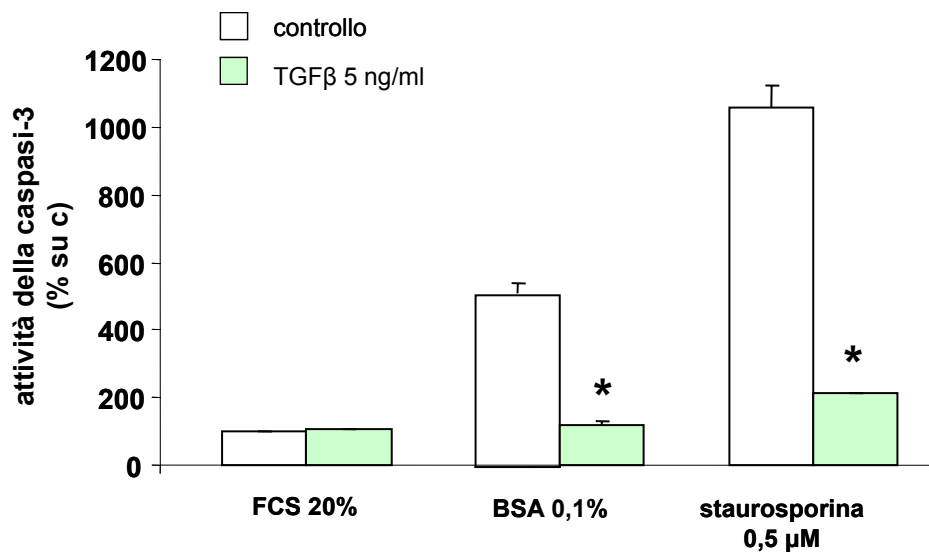


Figura 35 Effetto anti-apoptotico del trattamento con TGFβ 5 ng/ml in mesoangioblasti subconfluenti, valutato mediante dosaggio dell'attività enzimatica della caspasi-3. L'apoptosi veniva indotta mediante privazione di siero e dal trattamento con staurosporina (0,5 μM). L'attività enzimatica della caspasi-3 è stata dosata misurando, mediante fluorimetria, la fluorescenza emessa dal substrato fluorogenico Ac-DEVD-AFC (AFC) secondo il protocollo descritto nella sezione materiali e metodi. I dati sono riportati come percentuale relativa al controllo (FCS 20%, non stimolato) presa uguale a 100. I dati riportati sono le medie ± S.D. relative ad un esperimento condotto in doppio rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi. [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

Inoltre abbiamo osservato che la citochina era anche in grado di inibire uno dei segnali precoci del processo apoptotico, come l'esposizione della PS sul versante esterno della membrana, rivelato mediante colorazione con Annexina V e analizzato poi al FACS (figura 36).

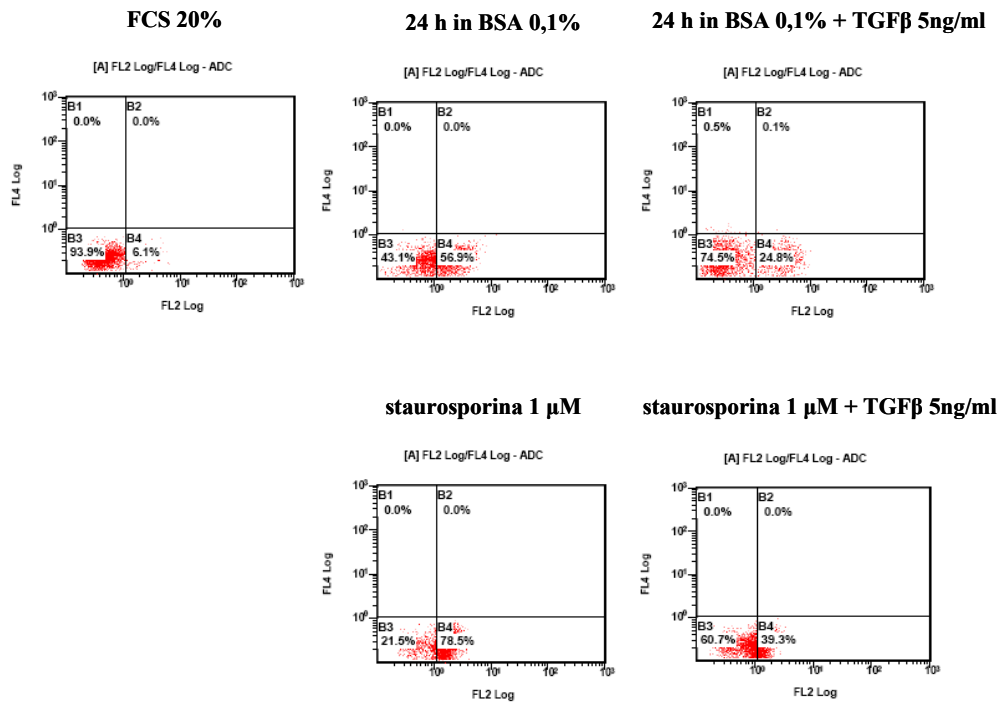


Figura 36 Effetto anti-apoptotico del TGFβ 5 ng/ml in mesoangioblasti sull'apoptosi indotta da privazione di siero per 24 h e con staurosporina 1 μM, valutata al citofluorimetro mediante colorazione con PE- Annessina V che lega la PS esposta sul versante esterno del plasmalemma, da cellule in una fase iniziale di morte cellulare programmata. L'esperimento mostrato è rappresentativo di tre esperimenti condotti indipendentemente con risultati analoghi. L'effetto del TGFβ era statisticamente significativo [(*) $p < 0,05$, Test t di Student].

Il passo successivo è stato quello di studiare se il trattamento con TGFβ fosse in grado di influenzare l'attività della SphK, enzima che genera S1P; questo evento, in molte linee cellulari, rappresenta una parte del complesso meccanismo d'azione che implica il crosstalk tra la segnalazione di S1P e TGFβ [210,212]. Come si può osservare in figura 37, la stimolazione di mesoangioblasti confluenti con TGFβ 5 ng/ml induceva una rapida e transiente attivazione di SphK, raggiungendo un picco dopo 5 minuti di stimolazione, dove si riscontrava un aumento del 35% nell'attività dell'enzima, rispetto all'attività di base, per tornare dopo 120 minuti di trattamento ai livelli basali.

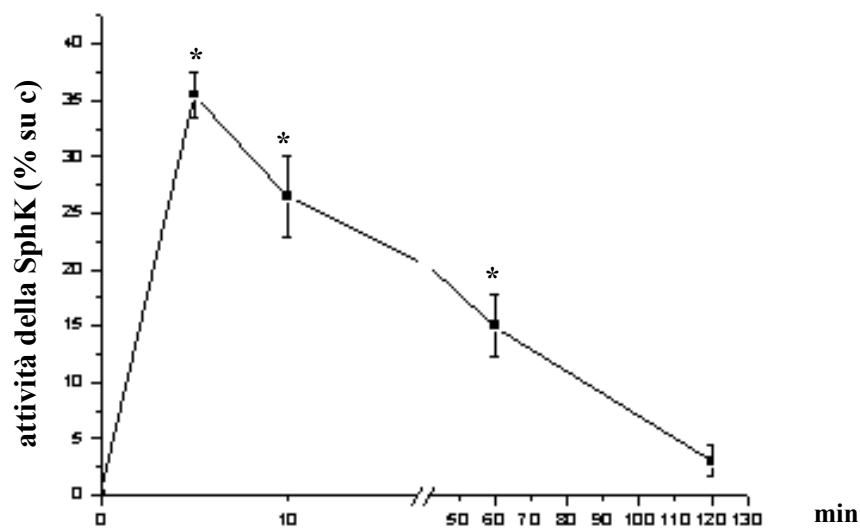


Figura 37 Effetto del TGF β 5 ng/ml in mesoangioplasti confluenti, sull'attività della SphK. Cellule opportunamente starvate venivano trattate con TGF β 5 ng/ml per i tempi indicati. L'attività della SphK di controllo (non trattato) era uguale a $11 \pm 1,9$ pmol/min/mg. I dati mostrati sono la media \pm S.E.M. di 4 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. L'effetto del TGF β era statisticamente significativo[*] $p < 0,05$, Test t di Student].

È stato quindi studiato il possibile coinvolgimento di SphK nell'effetto anti-apoptotico della citochina, valutando l'attività di caspasi-3 in cellule trattate con TGF β preincubate con inibitori di SphK. Come mostrato in figura 38, in cui veniva indotta apoptosi mediante impiego di staurosporina, l'inibizione farmacologica dell'enzima riduceva significativamente l'azione anti-apoptotica della citochina.

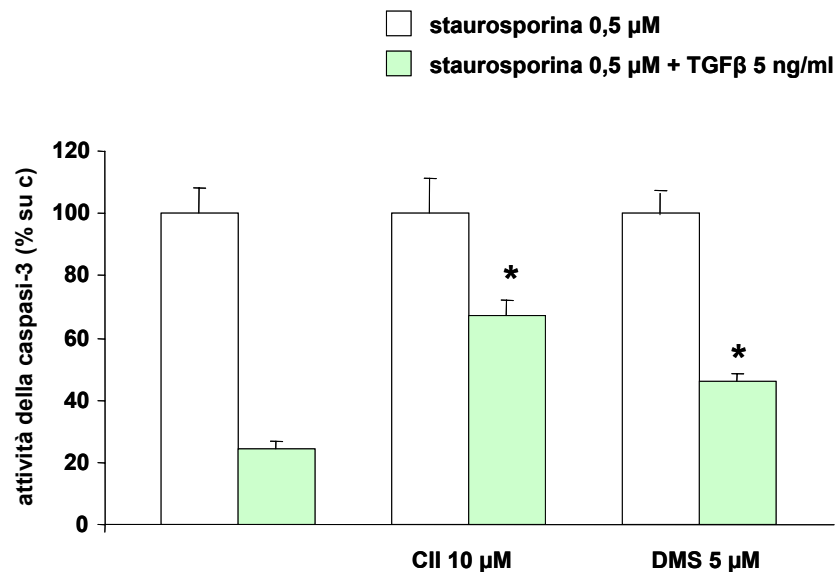


Figura 38 Effetto degli inibitori CII (10 µM) e DMS (5 µM) sull'azione anti-apoptotica del TGFβ 5 ng/ml in mesoangioblasti murini confluenti, valutato mediante dosaggio dell'attività enzimatica della caspasi-3. L'apoptosi veniva indotta dal trattamento con staurosporina 0,5 µM per 4 h. I dati sono riportati come percentuale relativa al trattamento con sola staurosporina presa uguale a 100. I dati mostrati sono le medie ± S.E.M. relative a 3 esperimenti indipendenti condotti in doppio con risultati analoghi. Entrambi gli inibitori mostravano un effetto statisticamente significativo[*] $p < 0,05$, Test t di Student].

Poichè esistono due isoforme dell'enzima SphK: SphK1 e SphK2, per poter valutare il loro contributo specifico nell'azione protettiva del TGFβ nei mesoangioblasti, abbiamo eseguito lo stesso tipo di esperimento in cellule in cui veniva regolata negativamente l'espressione di SphK1 o SphK2, mediante l'impiego di siRNA specifici per le singole isoforme enzimatiche.

Innanzitutto è stata valutata l'efficacia degli siRNA specifici nel silenziare le due isoforme dell'enzima mediante analisi Western. Le cellule erano trasfettate secondo il protocollo precedentemente descritto e i livelli di espressione di SphK1 e SphK2 venivano valutati su lisato di cellule trasfettate con siRNA non specifico (scrambled) e siRNA specifico per le due isoforme. Come mostrato in figura 39, il trattamento con siRNA specifico per le due isoforme di SphK, riduceva efficacemente i livelli di espressione sia di SphK1, che di SphK2.

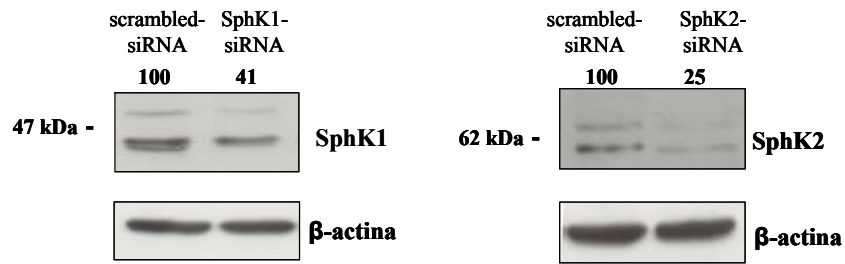


Figura 39 *Analisi Western dell'espressione di SphK1 e SphK2 su lisati cellulari di mesoangioblasti trasfettati con siRNA non specifico (scrambled) e specifico per le due isoforme dell'enzima SphK (SphK1-siRNA e SphK2-siRNA). L'intensità delle bande, analizzata mediante analisi densitometrica quantitativa, è stata riportata come percentuale relativa all'intensità della banda corrispondente al rispettivo controllo, presa uguale a 100. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi.*

Quando veniva valutata l'azione anti-apoptotica della citochina, in mesoangioblasti trasfettati con i siRNA specifici per le due isoforme dell'enzima SphK, l'effetto era notevolmente ridotto solo quando i livelli di espressione dell'isoforma SphK1, e non di SphK2, venivano regolati negativamente (figura 40). Questi risultati dimostrano un ruolo chiave dell'isoforma SphK1 nel mediare l'effetto anti-apoptotico di TGF β .

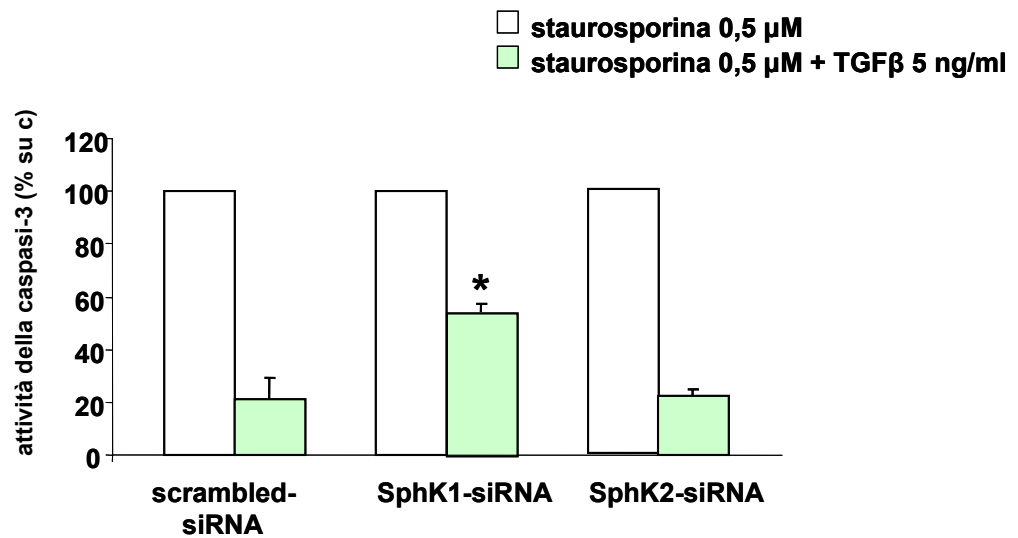


Figura 40 Effetto della trasfezione con siRNA specifico per SphK1 e SphK2 sull'azione anti-apoptotica del TGFβ 5 ng/ml in mesoangioblasti, valutato mediante dosaggio dell'attività enzimatica della caspasi-3. L'apoptosi veniva indotta dal trattamento con staurosporina 0,5 μM per 4 h. I dati sono riportati come percentuale relativa al trattamento con sola staurosporina 0,5 μM, presa uguale a 100. I dati mostrati sono le medie ± S.E.M. relative a 3 esperimenti indipendenti condotti in doppio con risultati analoghi. Il trattamento con SphK1-siRNA era statisticamente significativo [$(*)p < 0,05$, Test t di Student].

Per confermare ulteriormente i dati ottenuti, mesoangioblasti venivano trasfettati con un plasmide contenente cDNA codificante per SphK1^{G82D}, dominante negativo dell'enzima (DNSphK1) [42]. L'avvenuta superespressione della proteina ricombinante veniva verificata mediante Western Blotting (figura 41).

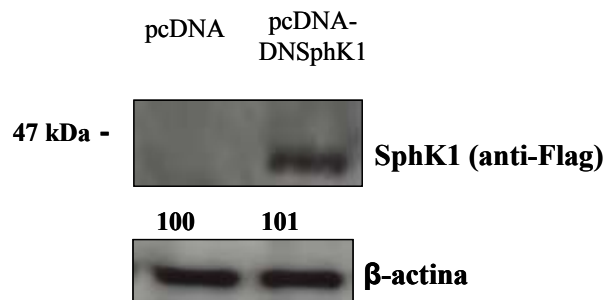


Figura 41 Analisi Western della superespressione di SphK1 mediante impiego di anticorpo anti-FLAG su lisati cellulari di mesoangioblasti trasfettati con pcDNA-DNSphK1 e vettore vuoto. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Come mostrato in figura 42 l'azione protettiva della citochina in mesoangioblasti superesprimenti la forma mutata di SphK1, era notevolmente attenuata.

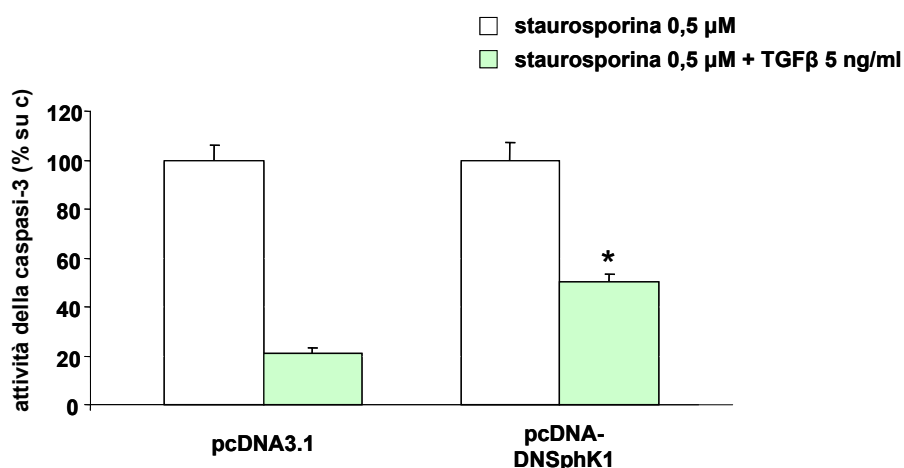


Figura 42 Effetto della trasfezione con pcDNA3.1 e pcDNA-SphK1 in cellule D16, sull'azione anti-apoptotica del TGFβ, mediante saggio di attività della caspasi-3. L'apoptosi era indotta mediante trattamento per 4 h con staurosporina 0,5 μM. I dati sono le medie ± S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in duplicato. L'effetto anti-apoptotico di TGFβ era significativamente ridotto in cellule trasfettate con pcDNA-SphK1 [(*) p<0,01; Test t di Student].

Tutti questi dati confermano quindi, un coinvolgimento di SphK1 nell'azione anti-apoptotica di TGFβ.

In letteratura numerosi dati sono a favore di un importante ruolo dell'asse SphK1/S1P nella sopravvivenza cellulare, che può essere alterato attraverso differenti meccanismi [311,312,313]. Abbiamo perciò studiato l'effetto del TGFβ sull'attivazione, così come sui livelli di espressione di SphK1 durante il processo apoptotico, indotto mediante trattamento con staurosporina 0,5 μM.

In figura 43 è mostrato che il trattamento con TGFβ 5ng/ml, in presenza di staurosporina 0,5 μM, incrementava l'attività di SphK di ben 3 volte, tale aumento rispecchiava la capacità della citochina nel regolare positivamente, nelle stesse condizioni sperimentali, i livelli di espressione di SphK1, ridotti dal trattamento con l'agente apoptotico. Anche il livello di espressione di SphK2 era ridotto dalla somministrazione di staurosporina 0,5 μM, ma la citochina non era in grado di influenzarne l'espressione (figura 44).

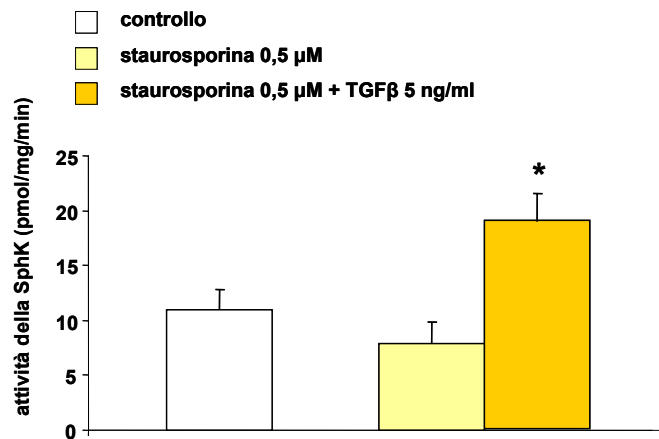


Figura 43 Effetto del TGFβ 5 ng/ml sull'attività della SphK, in mesoangioblasti in presenza di staurosporina 0,5 µM, somministrata per 4 h. Cellule opportunamente starvate venivano trattate con TGFβ 5 ng/ml, 30 min e 18 h dopo la starvazione. I dati mostrati sono la media ± S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. L'effetto del TGFβ sull'attività di SphK era statisticamente significativo[*] $p < 0,05$, Test *t* di Student].

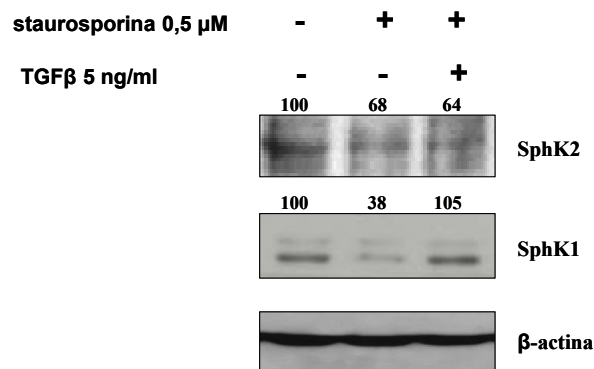


Figura 44 Analisi Western dell'effetto del TGFβ 5 ng/ml in mesoangioblasti sui livelli di espressione di SphK1 e SphK2 in presenza di staurosporina 0,5 µM, somministrata per 4 h. L'analisi dell'espressione dell'isoforma β dell'actina (non muscolo specifica) veniva effettuata per verificare l'applicazione di uguali quantità di proteine. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Per comprendere il meccanismo molecolare con il quale il TGFβ, attraverso la regolazione di SphK, protegge i mesoangioblasti dall'apoptosi, abbiamo studiato le vie di PKB/Akt ed ERK1/2 perché queste chinasi sono già state identificate come effettori del TGFβ nel processo di protezione dall'apoptosi [314]. Come si può vedere dalla figura 45, sia la fosforilazione di PKB/Akt che di ERK1/2 risultava ridotta dal trattamento con staurosporina 0,5 µM, confermando così la correlazione tra l'attivazione

di queste vie di segnalazione e la sopravvivenza di mesoangioblasti. In modo interessante il trattamento con TGF β 5ng/ml aumentava la fosforilazione di Akt ed ERK1/2, ridotta dal trattamento con staurosporina (figura 45).

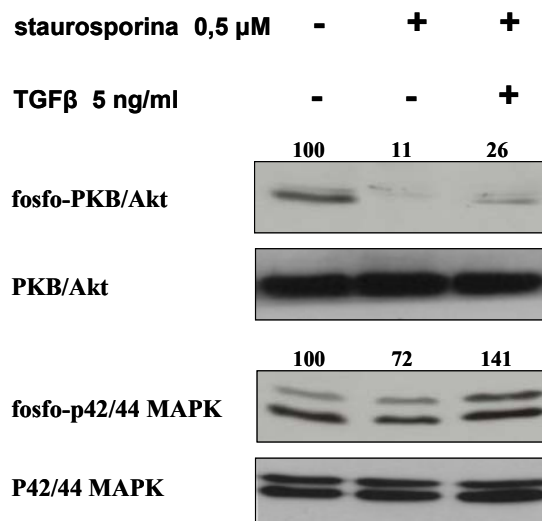


Figura 45 *Analisi Western dell'effetto di staurosporina 0,5 μ M sulla fosforilazione di PKB/Akt e ERK1/2 MAPK in mesangioblasti opportunamente starvati e trattati successivamente con TGF β 5 ng/ml. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. L'intensità della banda corrispondente alla proteina fosforilata era valutata mediante analisi densitometrica quantitativa normalizzata sul suo contenuto totale e riportata come percentuale relativa al controllo (non trattato con staurosporina, non stimolato con TGF β) preso uguale a 100.*

Per comprendere il ruolo di PKB/Akt ed ERK1/2 nell'azione anti-apoptotica del TGF β nei mesangioblasti, venivano eseguiti esperimenti analoghi ai precedenti, in presenza di U0126 10 μ M o LY294002 10 μ M, inibitori rispettivamente di p42/44 MAPK e di PI3K/Akt. Come risulta evidente dalla figura 46, l'abilità del TGF β di incrementare l'attività di SphK durante l'apoptosi indotta con staurosporina, era completamente abolita in mesoangioblasti trattati con U0126, mentre l'aumento dell'attività dell'enzima permaneva nelle cellule pre-trattate con LY294002, o risultava leggermente diminuita, ma non in modo significativo. Questi dati dimostrano che la via di segnalazione di ERK1/2 è coinvolta nell'attivazione di SphK indotta da TGF β .

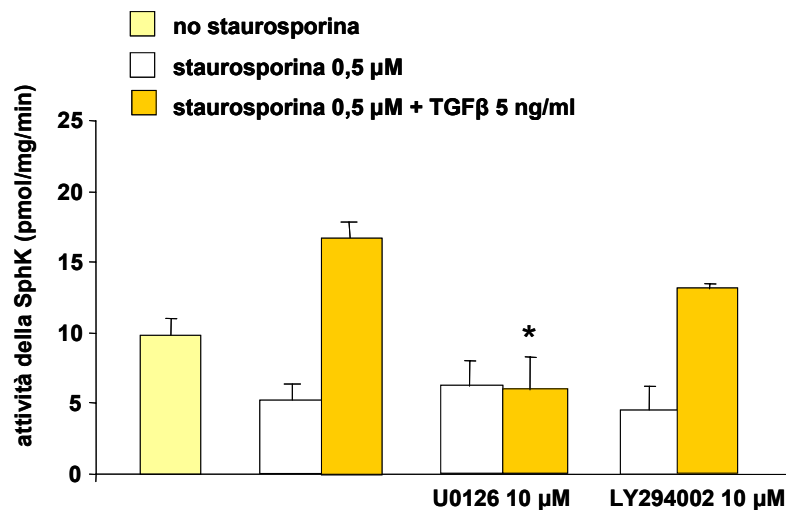


Figura 46 Effetto degli inibitori U0126 (10 μM) e LY294002 (10 μM) sull'attività della SphK in mesoangioblasti in presenza di staurosporina 0,5 μM trattati con TGFβ 5 ng/ml. Cellule opportunamente starvate venivano trattate per, 45 min con i suddetti inibitori. I dati mostrati sono la media ± S.E.M. di 3 esperimenti indipendenti. L'effetto dell'inibitore U0126 sull'attività di SphK, indotta da TGFβ era statisticamente significativo[*]p<0,05, Test t di Student].

Il ruolo di PKB/Akt e ERK1/2 MAPK è stato studiato anche per quanto concerne la regolazione positiva dell'espressione di SphK1 indotta dalla citochina come parte dell'azione anti-apoptotica. L'inibizione farmacologica di PKB/Akt e ERK1/2 MAPK riduceva in modo consistente l'espressione di SphK1 indotta da TGFβ, sia quando veniva inibita ERK1/2, sia quando era inibita la PI3K (figura 47).

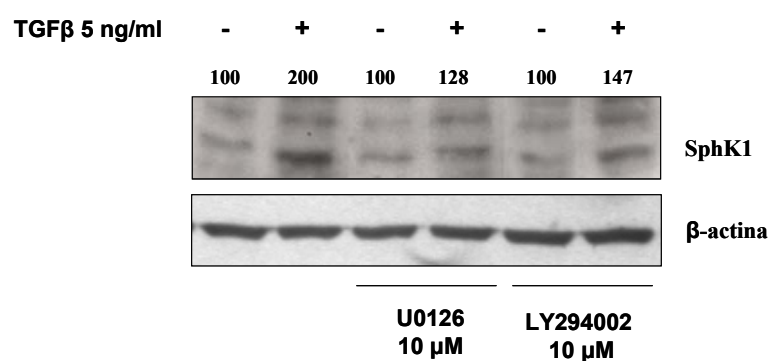


Figura 47 Analisi Western dell'effetto degli inibitori U0126 e LY294002 in cellule D16 incubate per 4 h in presenza di staurosporina 0,5 μM sull'espressione dell'enzima SphK, trattate e non con TGFβ 5 ng/ml. L'analisi dell'espressione dell'isoforma β dell'actina (non muscolo specifica) veniva effettuata per verificare l'applicazione di uguali quantità di proteine. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. L'intensità delle bande, analizzata mediante analisi densitometrica quantitativa è stata riportata come percentuale relativa all'intensità della banda corrispondente al rispettivo controllo (non trattato con TGFβ) presa uguale a 100.

Quando mesoangioblasti venivano pre-trattati con gli inibitori U0126 ed LY294002 l'azione anti-apoptotica della citochina, valutata mediante quantificazione di nucleosomi presenti nel citosol, era ridotta in seguito al trattamento con U0126, inibitore di ERK1/2, ma non dalla somministrazione di LY294002 (figura 48).

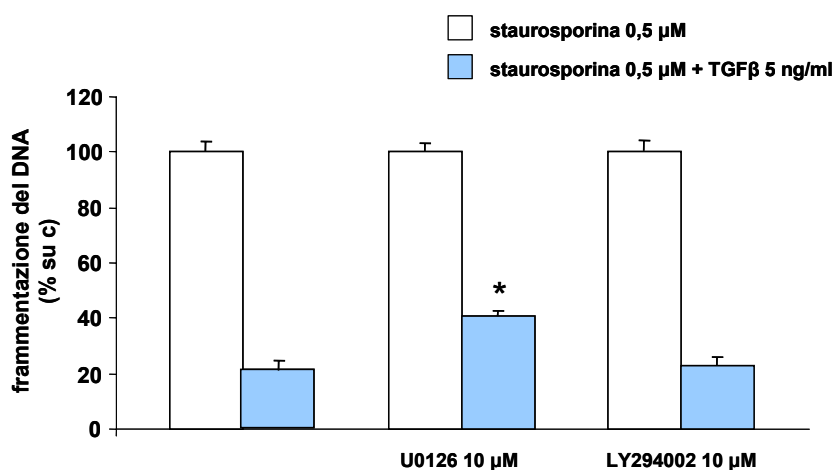


Figura 48 Effetto del trattamento con gli inibitori di ERK1/2 MAPK e di PKB/Akt, U0126 e LY294002 rispettivamente, sull'azione anti-apoptotica di TGFβ 5 ng/ml, in mesoangioblasti D16 in cui era indotta apoptosi mediante trattamento con staurosporina. L'effetto veniva valutato mediante quantificazione dei nucleosomi presenti nel citosol. I dati sono riportati come percentuale relativa alla quantità di nucleosomi presenti nel citoplasma del controllo (staurosporina 0,5 µM) presa uguale a 100. I dati riportati sono le medie ± S.D. relative ad un esperimento condotto in doppio rappresentativo di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi. Il trattamento con U0126 era statisticamente significativo[*] $p < 0,05$, Test t di Student].

Inoltre, in modo interessante quando le cellule venivano pre-trattate con PD98059 10 µM o U0126 10 µM, o trasfettate con un plasmide codificante per il dominante negativo di ERK1 (ERK1 K71R), consistentemente in accordo con i dati precedenti, l'effetto protettivo della citochina sull'attività della caspasi-3 era ridotto (figura 49), mentre non veniva alterato dagli inibitori di PI3K, LY294002 (10 µM) e Akti 1/2 (1 µM), o dall'inibitore dell'isoforma β della PI3K, TGX-221 (1 µM) (figura 50). Quest'ultimi risultati rappresentano una prova importante del ruolo fondamentale della via di segnalazione di p42/p44 MAPK nella regolazione dell'azione anti-apoptotica del TGFβ dipendente da SphK1.

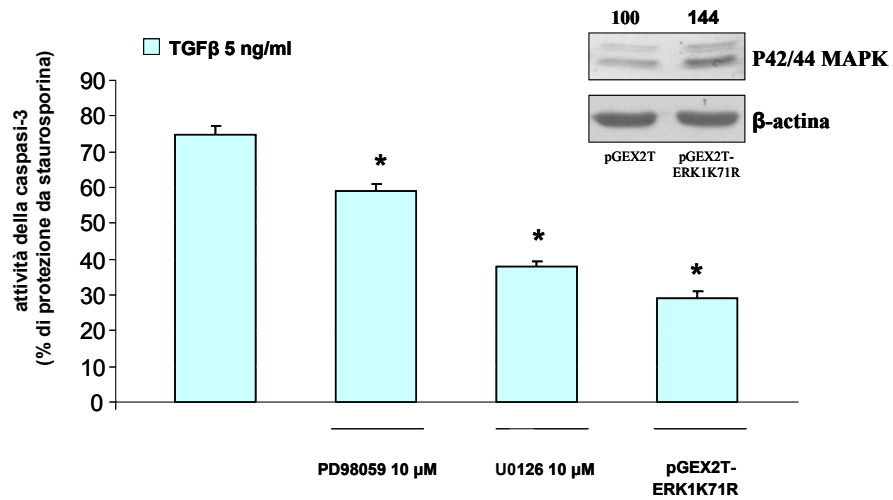


Figura 49 Effetto degli inibitori PD98059 e U0126 e della trasfezione con pGEX2T-ERK1 K71R sull'azione anti-apoptotica del TGFβ 5 ng/ml in mesoangioplasti, valutato mediante dosaggio dell'attività enzimatica della caspasi-3. L'apoptosi veniva indotta dal trattamento con staurosporina 0,5 μM per 4 h. I dati sono riportati come percentuale di protezione da parte del TGFβ 5 ng/ml sull'apoptosi indotta con staurosporina. I dati mostrati sono le medie ± S.E.M. relative a 3 esperimenti indipendenti condotti in doppio con risultati analoghi. Il trattamento con PD98059, U0126 e con pGEX2T-ERK1 K71R era statisticamente significativo [(*)p<0,05, Test t di Student]. Il Blot in alto mostra la superespressione di p42/p44 dei mesoangioplasti D16 trasfettati con pGEX2T-ERK1 K71R. L'intensità delle bande, analizzata mediante analisi densitometrica quantitativa è stata riportata come percentuale relativa all'intensità della banda corrispondente al rispettivo controllo (trasfettato con il vettore vuoto) presa uguale a 100.

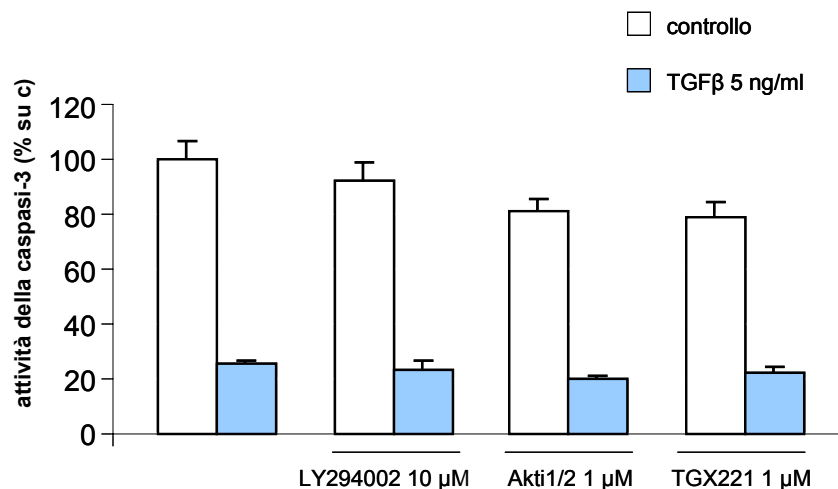


Figura 50 Effetto degli inibitori LY294002 (10 μM), Akti1/2 (1 μM) e TGX-221 (1 μM) sull'azione anti-apoptotica del TGFβ 5 ng/ml in mesoangioplasti, valutato mediante misurazione dell'attività enzimatica della caspasi-3. L'apoptosi veniva indotta dal trattamento con staurosporina 0,5 μM per 4 h. I dati sono riportati come percentuale relativa al controllo presa uguale a 100. I dati mostrati sono le medie ± S.E.M. relative ad almeno 3 esperimenti indipendenti condotti in doppio con risultati analoghi.

-SFINGOSINA 1-FOSFATO È COINVOLTA NELL'EFFETTO PRO-MIOGENICO ESERCITATO DA TNF α IN MIOBLASTI C2C12

Le cellule satelliti, residenti nel muscolo sono cellule staminali, già commissionate, che risultano assai importanti e critiche nel processo di miogenesi durante lo sviluppo così come nel processo di riparazione nel muscolo adulto [288]. Tra i vari segnali extracellulari che agiscono fisiologicamente sulle cellule satelliti, quello esercitato dal TNF α appare uno dei più complessi. Infatti la citochina, ad alte dosi, induce distruzione del muscolo scheletrico mediante attivazione della degradazione delle proteine muscolari [315], mentre a basse dosi è implicata nel rimodellamento e adattamento del muscolo in risposta all'esercizio fisico e al danno da trauma [316,240]. Nel nostro laboratorio abbiamo dimostrato che S1P promuove il differenziamento di mioblasti C2C12 [73], e che l'enzima SphK, che catalizza la sintesi di S1P, è richiesto per il differenziamento miogenico [183]. In letteratura, da vari studi, emerge anche che SphK è coinvolta nella via di segnalazione del TNF α e nella conseguente risposta biologica [317,197,318].

Con queste premesse abbiamo studiato il possibile coinvolgimento dell'asse SphK/S1P nell'effetto pro-miogenico mediato dal TNF α , a basse dosi, in mioblasti C2C12.

Il primo aspetto che è stato valutato riguarda un importante processo caratteristico dei mioblasti, e cioè il loro progressivo differenziamento in cellule multinucleate caratterizzate dalla presenza di numerose fibre, ovvero i miotubi. Tale processo di differenziamento è ottenuto in laboratorio in modo ottimale, sostituendo a mioblasti confluenti, il siero fetale al 10%, presente normalmente nel terreno di crescita, con siero di cavallo al 2%. Tale procedura comporta la progressiva comparsa di un fenotipo maggiormente differenziato, ed il completamento del processo dopo 5-6 giorni. L'espressione di un fenotipo differenziato si accompagna, a livello molecolare, con l'induzione dell'espressione di proteine specifiche del fenotipo muscolare, che possono perciò essere impiegate come marker del processo.

A tale scopo, per valutare l'effetto di TNF α sul differenziamento miogenico veniva presa in esame l'espressione di miogenina, un fattore di trascrizione indotto rapidamente ed in maniera transitoria durante la miogenesi, di MHC (myosin heavy chain), proteina

strutturale del muscolo scheletrico, e di caveolina-3 (cav-3), proteina muscolo-specifica con funzioni strutturali nelle *caveole* e riconosciuta come marker più tardivo della miogenesi. L'espressione di queste proteine era valutata mediante analisi Western in mioblasti confluenti ed incubati in presenza o meno di TNF α 0,2 ng/ml, in assenza di siero.

I risultati presentati in figura 51, dimostrano chiaramente, che il TNF α esercitava un'azione pro-miogenica, poichè aumentava il contenuto di miogenina dopo 24 e 48 h di incubazione, ed i livelli di MHC dopo solo 24 h. Il marker tardivo, cav-3 non era influenzato dal trattamento con la citochina, indicando quindi che TNF α era capace di agire solo in una fase precoce del differenziamento miogenico.

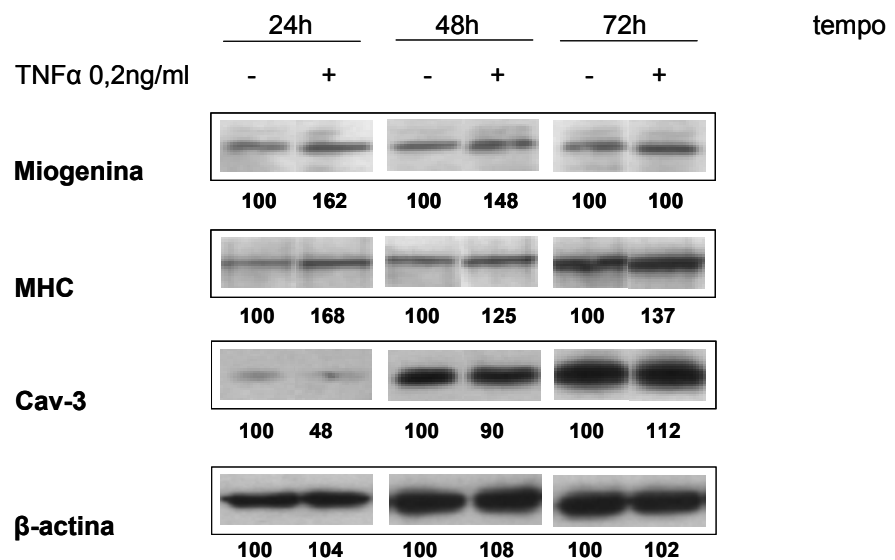


Figura 51 Analisi Western dell'effetto di TNF α a diversi tempi di stimolazione sull'espressione dei marker miogenici: miogenina, MHC e cav-3 in cellule C2C12. L'analisi dell'espressione dell'isoforma β dell'actina (non muscolo specifica) veniva effettuata per verificare l'applicazione di uguali quantità di proteine. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Successivamente veniva valutato l'effetto di diverse concentrazioni della citochina sui livelli di espressione di miogenina nelle stesse condizioni sperimentali. Come si può vedere in figura 52, TNF α 1 ng/ml non influenzava l'espressione del marker miogenico che risultava invece ridotto in maniera drastica dal trattamento con TNF α 20 ng/ml, a conferma del fatto che la citochina, ad alte concentrazioni, esercita un potente effetto catabolico delle proteine muscolari.

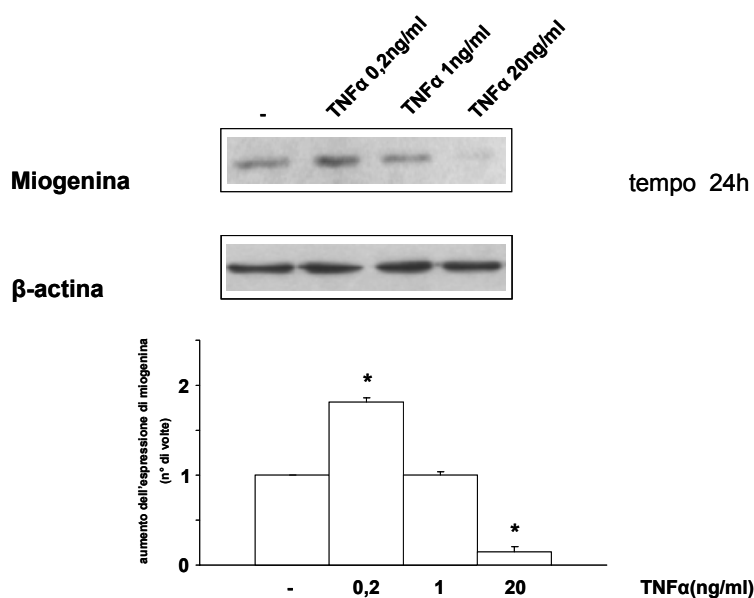


Figura 52 Analisi Western dell'effetto di TNF α a diverse concentrazioni sull'espressione del marker miogenico miogenina in cellule C2C12. Le cellule venivano starvate in BSA 0,1% per 24 h, e i lisati cellulari venivano sottoposti a immunoblotting. L'intensità delle bande è stata analizzata mediante analisi densitometrica quantitativa, normalizzata su quella della β actina, e riportata rispetto alla banda del controllo (-) presa uguale a 1. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. L'effetto di TNF α alle concentrazioni 0,2 ng/ml e 20 ng/ml era statisticamente significativo [(*) $p < 0,001$, Test t di Student].

In relazione alla capacità del TNF α di regolare l'attività della SphK [317,197,318] e all'effetto pro-miogenico di S1P e SphK in mioblasti, [73,183] siamo andati a studiare l'effetto della citochina a basse dosi sull'attività dell'enzima. Cellule confluenti venivano stimulate con TNF α 0,2 ng/ml, dopo aver sostituito il terreno di crescita con DMEM contenente 0,1% di BSA. I dati illustrati in figura 53 mostrano che la citochina era in grado di incrementare rapidamente e in modo transiente l'attività di SphK, infatti il picco dell'incremento si evidenziava già a 10 minuti dalla somministrazione di TNF α 0,2 ng/ml e permaneva anche dopo 20 minuti, trascorsi i quali diminuiva per tornare ai livelli basali.

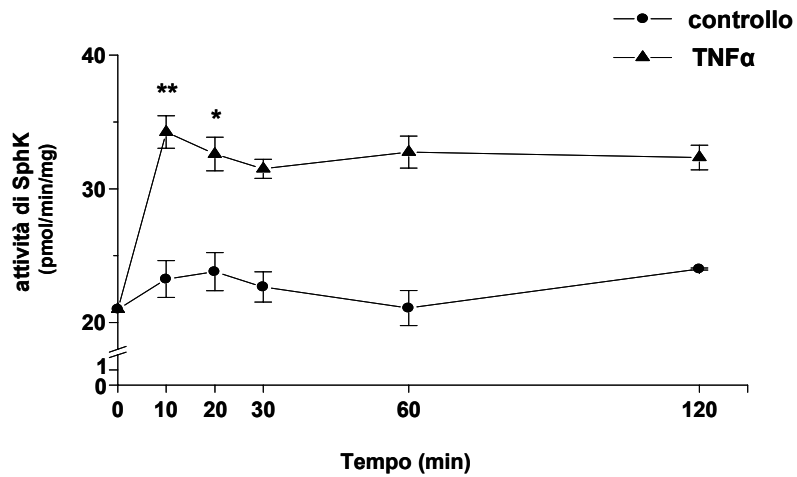


Figura 53 Effetto del TNF α 0,2 ng/ml in C2C12 confluenti, sull'attività della SphK. Cellule opportunamente starvate venivano trattate con TNF α 0,2 ng/ml per i tempi indicati. L'attività della SphK viene riportata come pmol/min/mg. I dati mostrati sono la media \pm S.E.M. di 5 esperimenti indipendenti condotti in duplicato. L'effetto del TNF α 0,2 ng/ml era statisticamente significativo[*] $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$ Test t di Student].

Non solo, ma come si può vedere dalla figura 54, che mostra un'analisi Western dopo frazionamento dei lisati cellulari, il trattamento dei mioblasti con TNF α 0,2 ng/ml era responsabile anche della traslocazione a membrana dell'enzima sia a 10 che a 20 minuti dalla somministrazione della citochina, in corrispondenza quindi, dell'aumento dell'attività di SphK.

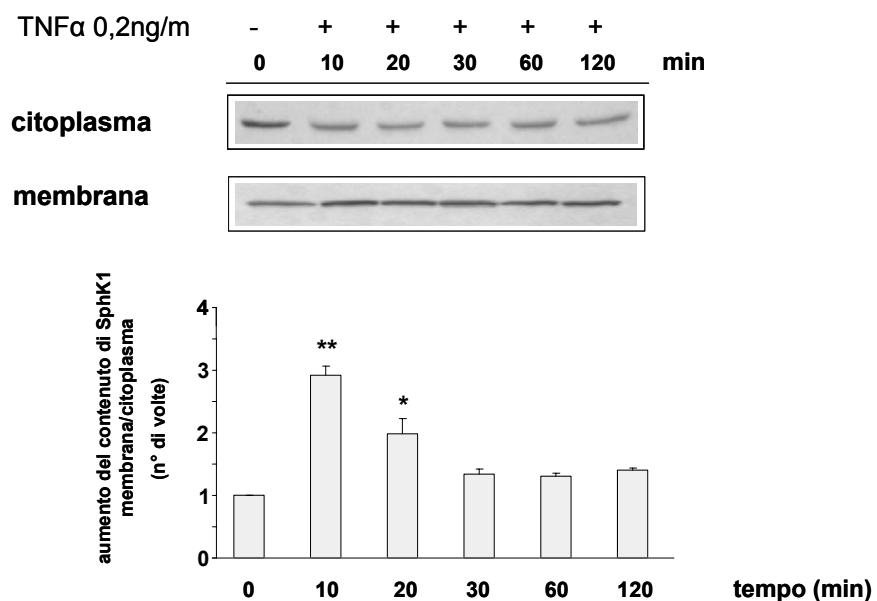


Figura 54 Analisi Western dell'effetto di TNF α 0,2 ng/ml per i tempi indicati, sulla localizzazione di SphK1, in mioblasti C2C12. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. I dati mostrati sono riportati come aumento del contenuto di SphK1, espresso come rapporto membrana/citoplasma. L'aumento del contenuto di SphK1 a livello del plasmalemma era statisticamente significativo[*] $p < 0,05$; (**) $p < 0,001$ Test t di Student].

Successivamente siamo andati ad analizzare il possibile coinvolgimento di SphK nell'effetto pro-miogenico mediato da $TNF\alpha$. A questo scopo mioblasti venivano trasfettati con un plasmide contenente cDNA codificante per SphK1 umana (WTSphK1), o un plasmide contenente cDNA codificante il dominante negativo dell'enzima, DNSphK1, entrambi con il peptide FLAG inserito all'estremità C-terminale. L'espressione della proteina veniva verificata attraverso Western Blotting, mediante l'impiego dell'anticorpo specifico anti-FLAG (figura 55). In accordo con il ruolo pro-differenziante di SphK1 in mioblasti C2C12, [183] la superespressione dell'enzima in cellule trasfettate con WTSphK1, era in grado, di per sé, di aumentare in maniera considerevole i livelli d'espressione della miogenina, non ulteriormente incrementati dal trattamento con $TNF\alpha$. Al contrario in cellule superesprimenti DNSphK1, $TNF\alpha$ 0,2 ng/ml non era in grado di aumentare l'espressione del marker miogenico (figura 55).

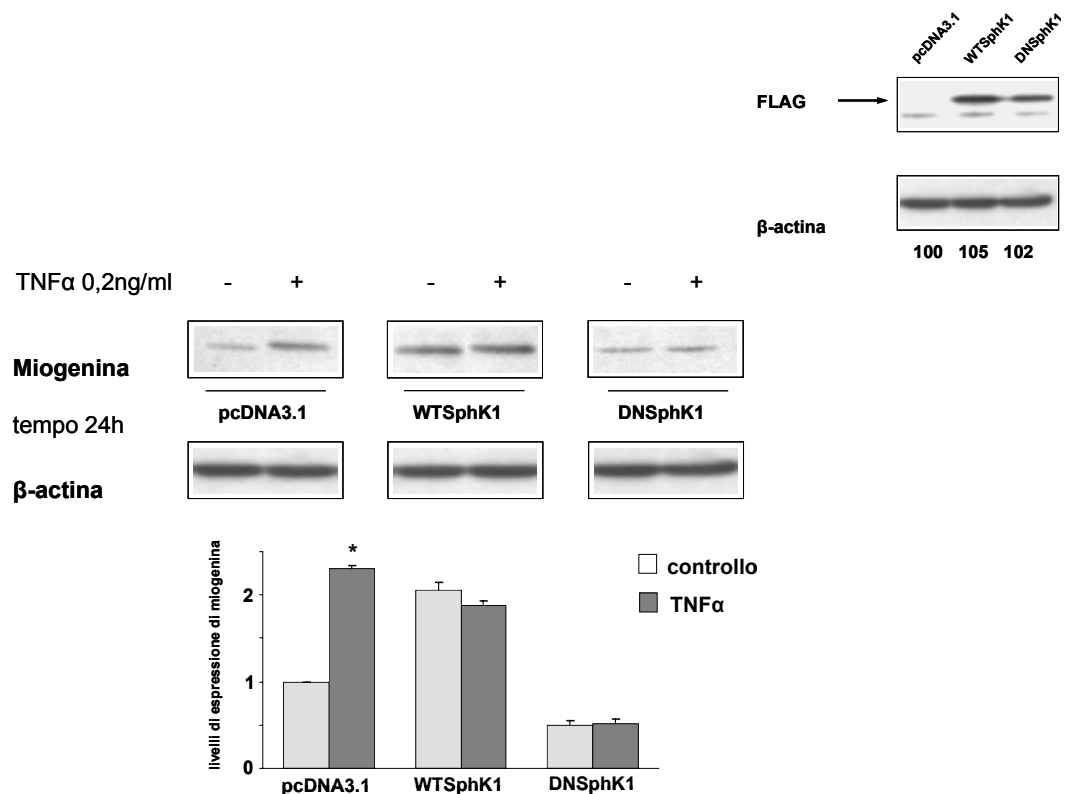


Figura 55 Effetto della trasfezione con pcDNA3.1, pcDNA-WTSphK1 e pcDNA-DNSphK1 in cellule C2C12, sull'azione pro-miogenica di $TNF\alpha$ 0,2 ng/ml, mediante analisi Western Blot. I dati sono le medie \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti, con risultati analoghi. L'effetto del $TNF\alpha$ 0,2 ng/ml era statisticamente significativo[*] $p < 0,001$; Test t di Student]. In alto analisi Western della superespressione di SphK mediante impiego dell'anticorpo anti-FLAG.

In accordo con questi risultati, quando veniva inibita farmacologicamente l'attività di SphK, mediante l'impiego di CII 10 μ M, l'effetto pro-miogenico della citochina veniva completamente bloccato (figura 56).

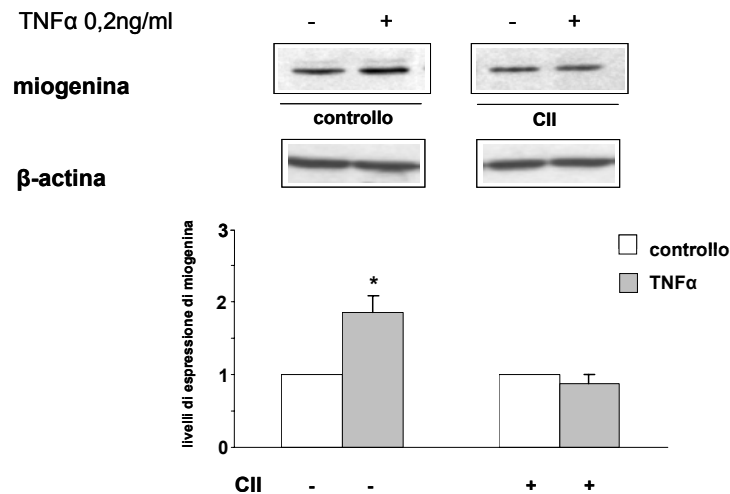


Figura 56 Analisi Western dell'effetto dell'inibitore di SphK, CII 10 μ M, sull'espressione del marker miogenico miogenina, in mioblasti C2C12. Le cellule venivano starvate in BSA 0,1% per 24 h, pre-trattate con CII 30 min prima della somministrazione della citochina. I lisati cellulari (30 μ g) venivano sottoposti ad analisi Western. L'intensità delle bande è stata analizzata mediante analisi densitometrica quantitativa, normalizzata su quella della β actina, e riportata rispetto alla banda dei rispettivi controlli, presa uguale a 1. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti. L'effetto di TNF α 0,2 ng/ml era statisticamente significativo [(*) $p < 0,01$, Test t di Student].

Inoltre, per dimostrare in modo inequivocabile il coinvolgimento di SphK nell'azione mediata dal TNF α , l'espressione di SphK era silenziata mediante l'impiego di siRNA specifico. In queste condizioni sperimentali i livelli di miogenina non venivano aumentati in risposta al trattamento con la citochina, confermando il coinvolgimento della SphK nell'azione pro-miogenica mediata dal TNF α (figura 57).

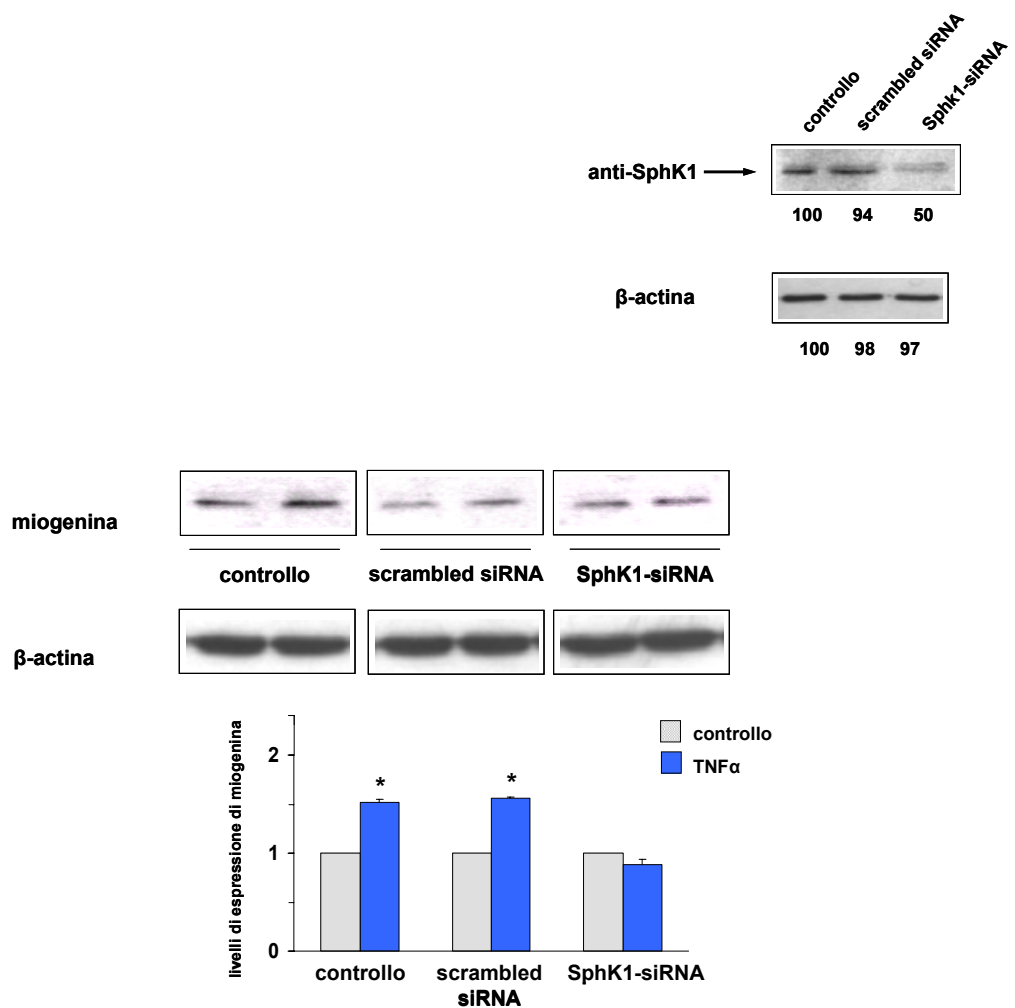


Figura 57 Effetto della trasfezione con siRNA specifico per *SphK1* e di controllo (scrambled) in cellule C2C12, sull'azione pro-miogenica di TNF α 0,2 ng/ml, valutato mediante analisi Western Blot. I dati sono le medie \pm S.E.M. di almeno tre esperimenti indipendenti, con risultati analoghi. L'effetto del TNF α 0,2 ng/ml era statisticamente significativo[*] ($p < 0,001$; Test t di Student]. In alto verifica, mediante analisi Western, dell'avvenuto silenziamento di *SphK1* mediante impiego dell'anticorpo specifico anti-*SphK1*. L'intensità delle bande è stata analizzata mediante analisi densitometrica quantitativa, normalizzata su quella della β actina, e riportata come percentuale relativa a quella del controllo, presa uguale a 100.

Infine, siccome nel nostro laboratorio è stato dimostrato che il recettore S1P₂ risulta fondamentale nell'azione pro-miogenica mediata da S1P [73,183], veniva studiato il suo ruolo nell'effetto pro-differenziante del TNF α impiegando la metodologia del siRNA, che, come risulta dall'analisi Western di frazioni solubili e di membrana da lisati di mioblasti trasfettati, è efficace nel regolare negativamente l'espressione di S1P₂ (figura 58).

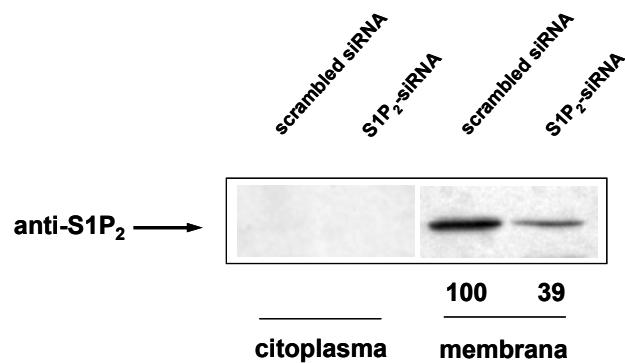


Figura 58 Analisi Western dell'espressione di SIP_2 eseguita nella frazione citosolica e di membrana in cellule C2C12 trasfettate con siRNA non specifico (controllo) e specifico per SIP_2 (SIP_2 -siRNA). L'intensità delle bande, analizzata mediante analisi densitometrica quantitativa, è stata riportata come percentuale relativa all'intensità della banda del controllo (scrambled-siRNA) presa uguale a 100. Il Western Blot mostrato è rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Quando cellule trasfettate con siRNA specifico per SIP_2 venivano valutate per la loro capacità di differenziare in assenza o in presenza della citochina, emergeva l'importanza di SIP_2 nel mediare tale effetto, infatti l'espressione di miogenina a 24 h non veniva incrementata dal trattamento con $TNF\alpha$, in cellule trasfettate con siRNA specifico per SIP_2 (figura 59).

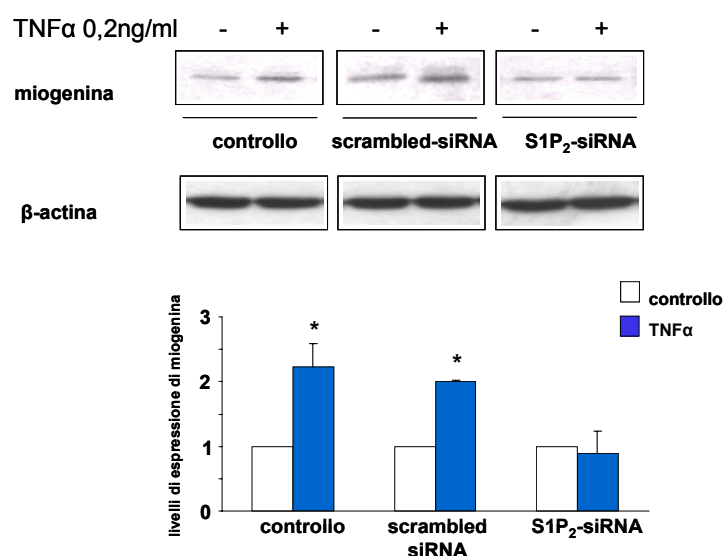


Figura 59 Effetto della trasfezione con siRNA specifico per il recettore SIP_2 e di controllo (scrambled) in cellule C2C12, sull'azione pro-miogenica di $TNF\alpha$ 0,2 ng/ml, valutato mediante analisi Western Blot. I dati sono le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti, con risultati analoghi. L'effetto del $TNF\alpha$ 0,2 ng/ml era statisticamente significativo[*] $p < 0,01$; Test t di Student].

-IN MIOBLASTI C2C12, IL RECETTORE S1P₁ REGOLA NEGATIVAMENTE LA PROLIFERAZIONE INDOTTA DAL FATTORE DI CRESCITA DELLE PIASTRINE (PDGF).

E' ormai chiaro che numerosi fattori di crescita, agendo attraverso i loro recettori tirosin-chinasici richiedono, per esercitare il loro effetto biologico, il coinvolgimento del metabolismo e della segnalazione di S1P [319].

In realtà S1P era stata inizialmente descritta come uno sfingolipide bioattivo, generato intracellularmente in risposta al PDGF, ed implicato nel mediare l'effetto mitogenico del fattore di crescita [320].

Più recentemente è stato trovato che il recettore S1P₁ è coinvolto nella risposta chemiotattica indotta da PDGF, nelle cellule della muscolatura liscia dei vasi così come nelle cellule endoteliali [321]. Benchè sia noto che PDGF è in grado di stimolare la proliferazione in mioblasti C2C12, ben poco si sa riguardo al meccanismo molecolare di tale azione.

Per cercare di comprendere, almeno in parte, tale meccanismo è stato indagato il ruolo del recettore S1P₁ nell'effetto mitogenico del PDGF in mioblasti appartenenti alla linea cellulare C2C12.

Poiché nei mioblasti appartenenti a questa linea cellulare è stato dimostrato che sono presenti i recettori S1P₁, S1P₂ e S1P₃ [322,323,324], è stato preso in esame il loro specifico coinvolgimento nell'azione del fattore di crescita; perciò, il loro ruolo è stato studiato in esperimenti nei quali la loro espressione veniva selettivamente modulata impiegando un approccio metodologico di tipo molecolare.

Quindi per prima cosa è stato esaminato l'effetto del PDGF sulla proliferazione cellulare, valutando l'incorporazione di [³H]timidina nel DNA di mioblasti C2C12 trasfettati con ODN-AS specifici per ciascun S1PR.

Come si può osservare in figura 60 il trattamento con ODN-AS diretto contro S1P₁ aumentava significativamente l'azione mitogenica esercitata dal PDGF 30 ng/ml, mentre gli ODN-AS diretti contro gli altri due recettori non interferivano con l'azione del fattore di crescita.

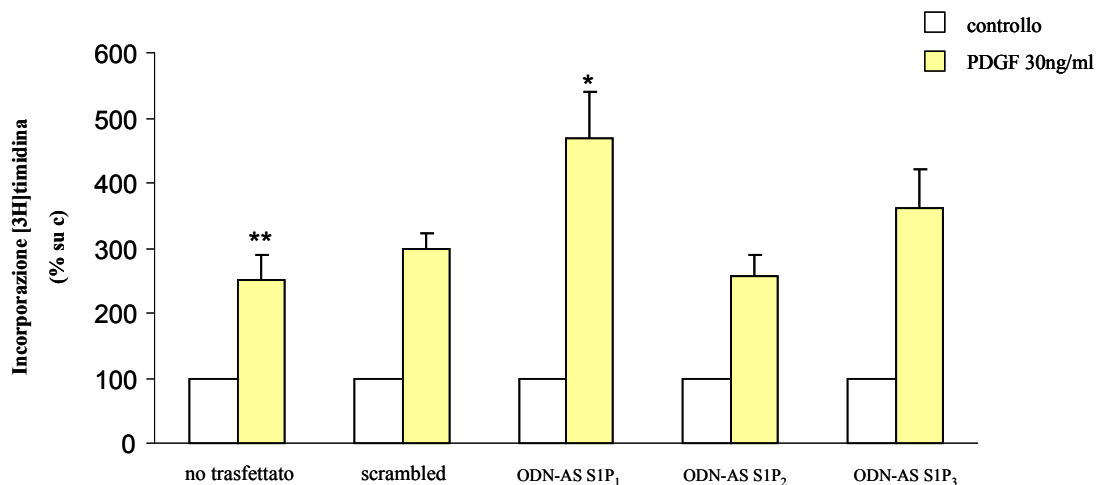


Figura 60 Incorporazione di [3H]timidina in cellule C2C12 trasfettate con ODN-AS specifici per i recettori SIP₁, SIP₂ e SIP₃ e stimulate 16 h con PDGF, opportunamente starvate per 24 h in assenza di siero. I dati sono le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto proliferativo di PDGF era significativamente aumentato dal trattamento con ODN-AS specifici per SIP₁ [(*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$]; Test t di Student].

Il ruolo negativo di SIP₁ nell'azione proliferativa indotta da PDGF è stato quindi verificato impiegando la metodologia del siRNA per silenziare l'espressione genica del recettore.

L'efficacia di questa metodologia, nel ridurre l'espressione del recettore, è stata valutata, preliminarmente, mediante analisi di Real-Time PCR (figura 61).

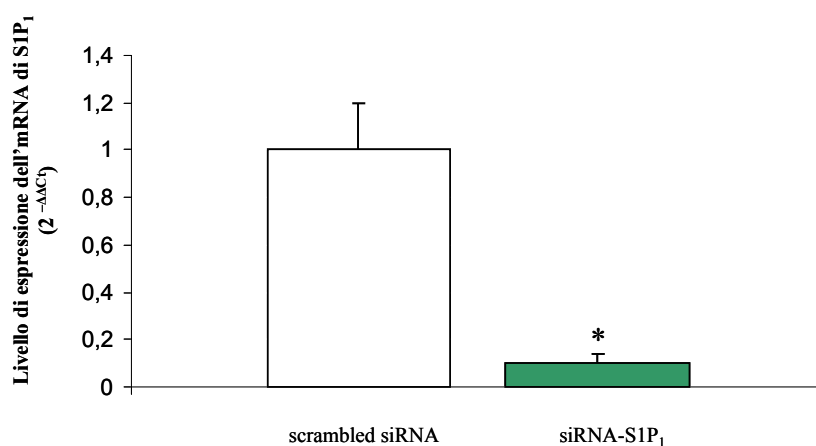


Figura 61 Analisi dell'espressione dei livelli di mRNA per il recettore SIP₁ mediante real time PCR in mioblasti C2C12 trasfettati con siRNA di controllo e specifico per il recettore SIP₁. Il livello di espressione dell'mRNA per il recettore SIP₁ è riportato in grafico mediante il metodo $2^{-\Delta\Delta C_t}$. I valori sono la media \pm S.D. [(*) $p < 0,01$]; Test t di Student] dei triplicati di un esperimento significativo ripetuto tre volte con risultati analoghi.

Come emerge chiaramente dalla figura 62, cellule C2C12 trasfettate con siRNA specifico per S1P₁ mostravano, rispetto alle cellule trasfettate con siRNA di controllo, un significativo aumento d'incorporazione di [³H]timidina in seguito a trattamento con il fattore di crescita, confermando quindi, un coinvolgimento in senso anti-proliferativo del recettore S1P₁ sull'azione mitogenica esercitata dal PDGF.

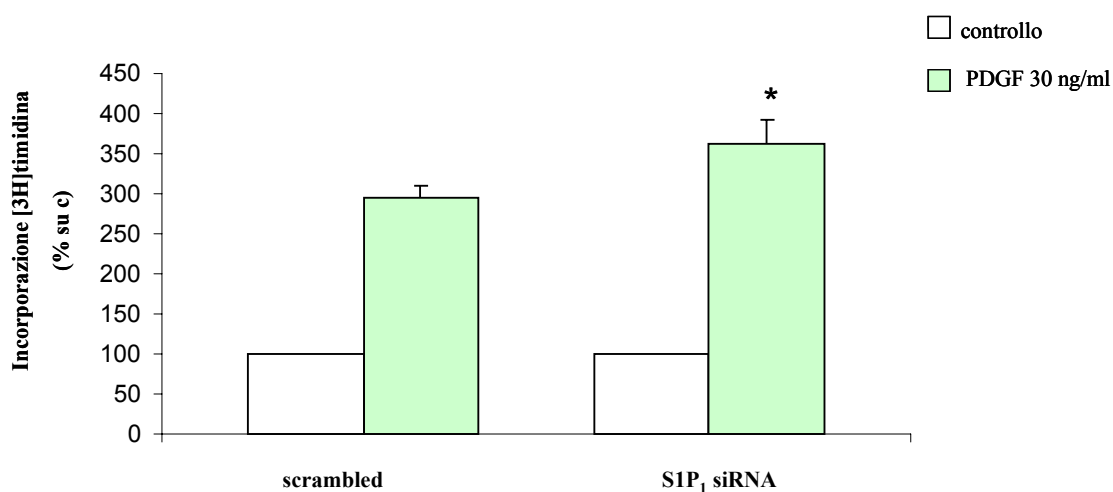


Figura 62 Incorporazione di [³H]timidina in mioblasti C2C12 trasfettati con siRNA di controllo e specifico per S1P₁. I dati sono le medie ± S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto proliferativo di PDGF era significativamente aumentato dal trattamento con siRNA specifico per S1P₁ [(*) p<0,05; Test t di Student].

Successivamente abbiamo impiegato un approccio di tipo farmacologico volto a confermare il coinvolgimento nel ruolo negativo, in senso anti-proliferativo, del recettore S1P₁ sull'effetto mitogenico del PDGF. E' stato usato a questo proposito un antagonista specifico per il recettore S1P₁, W146, in grado di bloccare selettivamente la via di segnalazione a valle di tale recettore. Come mostrato in figura 63 le cellule che erano state pre-trattate con W146, 10 μM e alle quali poi veniva somministrato il fattore di crescita, mostravano una maggiore incorporazione di timidina radioattiva rispetto a quelle trattate con solo PDGF, confermando quindi, l'azione negativa di S1P₁ sulla proliferazione indotta da PDGF in mioblasti murini C2C12.

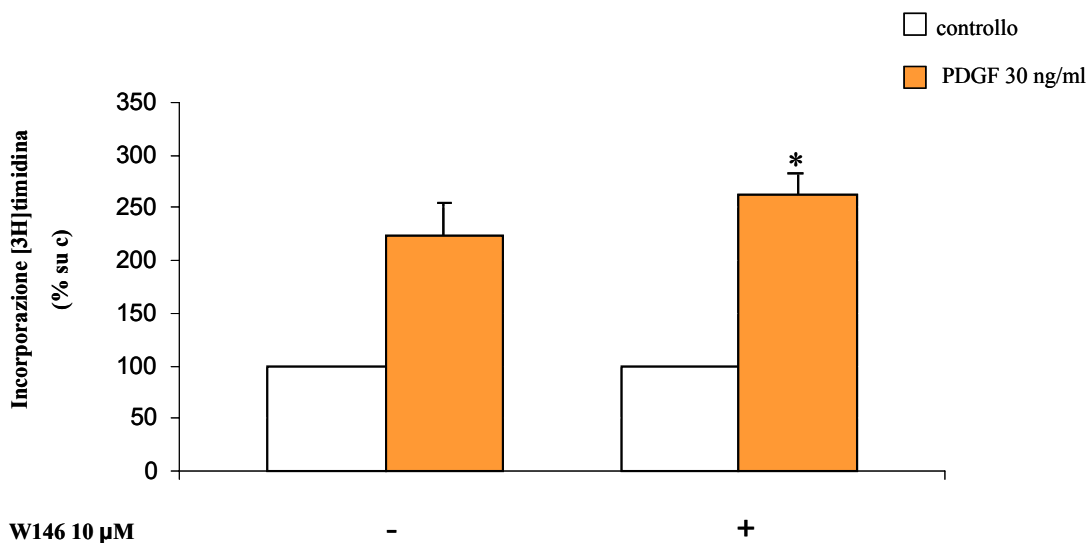


Figura 63 Valutazione della proliferazione attraverso incorporazione di $[^3\text{H}]$ timidina. Cellule C2C12 opportunamente starvate per 24 h, venivano pre-trattate con W146 10 μM e successivamente con PDGF 30 ng/ml. Il risultato è riportato come percentuale relativa a ciascun controllo preso uguale a 100. I dati sono le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto proliferativo di PDGF era significativamente aumentato dal trattamento con W146 [$(*)$ $p < 0,05$; Test t di Student].

Il coinvolgimento di S1P_1 nella regolazione della risposta mitogenica, indotta da PDGF è stato ulteriormente studiato effettuando esperimenti in cellule C2C12 trasfettate stabilmente con un plasmide contenente la sequenza codificante per il suddetto recettore. Preliminarmente, per verificare l'effettiva espressione di S1P_1 veniva eseguita un'analisi Western Blot su lisati di cellule C2C12 trasfettate con pcDNA3.1 e pcDNA-S1P₁ in cui veniva impiegato un anticorpo specifico per il recettore analizzato (figura 64).

Come illustrato in figura 64 nelle cellule superesprimenti il recettore S1P_1 il trattamento con PDGF 30 ng/ml non era in grado di incrementare la sintesi di DNA, ma anzi vi era una notevole e significativa riduzione dell'incorporazione di $[^3\text{H}]$ timidina sottolineando, quindi, ancora una volta, l'effetto anti-proliferativo di S1P_1 sull'azione mitogenica del PDGF.

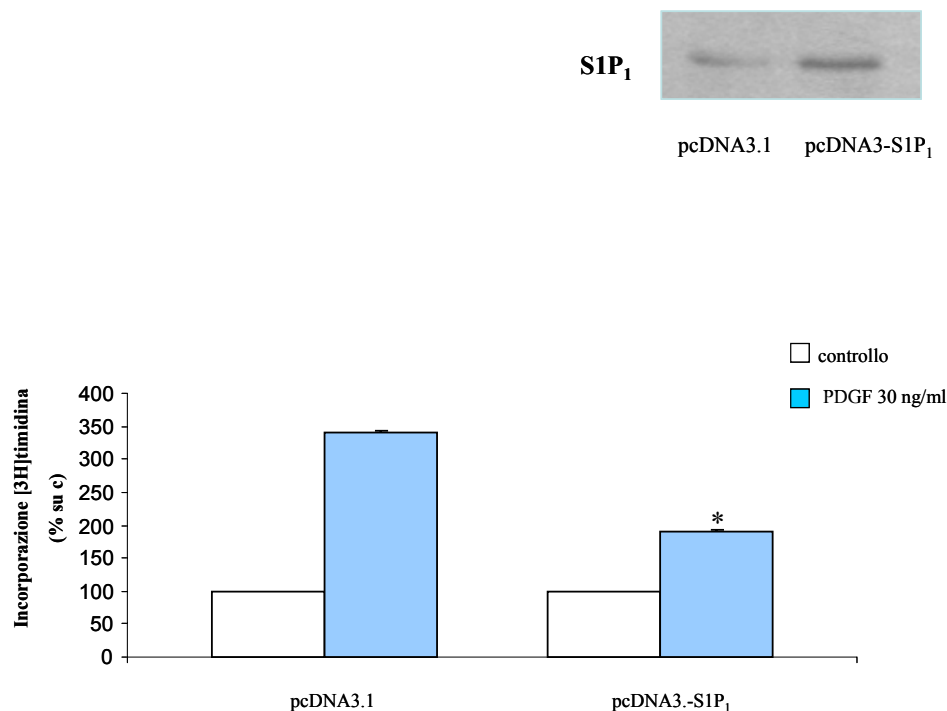


Figura 64 Incorporazione di [3H]timidina in mioblasti C2C12 trasfettati con pcDNA3.1 e pcDNA-SIP₁. I dati sono le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto proliferativo di PDGF era significativamente ridotto nelle cellule trasfettate con pcDNA-SIP₁ [(*) $p < 0,01$; Test *t* di Student]. Nel pannello in alto analisi Western Blot dei livelli del recettore SIP₁ nelle cellule C2C12 trasfettate con il vettore vuoto e con pcDNA-SIP₁, quello riportato è un blot rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

È stato dimostrato che, in alcune circostanze, il crosstalk tra SIP₁ e PDGF coinvolge l'attivazione di SphK con conseguente produzione di S1P. Abbiamo perciò verificato questa possibilità determinando l'attività di tale enzima in seguito a trattamento di mioblasti C2C12, con PDGF 30 ng/ml. La tempo dipendenza dell'attività dell'enzima veniva valutata mediante saggio *in vitro* impiegando [γ^{32} P]-ATP. La figura 65 mostra chiaramente che PDGF 30 ng/ml era in grado di indurre, in queste cellule, una rapida e sostenuta attivazione dell'enzima già dopo 5 minuti dalla stimolazione e che tale incremento si manteneva praticamente costante per almeno 30 minuti.

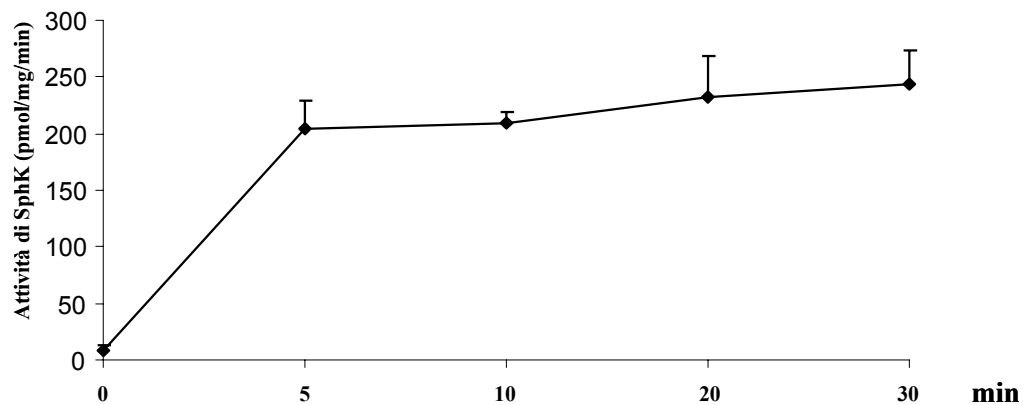


Figura 65 Valutazione dell'attività di SphK mediante saggio in vitro con impiego di $[\gamma^{32}P]$ -ATP. PDGF 30 ng/ml attiva in maniera sostenuta l'enzima SphK già a tempi brevi. I dati riportati sono le medie \pm S.D. dei triplicati di un esperimento significativo ripetuto 3 volte con risultati analoghi.

Per verificare se la stimolazione dell'attività di SphK fosse implicata nella risposta proliferativa indotta da PDGF, successivamente siamo andati a studiare l'effetto di due inibitori dell'enzima sull'azione proliferativa del fattore di crescita. Cellule C2C12 venivano starvate per 24 h e pre-trattate per 30 minuti con CII 1 μ M, un inibitore specifico di SphK o con DMS 2,5 μ M, un inibitore non specifico del suddetto enzima, quindi analizzate per valutare la proliferazione indotta da PDGF 30 ng/ml.

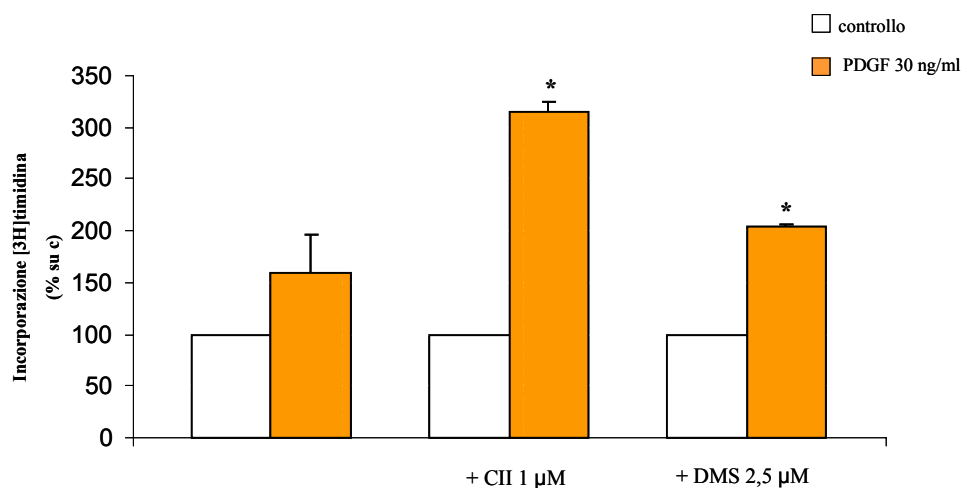


Figura 66 Incorporazione di $[3H]$ timidina in cellule C2C12. Analisi dell'effetto degli inibitori di SphK CII (1 μ M) e DMS (2,5 μ M) sull'azione mitogenica di PDGF 30 ng/ml. Il risultato è riportato come percentuale relativa a ciascun controllo preso uguale a 100. I dati sono le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. L'effetto proliferativo di PDGF era significativamente aumentato dal trattamento con CII, anche l'impiego di DMS incrementava l'azione di PDGF [(*) $p < 0,05$; Test t di Student] .

Come mostrato in figura 66 il trattamento con entrambi gli inibitori aveva un effetto potenziante sull'azione mitogenica del PDGF, a favore di un ruolo dell'asse SphK/S1P nell'azione inibitrice della proliferazione svolta da S1P₁.

I dati finora ottenuti sono a favore dell'ipotesi che in cellule C2C12, il crosstalk tra S1P₁ e il recettore tirosin-chinasico del PDGF si realizzi attraverso la produzione di S1P intracellulare in seguito al legame del PDGF al suo recettore e alla conseguente attivazione di SphK. Lo sfingolipide così prodotto verrebbe esportato nello spazio extracellulare e qui si legherebbe a S1P₁ esercitando così il suo effetto di regolatore negativo sull'azione mitogenica del PDGF.

Abbiamo infine studiato il ruolo della via di ERK1/2 nell'inibizione della risposta proliferativa al PDGF causata da S1P₁. A questo scopo abbiamo impiegato due inibitori di ERK1/2 MAPK, PD98059 e U0126 e siamo andati ad indagare l'effetto che avevano sull'azione del PDGF.

Per mezzo di analisi Western Blot su lisati cellulari, siamo andati a valutare l'effetto degli inibitori U0126 e PD98059 sullo stato di fosforilazione di ERK1/2 MAPK, in contemporanea venivano anche analizzati i livelli totali della proteina. Cellule C2C12 venivano trattate e poi raccolte in un tampone di lisi. Le proteine venivano separate mediante elettroforesi su gel di acrilamide e successivamente, mediante impiego di anticorpi primari specifici per p42/p44 MAPK totale e per la forma fosforilata, rivelate. Come dimostrato in altri tipi cellulari, PDGF, dopo 10 minuti di trattamento, induceva una notevole fosforilazione di ERK1/2 MAPK, e il trattamento con U0126, 5 μ M o con PD98059, 10 μ M riduceva considerevolmente la fosforilazione (figura 67).

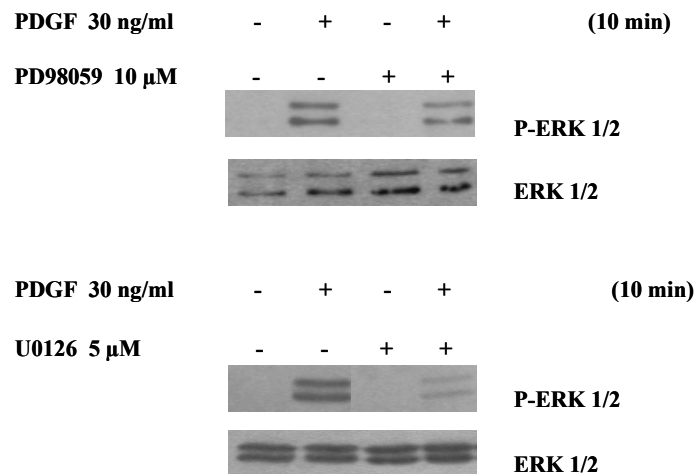


Figura 67 Analisi Western Blot dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 MAPK e della proteina totale su lisati cellulari di C2C12; le cellule venivano pre-trattate con U0126 5 μ M e PD98059 10 μ M per 30 minuti, prima della somministrazione di PDGF 30 ng/ml. Quello riportato è un blot rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

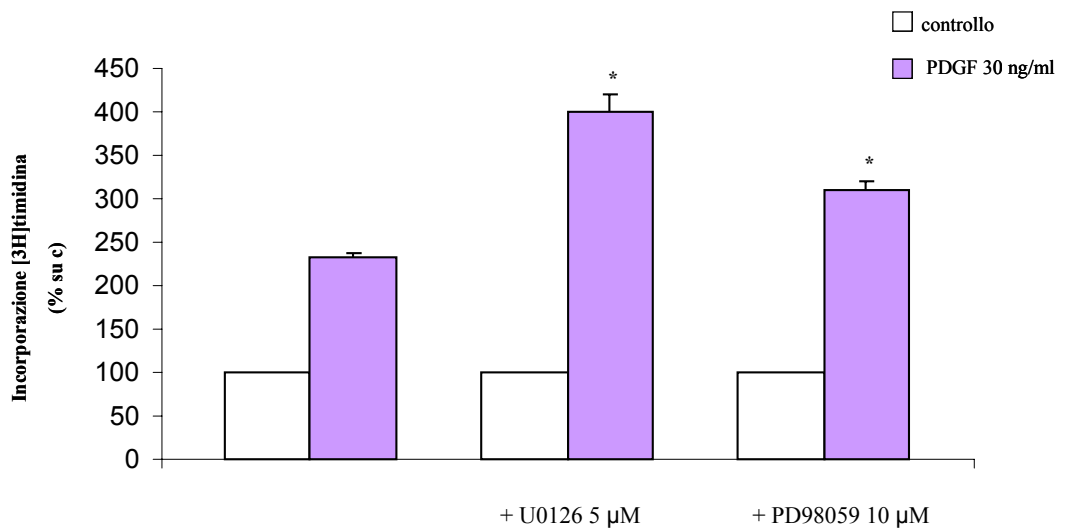


Figura 68 Incorporazione di [3H]timidina in cellule C2C12. Analisi dell'effetto degli inibitori U0126, 5 μ M e PD98059, 10 μ M sull'azione mitogenica del PDGF 30 ng/ml. Entrambi gli inibitori risultavano in grado di incrementare la sintesi di DNA, indotta da PDGF, in mioblasti C2C12. I dati sono le medie \pm S.E.M. di tre esperimenti indipendenti condotti in triplicato. [(*) $p < 0,05$; Test t di Student].

In un modo completamente inaspettato, i due inibitori somministrati prima dalla stimolazione con PDGF, incrementavano l'incorporazione di timidina triziata causata dal fattore di crescita (figura 68).

Successivamente siamo andati a studiare anche l'effetto di W146, 10 μ M sulla fosforilazione di p42/p44 MAPK. Cellule C2C12 venivano starvate per 24 h, pre-trattate 30 minuti con W146 10 μ M e poi trattate con PDGF 30 ng/ml per 10 minuti. I lisati cellulari erano analizzati mediante separazione elettroforetica su gel di acrilamide. L'uso di anticorpi primari contro la forma totale e fosforilata di ERK1/2 MAPK metteva in evidenza che PDGF 30 ng/ml induceva una rapida fosforilazione della chinasi dopo 10 minuti di trattamento, fosforilazione che si riscontrava anche dopo 2 e 8 ore dopo il trattamento con il fattore di crescita, anche se a questi due tempi tale fosforilazione risultava assai minore rispetto ai 10 minuti di trattamento; e che l'antagonista specifico del recettore S1P₁, W146, 10 μ M, che era capace di potenziare la risposta mitogenica (figura 63), riduceva anche la fosforilazione di ERK1/2 indotta da PDGF a 10 minuti, 2 ore e 8 ore (figura 69).

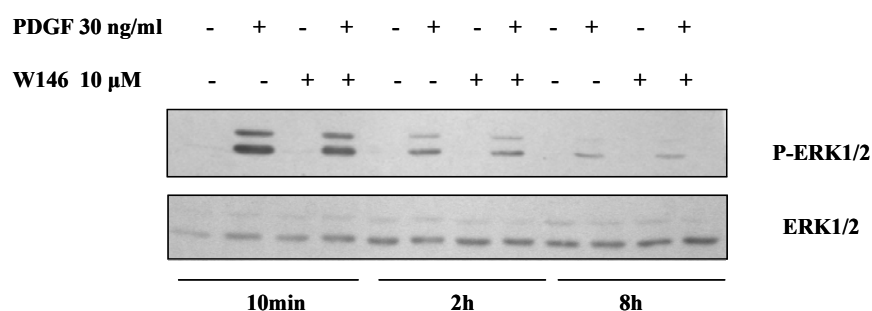


Figura 69 Analisi Western Blot dei livelli di fosforilazione di ERK1/2 MAPK e della proteina totale in lisati di mioblasti C2C12, le cellule venivano pre-trattate con W146 10 μ M per 30 minuti, prima della somministrazione di PDGF 30 ng/ml. Quello riportato è un blot rappresentativo di tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Uno schema riassuntivo di quanto illustrato è mostrato in figura 70.

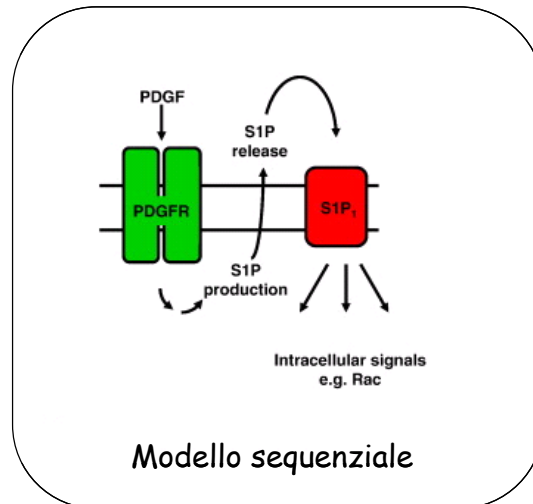


Figura 70 Schema riassuntivo dell'azione anti-proliferativa di S1P₁ sull'effetto mitogenico del PDGF in cellule C2C12.

**-SFINGOSINA 1-FOSFATO MEDIA PROLIFERAZIONE E
SOPRAVVIVENZA DI MESOANGIOBLASTI**

I risultati ottenuti, presentati in questa tesi, costituiscono la prima evidenza sperimentale per un ruolo critico di S1P nella biologia dei mesoangioblasti. I mesoangioblasti, isolati dall'aorta embrionale di mammiferi e uccelli, sono da considerarsi a tutti gli effetti una nuova classe di cellule staminali capaci di dare origine alla maggior parte di tipi cellulari mesodermici, il cui utilizzo nella terapia cellulare di malattie degenerative appare tutt'altro che remoto, conseguentemente al successo ottenuto con la loro iniezione intrarteriosa in un modello di topi [300] e di cani distrofici (GRMD) [304].

In particolare, abbiamo dimostrato che lo sfingolipide è in grado di promuovere la proliferazione di mesoangioblasti e di proteggerli dalla morte cellulare programmata indotta da vari stimoli. L'effetto mitogenico di S1P riportato in questa tesi, è in accordo con un'ampia gamma di studi che sono stati fatti su differenti tipi cellulari, dove il lipide bioattivo è in grado di promuovere la crescita cellulare con un meccanismo che sembra richiedere il legame di S1P ai suoi recettori [325,135,326].

I risultati presentati in questo studio hanno messo in evidenza che i mesoangioblasti esprimono 3 dei suoi 5 recettori, S1P₁, S1P₂ e S1P₃, in accordo con i recenti dati sul pattern di espressione dei recettori per S1P, identificato in cellule staminali embrionali umane [327]. Nonostante il recettore S1P₁ risulti espresso in queste cellule, abbiamo dimostrato che non è coinvolto nella proliferazione, in quanto il trattamento con SEW2871, un agonista specifico per il recettore S1P₁, non era capace di riprodurre l'azione mitogenica esercitata dallo sfingolipide. Questo dato rappresenta un'interessante differenza rispetto a ciò che è stato riscontrato fino ad oggi in altri tipi cellulari, dove il recettore S1P₁ ha un ruolo cardine nella proliferazione cellulare indotta dal lipide bioattivo [325,135,326]. Invece abbiamo osservato un coinvolgimento nella risposta mitogenica, del recettore S1P₂, dato che l'effetto proliferativo di S1P era attenuato da JTE-013, un antagonista specifico per S1P₂. Un modesto effetto inibitorio sulla proliferazione, indotta dal lipide bioattivo, lo si otteneva anche in seguito a trattamento di mesoangioblasti con VPC23019, un antagonista di S1P₁/S1P₃, a favore

quindi, di un coinvolgimento anche del recettore S1P₃ nell'azione mitogenica mediata da S1P, pure se secondario rispetto a quello del recettore S1P₂. L'associazione positiva tra la crescita cellulare e il recettore S1P₂, sino ad oggi è stata riscontrata soltanto in cellule mesangiali [328], un'interessante osservazione che mette in luce la comune nicchia perivascolare delle cellule mesangiali e dei mesoangioblasti [329]; da altri studi, invece lo stesso recettore appare coinvolto nell'effetto anti-proliferativo di S1P [117,73]. Questa osservazione potrebbe avere importanti implicazioni per l'espansione *in vitro* di queste cellule per scopi terapeutici, sebbene agonisti selettivi per S1P₂ non siano stati ancora scoperti. Lo studio della via di segnalazione coinvolta nell'effetto mitogenico di S1P ha evidenziato un ruolo chiave per ERK1/2 MAPK, in accordo con altri studi fatti su queste cellule [135, 330, 331].

In questa tesi è stato inoltre dimostrato che la somministrazione di S1P, in mesoangioblasti, esercita un potente effetto protettivo dalla morte cellulare programmata indotta da privazione di siero, staurosporina e C2-ceramide, valutata sia mediante conteggio del numero di cellule sopravvissute, che mediante determinazione dei frammenti di DNA associati ad istoni nel citoplasma. Lo sfingolipide preveniva completamente la frammentazione del DNA causata dalla deprivazione di siero o dal trattamento con C2-ceramide, mentre il danno alla cromatina indotto da staurosporina, che si è rivelato l'agente pro-apoptotico più potente in queste cellule, veniva apprezzabilmente diminuito dalla somministrazione di S1P. In accordo con tali risultati, l'attivazione della caspasi effettrice del processo apoptotico, la caspasi-3, risultava notevolmente diminuita in presenza di S1P, confermando il potente effetto anti-apoptotico dello sfingolipide nei mesoangioblasti. L'effetto anti-apoptotico di S1P è ulteriormente supportato da esperimenti di conta delle cellule, dove il trattamento con lo sfingolipide risultava capace di neutralizzare la riduzione del numero di cellule in apoptosi, indotta mediante i diversi stimoli, sopra citati.

Infine, abbiamo dimostrato che i mesoangioblasti in coltura trattati con il lipide bioattivo mostravano un incremento della sopravvivenza quando venivano iniettati nel muscolo tibiale anteriore di topi *knockout* per la proteina α -sarcoglicano.

Nel loro complesso, questi risultati dimostrano che S1P svolge un ruolo chiave nella prevenzione della morte cellulare programmata indotta mediante vari stimoli *in vitro*, di mesoangioblasti. Il meccanismo molecolare implicato nell'azione anti-apoptotica dello sfingolipide appare assai complesso e pertanto, per poterlo definire saranno necessari ulteriori studi. Gli esperimenti eseguiti finora, impiegando SEW2871 JTE-013 e

VPC23019, hanno messo in evidenza che S1P₁, ma anche S1P₂ e S1P₃ non hanno un ruolo chiave nell'effetto protettivo del lipide bioattivo, suggerendo che la molecola agisca come messaggero intracellulare [62, 332, 333], visto che lo sfingolipide esogeno potrebbe essere trasportato all'interno della cellula attraverso specifici trasportatori di membrana [334]; comunque, allo stato attuale delle conoscenze non si può escludere che l'effetto protettivo di S1P, in mesoangioblasti, sia dovuto, alternativamente, al legame dello sfingolipide a recettori accoppiati a proteine G, diversi dai S1PR, come già dimostrato in altri tipi cellulari [325, 335].

I mesoangioblasti rappresentano attualmente cellule staminali molto promettenti per l'applicazione nella terapia della distrofia muscolare [300, 304].

Dopo l'iniezione *in vivo* di queste cellule, la riduzione della sopravvivenza è, almeno in parte, responsabile per la loro parziale capacità di ripopolare il tessuto danneggiato, e rappresenta tutt'oggi un ostacolo al loro impiego nella terapia cellulare.

La terapia cellulare della distrofia muscolare, basata sull'utilizzo delle cellule satelliti, cellule staminali del muscolo scheletrico, è fallita essenzialmente per la scarsa sopravvivenza e capacità migratoria di tali cellule insieme alla risposta immunitaria del paziente. Ovviamente, al fine di rendere efficace la terapia, derivante dall'utilizzo di cellule staminali, capaci di attraversare la barriera endoteliale, come i mesoangioblasti, diventa sempre più di maggior importanza approfondire in modo dettagliato la conoscenza della loro biologia, con lo scopo non solo, di poterle espandere *in vitro* senza perdere le caratteristiche di staminalità ed eventualmente trasdurle in modo efficiente con vettori virali, ma anche di facilitare il loro reclutamento, una volta iniettate al tessuto bersaglio, identificando eventualmente molecole in grado di attrarle.

Il presente lavoro dove, per la prima volta, è stata messa in luce, un'azione come potente agente mitogeno e anti-apoptotico di S1P in mesoangioblasti, suggerisce come lo sfingolipide possa rappresentare una molecola in grado di incrementare la loro efficienza nella riparazione del muscolo danneggiato. Nell'ottica di un'applicazione futura nella terapia cellulare è importante sottolineare che gli stessi risultati sono stati ottenuti in mesoangioblasti umani dove S1P si è dimostrata pure in grado di stimolare la proliferazione e di proteggere dall'apoptosi. La somministrazione *in vivo* del lipide bioattivo, o di agonisti per recettori di S1P sembra quindi rappresentare un valido approccio terapeutico in un ampio numero di diverse patologie che vanno dall'insufficienza renale al danno polmonare [336,139], così come nella prevenzione del rigetto nel trapianto d'organo o nel trattamento di patologie autoimmuni [337].

-TGF β PROTEGGE MESOANGIOBLASTI D16 DALL' APOPTOSI MEDIANTE LA REGOLAZIONE DI SPHK-1

La comprensione dei meccanismi molecolari che regolano il processo di sopravvivenza nelle cellule staminali è un requisito fondamentale per poter ottimizzare poi l'impiego delle suddette cellule nell'ambito terapeutico.

I dati illustrati in questa tesi sono la prima dimostrazione dell'efficiente ruolo protettivo del TGF β dalla morte cellulare programmata in mesoangioblasti. Risulta molto interessante il fatto che abbiamo non solo dimostrato un effetto anti-apoptotico della citochina, ma abbiamo anche identificato un ruolo chiave dell'enzima SphK1 nel destino dei mesoangioblasti indotti all'apoptosi, e che la regolazione di suddetto enzima è dipendente dalla via di di ERK1/2.

L'effetto protettivo mostrato dal TGF β nei mesoangioblasti, indotti al processo apoptotico mediante privazione di siero o trattamento con staurosporina, era chiaramente dimostrato negli esperimenti nei quali l'apoptosi è stata valutata monitorando la frammentazione del DNA, l'esposizione della PS sul versante esterno della membrana, o l'attivazione della caspasi-3. Tutti i dati ottenuti indicano che la citochina agisce come un potente agente anti-apoptotico, indipendentemente dalla natura dello stimolo con cui veniva indotto il processo di morte cellulare programmata.

È noto che il TGF β ha un duplice ruolo nella regolazione dell'apoptosi potendo agire sull'attivazione sia della sopravvivenza sia della morte cellulare, a seconda del tipo cellulare e del contesto ambientale [314].

L'effetto di protezione del TGF β dalla morte di mesoangioblasti che è stato identificato, è in linea con i dati disponibili per le cellule mesenchimali di polmone umano [338], per le cellule della muscolatura liscia dei vasi [339] e con l'azione protettiva della citochina contro il danno da ri-perfusione, in seguito ad ischemia in un cuore di ratto isolato e perfuso [340,341]. Al contrario, TGF β incrementava l'apoptosi in cellule progenitrici endoteliali impiegate per la ricostruzione dei tessuti [342].

Oggi è ben noto che la citochina è in grado di indurre queste differenti risposte pur interagendo sempre con lo stesso tipo di recettori, che a loro volta formano complessi con le proteine effettrici Smad, ma da alcuni anni è stato dimostrato che il TGF β può attivare altre vie di segnalazione che possono quindi dare ragione delle particolari risposte evocate a seconda dello specifico fenotipo cellulare [343].

In questo studio, attraverso esperimenti mirati, è stata messa in luce la capacità della citochina di neutralizzare la diminuzione della fosforilazione sia di PKB/Akt che di ERK1/2 provocata dall'induzione dell'apoptosi attraverso differenti stimoli; anche se soltanto ERK1/2 risulta implicata nell'azione protettiva del TGF β dall'apoptosi, visto che quest'azione è efficientemente ridotta da U0126, inibitore della via di ERK1/2, ma non da LY294002, inibitore di PKB/Akt.

Un punto chiave di questo studio è l'aver individuato che SphK1 è implicata nella risposta anti-apoptotica del TGF β . Quest'importante aspetto è stato dimostrato in esperimenti nei quali, inibendo con varie modalità l'attività dell'enzima, è risultata attenuata l'azione anti-apoptotica della citochina.

In accordo con l'effetto anti-apoptotico di SphK1, in precedenza abbiamo dimostrato che S1P stimola la sopravvivenza di mesoangioblasti, con un meccanismo indipendente dal legame con i suoi recettori [344]. SphK è un'enzima chiave nel metabolismo degli sfingolipidi che agisce come modulatore dei livelli relativi di Cer/Sph e S1P. Quest'aspetto è particolarmente rilevante per il ruolo di SphK nel controllo della sopravvivenza cellulare, visto che, non solo genera S1P che protegge dall'apoptosi, ma riduce anche il contenuto intracellulare di Sph/Cer, entrambi capaci di una potente azione pro-apoptotica, oramai ben caratterizzata [345,311].

Stress cellulari come danno al DNA, o alte dosi di TNF α riducono i livelli di SphK1 intracellulare [312,313]; il livello di espressione basale dell'enzima infatti, sembra essere critico nel processo di sopravvivenza cellulare, visto che la regolazione negativa di quest'enzima in cellule della linea MCF-7, attiva la via intrinseca della morte cellulare programmata, proprio a causa dell'aumento nel contenuto cellulare di Cer [124].

Questo è in accordo con ciò che emerge da esperimenti condotti su miociti cardiaci, in cui lo spegnimento del gene *SphK-1* rendeva queste cellule molto più sensibili allo stress causato da ipossia e deprivazione di glucosio, ma la somministrazione di S1P esogena preveniva l'apoptosi indotta da ipossia in questi stessi miociti deficitari di SphK1 [346]. Di conseguenza la presente dimostrazione che SphK1 è regolata negativamente in mesoangioblasti in cui viene indotta l'apoptosi è in accordo con il ruolo chiave di quest'enzima nella sopravvivenza cellulare. Inoltre, in questo studio, abbiamo evidenziato la correlazione tra l'incremento nei livelli di espressione di SphK1, e l'azione protettiva del TGF β , provando in maniera chiara, che SphK1 agisce come uno dei maggiori regolatori nel destino dei mesoangioblasti. I nostri dati sono supportati

anche dalla recente dimostrazione che l'effetto citotossico esercitato dal peptide beta amiloide in cellule di neuroblastoma, implica una regolazione negativa di SphK1 e che l'enzima è responsabile dell'azione citoprotettiva esercitata dall'IGF-I [347].

La sintesi di S1P è catalizzata anche da SphK2, che è stata caratterizzata meno rispetto all' isoforma 1. È noto che quando SphK2 viene superespressa il processo apoptotico è accelerato e la crescita rallentata, a favore quindi di un ruolo opposto rispetto a quello svolto da SphK1 [40]. Tuttavia, mentre topi deficitari di una delle due isoforme si sviluppano normalmente, la concomitante mancanza di entrambi gli enzimi causa morte durante la vita embrionale, suggerendo che SphK1 e SphK2 abbiano funzioni fisiologiche sovrapponibili [41,348]. Abbiamo potuto dimostrare che in mesoangioblasti durante il processo apoptotico c'è una forte riduzione dei livelli di espressione non solo di SphK1, ma anche di SphK2, escludendo così, in questo preciso contesto, un ruolo pro-apoptotico dell'isoforma 2. Comunque, la somministrazione di TGF β , successiva al trattamento con l'agente pro-apoptotico staurosporina, non incrementava l'espressione di SphK2; che inoltre, quando silenziata, non influenzava l'azione anti-apoptotica del TGF β . Quest'isoforma appare, pertanto, indipendente dal meccanismo attraverso il quale la citochina regola il destino di queste cellule staminali.

Alcuni lavori hanno dimostrato che la modulazione del metabolismo degli sfingolipidi fa parte delle vie di trasduzione del segnalazione, responsabili degli specifici effetti biologici indotti dal TGF β . Per esempio la regolazione positiva dell'espressione di SphK1 da parte della citochina, risulta critica nella regolazione trascrizionale dell'inibitore tissutale della metalloproteinasi-1 (TIMP-1, Tissue Inhibitor of Metalloproteinase-1) nei fibroblasti [210], del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) nelle cellule mesangiali di ratto [349], e dell'isoforma muscolo liscio-specifica dell'actina (α -SMA) in fibroblasti polmonari [97] con un ruolo di rimodellamento della matrice extracellulare e di differenziamento a miofibroblasti.

In questo lavoro viene descritto per la prima volta il ruolo fondamentale dell'incremento dei livelli di espressione di SphK1, nel meccanismo molecolare di protezione del TGF β dalla morte cellulare di mesangioblasti. Molto recentemente è stato dimostrato che la regolazione di SphK da parte della citochina, ha un ruolo cruciale nella promozione della migrazione e dell'invasione di cellule tumorali dell'esofago [216]. Risulta quindi molto interessante che in questo studio siano state correlate azione protettiva del TGF β e ruolo dell'enzima SphK, perché questo può rappresentare un ulteriore meccanismo responsabile per la promozione tumorale da parte della citochina [350], suggerendo che

il blocco del crosstalk tra le vie di segnalazione attivate dal TGF β e quelle innescate da S1P, possa rappresentare un approccio valido nella terapia di alcuni tumori.

Abbiamo studiato anche attraverso quale meccanismo la citochina agisse sull'attività di SphK. Per mezzo dell'impiego di specifici inibitori abbiamo individuato che la via di ERK1/2 era implicata nell'attivazione dell'enzima, ad opera di TGF β , sia a tempi brevi che a tempi lunghi. Anche questo dato è in accordo con precedenti studi dove è stato dimostrato che la fosforilazione di SphK da parte di ERK1/2, è critica per la traslocazione dell'enzima a membrana dove, grazie al reclutamento del suo substrato, diventa attivo [351], ed, inoltre in linea con un recente lavoro in cui nel miometrio di ratto, l'inibizione di p42/p44 MAPK riduce l'attività della SphK [352]. Riguardo alla regolazione trascrizionale di SphK1, indotta da TGF β , abbiamo individuato il coinvolgimento della via di PKB/Akt che di quella di ERK1/2, tuttavia, ulteriori studi hanno dimostrato che l'effetto anti-apoptotico del TGF β era neutralizzato solo quando la via di ERK1/2 era inibita. Ciò è in accordo con precedenti lavori, nei quali è stato dimostrato che p42/p44 MAPK si trova a monte della regolazione positiva dell'espressione di SphK1 in cellule leucemiche ed in cellule endoteliali [353]. Da notare che la regolazione trascrizionale di SphK1 risultava essere anche dipendente da PKB/Akt, comunque il fatto che l'inibizione selettiva attraverso LY294002 di tale chinasi non influenzava l'azione anti-apoptotica del TGF β , suggerisce che l'aumento del contenuto proteico di SphK1 non era di per sé sufficiente a spiegare l'effetto esercitato dalla citochina ma, piuttosto, è richiesta la fosforilazione ERK1/2 dipendente dell'enzima per la sua attivazione e per la conseguente azione anti-apoptotica. In conclusione, ERK1/2 appare essere a monte della regolazione di SphK1, da parte della citochina, a più livelli.

Nella figura 71 è presentato uno possibile schema del meccanismo con il quale TGF β esplica il suo effetto anti-apoptotico in mesoangioblasti D16 murini.

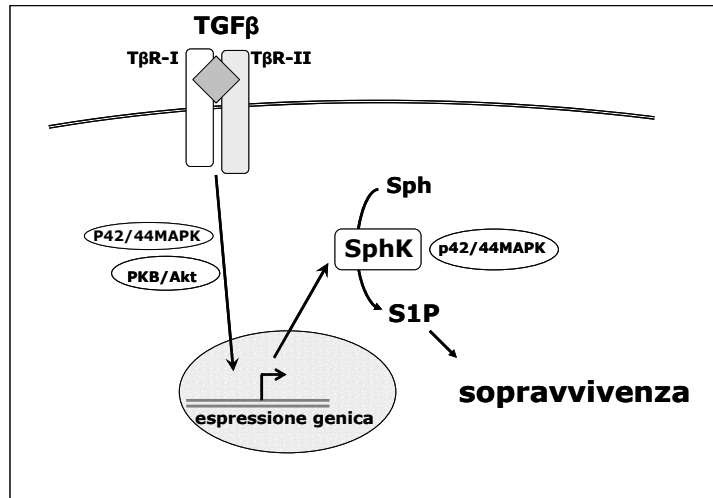


Figura 71 Possibile schema del ruolo anti-apoptotico di TGFβ in mesoangioplasti D16

Un importante aspetto che non abbiamo studiato riguarda l'identificazione del meccanismo molecolare attraverso il quale il TGFβ porta alla fosforilazione di ERK1/2, che successivamente si traduce in un aumento dell'espressione di SphK1. Altri lavori hanno evidenziato un ruolo cruciale nella transattivazione dell'EGFR da parte della citochina, in un modo che esula dalla canonica via di segnalazione del TGFβ. In particolare, la transattivazione dell'EGFR da parte della citochina è stata individuata a monte della fosforilazione di p42/44 MAPK [354]. Un'altra interessante ipotesi, supportata da un lavoro veramente recente [216], è che l'attivazione di SphK per tempi brevi, possa essere a monte della fosforilazione di ERK1/2 MAPK, responsabile della regolazione trascrizionale dell'enzima. Tuttavia, abbiamo dimostrato in precedenza che l'azione anti-apoptotica di S1P in queste cellule è indipendente dall'attivazione della via di p42/44 MAPK [344] portando ad escludere questa possibilità. Comunque, poiché il meccanismo molecolare di azione di S1P generata intracellularmente, può essere distinto da quello dello sfingolipide aggiunto nel mezzo esterno [355], questa ipotesi sarà verificata in studi futuri.

In questo lavoro abbiamo messo in luce il potente effetto anti-apoptotico del TGFβ in mesoangioplasti e che tale effetto biologico richiede il coinvolgimento dell'asse SphK/S1P. I presenti risultati gettano una nuova luce sul ruolo biologico esercitato dalla citochina in queste cellule progenitrici e, molto probabilmente ciò può essere esteso anche ad altre cellule multipotenti o totipotenti, responsabili della riparazione dei tessuti

e del processo di rigenerazione. Poichè il meccanismo molecolare alla base dell'azione protettiva del TGF β implica la regolazione del metabolismo di S1P, è concepibile pensare che questi effetti possano, in futuro, essere sfruttati in strategie volte a migliorare l'efficacia di terapie che propongono l'impiego di mesoangioblasti.

-SFINGOSINA 1-FOSFATO È COINVOLTA NELL'EFFETTO PRO-MIOGENICO ESERCITATO DA TNF α IN MIOBLASTI C2C12

La via di segnalazione che inizia attraverso l'attivazione di SphK, con conseguente formazione di S1P e suo legame al recettore S1P₂, appare essere critica per quanto riguarda il processo di differenziamento dei mioblasti C2C12 [73,183]. Qui, in questa tesi è stato dimostrato, per la prima volta, che l'asse SphK/S1P₂ è richiesta per mediare l'azione pro-miogenica del TNF α , una citochina fisiologicamente coinvolta nella regolazione del processo di differenziamento del muscolo scheletrico. In accordo con il precedente lavoro di Li et al. [240], abbiamo dimostrato che TNF α è in grado di aumentare il differenziamento, in uno stadio precoce, di mioblasti C2C12, essendosi mostrato capace di incrementare l'espressione di markers miogenici precoci come miogenina e MHC, durante le prime 48 h di incubazione. Contrariamente, la citochina si è dimostrata incapace di modificare il contenuto cellulare di cav-3, indicando che gli eventi tardivi del differenziamento miogenico sono regolati in maniera indipendente dal TNF α . Al contrario, mioblasti trattati con un'elevata concentrazione della citochina, mostravano una risposta anti-miogenica, confermando che il TNF α svolge un duplice ruolo in cellule del muscolo scheletrico [315,240].

Abbiamo dimostrato che la citochina, a basse dosi, provocava una rapida e transiente attivazione di Sphk associata ad una rilocalizzazione dell'enzima a membrana, la quale risultava importante per l'effetto pro-miogenico del TNF α . Infatti, quando la funzionalità dell'enzima veniva alterata mediante diversi approcci, l'aumento dell'espressione della miogenina indotta dal TNF α , era notevolmente ridotto o annullato. All'opposto la citochina non era in grado di aumentare ulteriormente i livelli del marker miogenico in cellule superesprimenti SphK1. Questo era probabilmente dovuto all'attività enzimatica elevata che queste cellule presentano [183], la quale non poteva essere perciò, ulteriormente incrementata dalla citochina.

Fino ad oggi è stato dimostrato che l'aumento dell'attività della SphK indotto dal TNF α ha un ruolo critico per la sua azione anti-apoptotica [356] e mitogenica [357], così come per la risposta infiammatoria [197,318]. Nel presente studio abbiamo dimostrato che la

segnalazione attraverso SphK1 attivata dalla citochina, è implicata anche nella regolazione del processo di differenziamento del muscolo scheletrico.

E' stato ormai ben dimostrato che l'attivazione di SphK è coinvolta nella risposta biologica indotta dal TNF α in vari tipi cellulari, anche se i primi studi in questo ambito si sono focalizzati soprattutto sull'azione di S1P come mediatore intracellulare [317,356].

Per questo motivo l'eventuale accoppiamento tra TNF α e l'attivazione della SphK indotta dalla citochina attraverso i recettori di S1P, non è stato attentamente studiato. Inoltre, molto recentemente, è stato dimostrato che il TNF α stimola la proliferazione in cellule di astrocitoma mediante attivazione di SphK ma, non attraverso il coinvolgimento dei recettori di S1P [357], rafforzando l'idea che lo sfingolipide, generato in risposta al TNF α , possa effettivamente regolare eventi biologici agendo come secondo messaggero. Al contrario, in questo studio è stato dimostrato che l'induzione della miogenesi da parte del TNF α era abolita quando il recettore S1P₂ veniva silenziato, in accordo con l'ipotesi che S1P generata intracellularmente venga rilasciata nell'ambiente extracellulare attivando la risposta miogenica attraverso il legame con S1P₂. Da notare che, relativamente al meccanismo molecolare, questi risultati sono in accordo con quelli ottenuti in cellule endoteliali, dove è stato dimostrato che l'attivazione diretta di SphK da parte del TNF α avviene attraverso il coinvolgimento dei recettori S1P₁ e S1P₃ e porta all'attivazione della monossido di azoto sintasi [318].

In questa tesi riportiamo l'identificazione dell'asse SphK/S1P₂ nell'effetto pro-miogenico del TNF α che potrebbe risultare molto importante dal punto di vista fisiologico: è stato infatti riportato che il TNF α , che agisce con modalità autocrina nel muscolo scheletrico, è coinvolto nell'attivazione di p38 MAPK, il maggiore regolatore della miogenesi [358]. Poichè è stato dimostrato che SphK è richiesta per la miogenesi [183], e che S1P esogena agisce esercitando un'azione pro-miogenica attraverso il suo legame con S1P₂ e attivazione di p38 MAPK [73], è probabile che l'asse SphK/S1P₂ giochi un ruolo nell'induzione della p38 MAPK da parte del TNF α . Quest'ipotesi è anche supportata dall'osservazione che nelle cellule endoteliali l'attivazione di p38 MAPK, da parte del TNF α , dipende da SphK [359].

Nel suo insieme questo studio aggiunge nuove informazioni sul meccanismo molecolare implicato nella regolazione del differenziamento del muscolo scheletrico ed inoltre dimostra che la via di segnalazione che vede il coinvolgimento dell'asse SphK/S1P

costituisce un punto chiave in questo complicato processo che è il differenziamento muscolare.

-IN MIOBLASTI C2C12, IL RECETTORE S1P₁ REGOLA NEGATIVAMENTE LA PROLIFERAZIONE INDOTTA DAL FATTORE DI CRESCITA DELLE PIASTRINE (PDGF).

Come già detto nella sezione “Introduzione” ci sono evidenze sempre maggiori sulla capacità di agonisti di recettori accoppiati a proteine G di attivare i recettori tirosin-chinasici in assenza dei loro ligandi. Questo fenomeno di transattivazione è un importante processo che contribuisce alla risposta biologica di ligandi i cui recettori sono associati a proteine G inoltre, è stato dimostrato che questo fenomeno è bidirezionale, ossia i ligandi per RTK sono anch’essi in grado di transattivare i GPCR.

Nel caso del PDGF sono stati proposti due modelli, uno denominato da Hobson J. et al. “sequenziale”, che implica la sintesi di S1P, dipendente dal fattore di crescita, e l’altro detto “integrale” di Alderton et al., in cui è prevista un’associazione stretta tra i due recettori, ossia la formazione di una piattaforma funzionale tra il recettore del PDGF e, nel caso specifico S1P₁, dove, quest’ultimo recettore risulta costitutivamente attivo [321].

E’ noto da tempo l’effetto mitogenico del PDGF su mioblasti murini, appartenenti alla linea C2C12, ma poco si sa sul meccanismo d’azione di tale effetto. A questo proposito, in questa tesi, abbiamo dimostrato che nell’effetto mitogenico del PDGF il recettore S1P₁ svolge un ruolo di regolatore negativo. A questo proposito, infatti, l’inibizione dell’espressione di S1P₁ mediante ODN-AS, o siRNA, o l’inibizione farmacologica con antagonista specifico, hanno un effetto potenziante della risposta mitogenica del PDGF, mentre la superespressione di S1P₁ riduce l’azione del fattore di crescita.

Per quanto riguarda il meccanismo di crosstalk tra il recettore del PDGF e S1P₁, abbiamo dimostrato l’attivazione rapida di SphK da parte del PDGF, e un ruolo negativo di SphK nell’azione mitogenica del PDGF, essendo questa potenziata quando l’enzima viene inibito.

I dati ottenuti sono perciò a favore dell’esistenza di un crosstalk di tipo sequenziale, dove il PDGF, una volta legato al proprio recettore, attiva SphK e questo porta alla produzione di S1P intracellulare che, esportata nell’ambiente extracellulare può agire

via S1P₁. Relativamente alla via di trasduzione responsabile del controllo mediato da S1P₁ sulla proliferazione è emerso un ruolo critico e inaspettato per ERK1/2. In cellule della muscolatura liscia delle vie aeree è stata dimostrata l'esistenza di una piattaforma funzionale tra i due recettori, PDGFR-S1P₁ [82] e una volta che PDGF si lega al proprio recettore, ERK1/2 viene fosforilato e rimane associato alla piattaforma in posizione prossima alla membrana, impedendo la sua localizzazione nucleare. Rimane da verificare la localizzazione subcellulare del pool di ERK1/2 coinvolto nell'inibizione della risposta proliferativa al PDGF.

In conclusione, anche se l'esatto meccanismo molecolare non è stato chiarito, qui è stato dimostrato, per la prima volta un ruolo anti-proliferativo di S1P₁ nell'azione mitogenica indotta da PDGF in mioblasti murini, attraverso un coinvolgimento dell'asse SphK/S1P.

- [1] Wymann, M.P. and Schneider, R. (2008) *Nature* **9**:162-176
- [2] Holthuis, J.C., Pomorski, T., Raggars, R.J., Sprong, H. and Van Meer, G. (2001) *Physiol. Rev.* **81**:1689-1723
- [3] Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A. and Hannun, Y.A. (1993) *Science* **259**:1769-1771
- [4] Venable, M.E., Lee, J.Y., Smith, M.J., Bielawska, A. and Obeid, L.M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:30701-30708
- [5] Smith, E.R., Merrill, A.H., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (2000) *Methods Enzymol.* **312**:361-373
- [6] Pettus, B.J., Bielawska, A., Spiegel, S., Roddy, P., Hannun, Y.A. and Chalfant, C.E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**:38206-38213
- [7] Pettus, B.J., Bielawska, A., Subramanian, P., Wijesinghe, D.S., Maceyka, M., Leslie, C.C., Evans, J.H., Freiberg, J., Roddy, P., Hannun, Y.A. et al. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:11320-11326
- [8] Gómez-Muñoz, A., Kong, Y., Salh, B. and Steinbrecher, U.P. (2004) *J. Lipid Res.* **45**:99-105
- [9] Gómez-Muñoz, A., Kong, J.Y., Parhar, K., Wang, S.W., Gangoiti, P., Gonzalez, M., Eivemark, S., Salh, B., Duronio, V. and Steinbrecher, U.P. (2005) *FEBS Lett.* **579**:3744-3750
- [10] Mitra, P., Maceyka, M., Payne, S.G., Lamour, N., Milstien, S., Chalfant, C.E. and Spiegel, S. (2007) *FEBS Lett.* **581**:735-740
- [11] Gangoiti, P., Granado, M.H., Wang, S.W., Kong, J.Y., Steinbrecher, U.P. and Gómez-Muñoz, A. (2008) *Cell Signal.* **20**:726-736
- [12] Gouaze-Andersson, V. and Cabot, M.C. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:2096-2103
- [13] Spiegel, S. and Merrill, A.H. Jr. (1996) *FASEB J.* **10**:1388-1397
- [14] Pyne, S. and Pyne, N.J. (2000) *Biochem. J.* **349**:385-402
- [15] Olivera, A. and Spiegel, S. (2001) *Prostaglandins* **64**:123-124
- [16] Hannun, Y.A. (1996) *Science* **274**:1855-1859
- [17] Mathias, S., Pena, L.A. and Kolesnick, R.N. (1998) *Biochem. J.* **335**:465-480
- [18] Perry, D.K. and Hannun, Y.A. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1436**:233-234
- [19] Bajjalieh, S.M., Martin, T.F. and Floor, E. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**:14354-14360
- [20] Kolesnick, R.N. and Hemer, M.R. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:18803-18808
- [21] Zeller, C.B. and Marchase, R.B. (1992) *Am. J. Physiol.* **262**:1341-1355
- [22] Hakomori, S. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:18713-18716
- [23] Futerman, A.H., Stieger, B., Hubbard, A.L. and Pagano, R.E. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**:8650-8657
- [24] Jeckel, D., Karrenbauer, A., Birk, R., Schmidt, R.R. and Wieland, F. (1990) *FEBS Lett.* **261**:155-157
- [25] Pagano, R.E. (1988) *Trends Biochem. Sci.* **13**:202-205
- [26] Levade, T. and Jaffrezou, J.-P. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1438**:1-17
- [27] Tettamanti, G., Bassi, R., Viani, P. and Riboni, L. (2003) *Biochimie* **85**:423-437
- [28] Pyne, S. and Pyne, N.J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1582**:121-131
- [29] Aoki, S., Yatomi, Y., Ohta, M., Osada, M., Kazama, F., Satoh, K., Nakahara, K. and Ozaki, Y. (2005) *J. Biochem.* **138**:47-55

- [30] Murata, N., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Yanagita, M., Kuwabara, A., Ui, M. and Okajima, F. (2000) *J. Biochem.* **352**:809-815
- [31] Yatomi, Y., Ozaki, Y., Ohmori, T. and Igarashi, Y. (2001) *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **64**:107-122
- [32] Yang, L., Yatomi, Y., Miura, Y., Satoh, K. and Ozaki, Y. (1999) *Br. J. Haematol.* **107**:282-293
- [33] Hanel, P. et al. (2007) *FASEB J.* **21**:1202-1209
- [34] Le Stunff, H.L., Milstien, S. and Spiegel, S. (2004) *J. Cell. Biochem.* **92**:882-899
- [35] Liu, H., Chakravarty, D., Maceyka, M., Milstien, S. and Spiegel, S. (2002) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **71**:493-511
- [36] Wattenberg, B.W., Pitson, S.M. and Raben, D.M. (2006) *J. Lipid Res.* **47**:1128-1139
- [37] Olivera, A., Kohama, T., Edsall, L., Nava, V., Cuvillier, O., Poulton, S. and Spiegel, S. (1999) *J. Cell. Biol.* **147**:545-558
- [38] Xia, P., Gamble, J.R., Wang, L., Pitson, S.M., Moretti, P.A., Wattenberg, B.W., D'Andrea, R.J. and Vadas, M.A. (2000) *Curr. Biol.* **10**:1527-1530
- [39] Igarashi, N., Okada, T., Hayashi, S., Fujita, T., Jahangeer, S. and Nakamura, S.I. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**:46832-46839
- [40] Liu, H., Toman, R.E., Goparaju, S., Maceyka, M., Nava, V.E., Sankala, H., Payne, S.G., Bektas, M., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S. and Spiegel, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**:40330-40336
- [41] Maceyka, M., Sankala, H., Hait, N.C., Le Stunff, H., Liu, H., Toman, R., Collier, C., Zhang, M., Satin, L., Merrill Jr., A.H., Milstien, S. and Spiegel, S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**:37118-37129
- [42] Pitson, S.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Lynn, H.E., Xia, P., Vadas, M.A. and Wattenberg, B.W. (2003) *EMBO J.* **22**:5491-500.
- [43] Pitson, S.M., Xia, P., Leclercq, T.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Lynn, H.E., Wattenberg, B.W. and Vadas, M.A. (2005) *J. Exp. Med.* **201**:49-54
- [44] Maceyka, M., Payne, S.G., Milstien, S. and Spiegel, S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1585**:193-201
- [45] Spiegel, S. and Milstien, S. (2003) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **4**:397-407
- [46] Alvarez, S.E., Milstien, S. and Spiegel, S. (2007) *Trends Endocrinol. Metab.* **18**:300-7
- [47] Olivera, A., Rosenthal, J. and Spiegel, S. (1996) *J. Cell. Biochem.* **60**:529-537
- [48] Granata, R., Trovato, L., Garbarino, G., Taliano, M., Ponti, R., Sala, G., Ghidoni, R. and Ghigo, E. (2004) *FASEB J.* **18**:1456-1458
- [49] Delon, C., Manifava, M., Wood, E., Thompson, D., Krugmann, S., Pyne, S. and Ktistakis, N.T. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:44763-44774
- [50] Young, K.W., Willets, J.M., Parkinson, M.J., Bartlett, P., Spiegel, S., Nahorski, S.R. and Challiss, R.A.J. (2003) *Cell. Calcium.* **33**:119-128
- [51] Stahelin, R.V., Hwang, J.H., Kim, J.H., Park, Z.Y., Johnson, K.R., Obeid, L.M. and Cho, W. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**:43030-43038
- [52] Fukuda, Y., Aoyama, Y., Wada, A. and Igarashi, Y. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1636**:12-21
- [53] Ancellin, N., Colmont, C., Su, J., Li, Q., Mittereder, N., Chac, S.S., Stefansson, S., Liao, G. and Hla, T. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:6667-6675
- [54] Hait, N.C., Sarkar, S., Le Stunff, H., Mikami, A., Maceyka, M., Milstien, S. and Spiegel, S. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**:29462-9
- [55] Ding, G., Sonoda, H., Yu, H., Kajimoto, T., Goparaju, S.K., Jahangeer, S., Okada, T. and Nakamura S. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**:27493-502

- [56] Lee, M.J., Van Brocklyn, J.R., Thangada, S., Liu, C.H., Hand, A.R., Menzeleev, R., Spiegel, S. and Hla, T. (1998) *Science* **279**:1552-1555
- [57] Mitra, P. et al. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**:16394-16399
- [58] Romiti, E., Meacci, E., Tani, M., Nuti, F., Farnararo, M., Ito, M. and Bruni, P. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commu.* **275**:746-751
- [59] Hla, T., Lee, M.J., Ancellin, N., Paik, J.H. and Kluk, M.J. (2001) *Science* **294**:1875-1878
- [60] Meacci, E., Cencetti, F., Donati, C., Nuti, F., Becciolini, L. and Bruni, P. (2004) *Biochem. J.* **381**:655-663
- [61] Mattie, M., Brooker, G. and Spiegel, S. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:3181-3188
- [62] Van Brocklyn, J.R., Lee, M.J., Menzeleev, R., Olivera, A., Edsall, L., Cuvillier, O., Thomas, D.M., Coopman, P.J.P., Thangada, S., Hla, T. and Spiegel, S. (1998) *J. Cell. Biol.* **142**:229-240
- [63] Ng, C.K., Carr, K., McAinsh, M.R., Powell, B. and Hetherington, A.M. (2001) *Nature* **410**:596-599
- [64] Donati, C. and Bruni, P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:2037-2048
- [65] Seitz, G., Boehmler, A. M., Kanz, L. and Mohle, R. (2005) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1044**:84-89
- [66] Cyster, J.G. (2005) *Annu. Rev. Immunol.* **23**:127-159
- [67] McVerry, B.J. and Garcia, J.G. (2005) *Cell. Signal* **17**:131-139
- [68] Waeber, C., Blondeau, N. and Salomone, S. (2004) *Drug News Perspect.* **17**:365-382
- [69] Nagata, Y., Partridge, T.A., Matsuda, R. and Zammit, P.S. (2006) *J. Cell. Biol.* **174**:245-253
- [70] Rosen, H. and Goetzl, E.J. (2005) *Nat. Rev. Immunol.* **5**:560-570
- [71] Chun, J., Goetzl, E.J., Hla, T., Igarashi, Y., Lynch, K.R., Moolenaar, W., Pyne, S. and Tigyi, G. (2002) *Pharmacol. Rev.* **54**:265-269
- [72] Neves, S.R., Ram, P.T. and Iyengar, R. (2002) *Science* **296**:1636-1639
- [73] Donati, C., Meacci, E., Nuti, F., Becciolini, L., Farnararo, M. and Bruni, P. (2005) *FASEB J.* **19**:449-451
- [74] Liu, C.H. and Hla, T. (1997) *Genomics* **43**:15-24
- [75] Windh, R.T., Lee, M.J., Hla, T., An, S., Barr, A.J. and Manning, D.R. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**:27351-27358
- [76] Okamoto, H., Takuwa, N., Gonda, K., Okazaki, H., Chang, K., Yatomi, Y., Shigematsu, H. and Takuwa, Y. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**:27104-27110
- [77] Igarashi, J. and Michel, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:36281-36288
- [78] Lee, M.J., Thangada, S., Claffey, K.P., Ancellin, N., Liu, C.H., Kluk, M., Volpi, M., Sha'afi, R.I. and Hla, T. (1999) *Cell* **99**:301-312
- [79] Lee, M.J., Thangada, S., Paik, J.H., Sapkota, G.P., Ancellin, N., Chae, S.S., Wu, M., Morales-Ruiz, M., Sessa, W.C., Alessi, D.R. and Hla, T. (2001) *Mol. Cell.* **8**:693-704
- [80] Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Barak, L.S., Olivera, A., Poulton, S., Caron, M.G., Milstien, S. and Spiegel, S. (2001) *Science* **291**:1800-1803
- [81] Rosenfeldt, H.M., Hobson, J.P., Milstien, S. and Spiegel, S. (2001) *Biochem. Soc. Trans.* **29**:836-839
- [82] Waters, C., Sambhi, B., Kong, K.C., Thompson, D., Pitson, S.M., Pyne, S. and Pyne, N.J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**:6282-6290
- [83] Liu, Y., Wada, R., Yamashita, T., Mi, Y., Deng, C.X., Hobson, J.P., Rosenfeldt, H.M., Nava, V.E., Chae, S.S., Lee, M.J., Liu, C.H., Hla, T., Spiegel, S. and Proia, R.L. (2000) *J. Clin. Invest.* **106**:51-961

- [84] Matloubian, M., Lo, C.G., Cinamon, G., et al. (2004) *Nature* **427**:355-360
- [85] Ishii, I., Friedman, B., Ye, X., Kawamura, S., McGiffert, C., Contos, J.J., Kingsbury, M.A., Zhang, G., Brown, J.H. and Chun, J. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:33697-33704
- [86] An, S., Bleu, T. and Zheng, Y. (1999) *Mol. Pharmacol.* **55**:787-794
- [87] Ancellin, N. and Hla, T. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**:18997-19002
- [88] Kon, J., Sato, K., Watanabe, T., Tomura, H., Kuwabara, A., Kimura, T., Tamama, K., Ishizuka, T., Murata, N., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M. and Okajima, F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**:23940-23947
- [89] Gonda, K., Okamoto, H., Takuwa, N., Yatomi, Y., Okazaki, H., Sakurai, T., Kimura, S., Sillard, R., Harii, K. and Takuwa, Y. (1999) *Biochem. J.* **337**:67-75
- [90] Taha, T.A., Argraves, K. and Obeid, L.M. (2004) *Biochim. Biophys. Acta* **1682**:48-55
- [91] Hall, A. (1998) *Science* **280**:2074-2075
- [92] Okamoto, H., Takuwa, N., Yokomizo, T., Sugimoto, N., Sakurada, S., Shigematsu, H. and Takuwa, Y. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**:9247-9261
- [93] Van Brocklyn, J.R., Tu, Z., Edsall, L.C., Schmidt, R.R. and Spiegel, S. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**:4626-4632
- [94] An, S., Zheng, Y. and Bleu, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:288-296
- [95] MacLennan, A.J., Carney, P.R., Zhu, W.J., Chaves, A.H., Garcia, J, et al. (2001) *Eur. J. Neurosci.* **14**:203-209
- [96] Herr, D.R., Grillet, N., Schwander, M., Rivera, R., Müller, U. and Chun J. (2007) *J. Neurosci.* **27**:1474-78
- [97] Kono, Y., Nishiuma, T., Nishimura, Y., Kotani, Y., Okada, T., Nakamura, S. and Yokoyama, M. (2007) *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* **37**:395-404
- [98] Okamoto, H., Takuwa, N., Yatomi, Y., Gonda, K., Shigematsu, H. and Takuwa, Y. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **260**:203-208
- [99] Cheresch, D.A., Leng, J. and Klemke, R.L. (1999) *J. Cell. Biol.* **146**:1107-1116
- [100] Ishii, I., Ye, X., Friedman, B., Kawamura, S., Contos, J.J., Kingsbury, M.A., Yang, A.H., Zhang, G., Brown, J.H. and Chun, J. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:25152-25159
- [101] Kluk, M.J. and Hla, T. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1582**:72-80
- [102] Graler, M.H., Bernhardt, G. and Lipp, M. (1998) *Genomics* **53**:164-169
- [103] Wang, W., Graeler, M.H. and Goetzl, E.J. (2005) *FASEB J.* **19**:1731-1733
- [104] Kohno, T., Matsuyuki, H., Inagaki, Y. and Igarashi, Y. (2003) *Genes Cells* **8**:685-697
- [105] Matsuyuki, H., Maeda, Y., Yano, K., Sugahara, K., Chiba, K., Kohno, T. and Igarashi, Y. (2006) *Cell. Mol. Immunol.* **3**:429-437
- [106] Van Brocklyn, J.R., Behbahani, B. and Lee, N.H. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1582**:89-93
- [107] Van Brocklyn, J.R., Graler, M.H., Bernhardt, G., Hobson, J.P., Lipp, M. and Spiegel, S. (2000) *Blood* **95**:2624-2629
- [108] Graler, M.H., Grosse, R., Kusch, A., Kremmer, E., Gudermann, T. and Lipp, M. (2003) *J. Cell. Biochem.* **89**:507-519
- [109] Im, D.S., Heise, C.E., Ancellin, N., O'Dowd, B.F., Shei, G.J., Heavens, R.P., Rigby, M.R., Hla, T., Mandala, S., McAllister, G., George, S.R. and Lynch, K.R. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:14281-14286
- [110] Niedernberg, A., Blaukat, A., Schoneberg, T. and Kostenis, E. (2003) *Br. J. Pharmacol.* **138**:481-93

- [111] Malek, R.L., Toman, R.E., Edsall, L.C., Wong, S., Chiu, J., Letterle, C.A., Van Brocklyn, J.R., Milstien, S., Spiegel, S., and Lee, N.H. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:5692-5699
- [112] Zhang, H., Desai, N.N., Olivera, A., Seki, T., Brooker, G. and Spiegel, S. (1991) *J. Cell. Biol.* **114**:155-167
- [113] Hla, T. (2001) *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* **64**:135-42
- [114] Watterson, K., Sankala, H., Milstien, S. and Spiegel, S. (2003) *Prog. Lipid Res.* **42**:344-57
- [115] Goodemote, K.A., Mattie, M.E., Berger, A. and Spiegel, S. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:10272-10277
- [116] Davaille, J., Gallois, C., Habib, A., Li, L., Mallat, A., Tao, J., Levade, T. and Lotersztajn, S. (2000) *J Biol Chem.* **275**:34628-34633
- [117] Ikeda, H., Satoh, H., Yanase, M., Inoue, Y., Tomiya, T., Arai, M., Tejima, K., Nagashima, K., Maekawa, H., Yahagi, N., Yatomi, Y., Sakurada, S., Takuwa, Y., Ogata, I., Kimura, S. and Fujiwara, K. (2003) *Gastroenterology.* **124**:459-469
- [118] Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:25487-25850
- [119] Cuvillier, O., Pirianov, G., Kleuser, B., Vanek, P.G., Coso, O.A., Gutkind, S., et al. (1996) *Nature* **381**:800-803
- [120] Olivera, A. and Spiegel, S. (1993) *Nature* **365**:557-560
- [121] Edsall, L.C., Cuvillier, O., Twitty, S., Spiegel, S. and Milstien, S. (2001) *J. Neurochem.* **76**:1573-1584
- [122] Le Stunff, H.L., Galve-Roperh, I., Peterson, C., Milstien, S. and Spiegel, S. (2002) *J. Cell. Biol.* **158**:1039-1049
- [123] Taha, T.A., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2006) *J. Biochem. Mol. Biol.* **39**:113-131
- [124] Taha, T.A., Kitatani, K., El-Alwani, M., Bielawski, J., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2006) *FASEB J.* **20**:482-484
- [125] Edsall, L.C., Pirianov, G.G. and Spiegel, S. (1997) *J. Neurosci.* **17**:6952-6960
- [126] Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995) *Science* **270**:1326-1331
- [127] Cross, T.G., Scheel-Toellner, D., Henriquez, N.V., Deacon, E., Salmon, M. and Lord, J.M. (2000) *Exp. Cell Res.* **256**:34-41
- [128] Karin, M., Liu, Z. and Zandi, E. (1997) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**:240-246
- [129] May, M.J. and Ghosh, S. (1999) *Science* **284**:271-273
- [130] Osawa, Y., Banno, Y., Nagaki, M., Brenner, D.A., Naiki, T., Nozawa, Y., Nakashima, S. and Moriwaki, H. (2001) *J. Immunol.* **167**:173-180
- [131] Van Echten-Deckert, G., Zschoche, A., Bar, T., Schmidt, R.R., Raths, A., Heinemann, T. and Sandhoff, K. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**:15825-15833
- [132] Laviad, E.L., Albee, L., Pankova-Kholmyansky, I., Epstein, S., Park, H., Merrill, A.H. Jr, and Futerman, A.H. (2008) *J. Biol. Chem.* **283**:5677-5684
- [133] French, K.J., Schrecengost, R.S., Lee, B.D., Zhuang, Y., Smith, S.N., Eberly, J.L., Yun, J.K. and Smith, C.D. (2003) *Cancer Res.* **63**:5962-5969
- [134] Visentin, B., Vekich, J.A., Sibbald, B.J., Cavalli, A.L., Moreno, K.M., Matteo, R.G., Garland, W.A., Lu, Y., Yu, S., Hall, H.S., Kundra, V., Mills, G.B. and Sabbadini, R.A. (2006) *Cancer Cell* **9**:225-238
- [135] Kimura, T., Watanabe, T., Sato, K., Kon, J., Tomura, H., Tamama, K., Kuwabara, A., Kanda, T., Kobayashi, I., Ohta, H., Ui, M. and Okajima, F. (2000) *Biochem. J.* **348**:71-76
- [136] Tamama, K., Tomura, H., Sato, K., Malchinkhuu, E., Damirin, A., Kimura, T., Kuwabara, A., Murakami, M. and Okajima F. (2005) *Atherosclerosis* **178**:19-23

- [137] Becciolini, L., Meacci, E., Donati, C., Cencetti, F., Rapizzi, E. and Bruni, P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1761**:43-51
- [138] Panetti, T.S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1582**:190-196
- [139] Bischoff, A., Czyborra, P., Meyer Zu Heringdorf, D., Jakobs, K.H. and Michel, M.C. (2000) *Br. J. Pharmacol.* **130**:1878-1883
- [140] Ohmori, T., Yatomi, Y., Osada, M., Kazama, F., Takafuta, T., Ikeda, H. and Ozaki, Y. (2003) *Cardiovasc. Res.* **58**:170-177
- [141] Igarashi, J. and Michel, T. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:32363-32370
- [142] Morales-Ruiz, M., Lee, M.J., Zollner, S., Gratton, J.P., Scotland, R., Shiojima, I., Walsh, K., Hla, T. and Sessa, W.C. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:32363-32370
- [143] Kupperman, E., An, S., Osborne, N., Waldron, S. and Stainier, D.Y. (2000) *Nature* **406**:192-195
- [144] Nakajima, N., Cavalli, A.L., Biral, D., Glembotski, C.C., McDonough, P.M., Ho, P.D., Betto, R., Sandona, D., Palade, P.T., Dettbarn, C.A., Klopffer, R.E. and Sabbadini, R.A. (2000) *Eur. J. Biochem.* **267**:5679-5686
- [145] Sugiyama, A., Yatomi, Y., Ozaki, Y. and Hashimoto, K. (2000) *Cardiovasc. Res.* **46**:119-125
- [146] Lecour, S., Smith, R.M., Woodward, B., Opie, L.H., Rochette, L. and Sack, M.N. (2002) *J. Mol. Cell. Cardiol.* **34**:509-518
- [147] Goetzl, E.J. and Rosen, H. (2004) *J. Clin. Invest.* **114**:1531-1537
- [148] Goetzl, E.J., Wang, W., McGiffert, C., Huang, M.C. and Graeler, M.H. (2004) *J. Cell. Biochem.* **92**:1104-1114
- [149] Lee, H., Liao, J.J., Graeler, M., Huang, M.C. and Goetzl, E.J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1582**:175-177
- [150] Graeler, M.H. and Goetzl, E.J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1582**:168-174
- [151] Huang, M.C., Graeler, M., Shankar, G., Spencer, J. and Goetzl, E.J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta.* **1582**:161-167
- [152] Cinamon, Matloubian, G.M., Lesneski, M.J., Xu, Y., Low, C., Lu, T., Proia, R.L. and Cyster, J.G. (2004) *Nature Immunol.* **5**:713-720
- [153] Kabashima, K., Haynes, N.M., Xu, Y., Nutt, S.L., Allende, M.L., Proia, R.L. et al. (2006) *J. Exp. Med.* **203**:2683-2690
- [154] Chi, H. and Flavell, R.A. (2005) *J. Immunol.* **174**:2485-2488
- [155] Lo, C.G., Xu, Y., Proia, R.L. and Cyster, J.G. (2005) *J. Exp. Med.* **201**:291-301
- [156] Garcia, J.G.N. et al. (2001) *J. Clin. Invest.* **108**:689-701
- [157] Rosen, H., Alfonso, C., Surh, C.D. and McHeyzer Williams, M.G. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**:10907-10912
- [158] Allende, M.L., Dreier, J.L., Mandala, S. and Proia, R.L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:15396-15401
- [159] Graeler, M. and Goetzl, E.J. (2002) *FASEB J.* **16**:1874-1878
- [160] Graeler, M., Shankar, G. and Goetzl, E.J. (2002) *J. Immunol.* **169**:4084-4087
- [161] Wang, W., Huang, M.-C., Marquez, C.P., Liao, J.-J. and Goetzl, E.J. (2008 in press) *J. Immunol.*
- [162] Wang, W., Graeler, M.H. and Goetzl, E.J. (2004) *FASEB J.* **18**:1043-1045
- [163] Dorsam, G., Graeler, M.H., Seroogy, C., Kong, Y., Voice, J.K. and Goetzl, E.J. (2003) *J. Immunol.* **171**:3500-3507
- [164] Baumruker, T. and Prieschl, E.E. (2000) *Int. Arch. Allergy Immunol.* **122**:85-90
- [165] Jolly, P.S. et al. (2004) *J. Exp. Med.* **199**:959-970
- [166] Brinkmann, V., Pinschewer, D.D., Feng, L. and Chen, S. (2001) *Transplantation* **72**:764-769
- [167] Brinkmann, V. and Lynch, K.R. (2002) *Curr. Opin. Immunol.* **14**:569-575

- [168] Brinkmann, V., Davis, M.D., Heise, C.E., Albert, R., Cottens, S., Hof, R., Bruns, C., Prieschl, E., Baumruker, T., Hiestand, P., Foster, C.A., Zollinger, M. and Lynch, K.R. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:21453-21457
- [169] Mandala, S., Hajdu, R., Bergstrom, J., Quackenbush, E., Xie, J., Milligan, J., Thornton, R., Shei, G.J., Carol, D., Keohane, C., Rosenbach, M., Hale, J., Lynch, C.L., Rupprecht, K., Parsons, W. and Rosen, H. (2002) *Science* **296**:346-349
- [170] Yagi, H., Kamba, R., Chiba, K., Soga, H., Yaguchi, K., Nakamura, M. and Itoh, T. (2000) *Eur. J. Immunol.* **30**:1435-1444
- [171] Chiba, K., Yanagawa, Y., Masubuchi, Y., Kataoka, H., Kawaguchi, T., Ohtsuki, M. and Hoshino, Y. (1998) *J. Immunol.* **160**:5037-5044
- [172] Hla, T. (2004) *Semin. Cell Dev. Biol.* **15**:513-520
- [173] Chalfant, C.E. and Spiegel, S. (2005) *J. Cell. Sci.* **118**:4605-4612
- [174] Meyer zu Heringdorf, D. et al. (1999) *FEBS Lett.* **461**:217-222
- [175] Bencini, C., Squecco, R., Piperio, C., Formigli, L., Meacci, E., Nosi, D., Tiribilli, B., Vassalli, M., Quercioli, F., Bruni, P., Zecchi Orlandini, S. and Francini, F. (2003) *J. Muscle Res. Cell. Motil.* **24**:539-554
- [176] Danieli-Betto, D., Germinario, E., Esposito, A., Megighian, A., Midrio, M., Ravara, B., Damiani, E., Libera, L.D., Sabbadini, R.A. and Betto, R. (2005) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **288**:C1367-C1373
- [177] Zanin, M., Germinario, E., Dalla Libera, L., Sandona, D., Sabbadini, R.A., Betto, R. and Danieli-Betto, D. (2008) *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* **294**:C36-C46
- [178] Grounds, M.D. (1998) *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **854**:78-91
- [179] Chargé, S.B. and Rudnicki, M.A. (2004) *Physiol. Rev.* **84**:209-238
- [180] Ray, R.M., Zimmerman, B.J., McCormack, S.A., Patel, T.B. and Johnson, L.R. (1999) *Am J. Physiol.* **276**:684-691
- [181] Raucci, A., Laplantine, E., Mansukhani, A. and Basilico, C. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:1747-1756
- [182] Rapizzi, E., Donati, C., Cencetti, F., Nincheri, P. and Bruni, P. (2008) *Mol. Cell. Biochem.* **314**:193-199
- [183] Meacci, E., Nuti, F., Donati, C., Cencetti, F., Farnararo, M. and Bruni, P. (2007) *J. Cell. Physiol.* **214**:210-220
- [184] Daub, H., Wallasch, C., Lankenau, A., Herrlich, A. and Ullrich, A. (1997) *EMBO J.* **16**:7032-44
- [185] Wetzker, R. and Böhrer, F.-D (2003) *Nat. rev. Mol. Cell. Bio.* **4**:651-7
- [186] Ohtsu, H., Dempsey, P.J. and Eguchi, S. (2006) *Am J. Physiol. Cell. Physiol.* **291**:C1-10
- [187] Biscardi, J.S., Maa, M.C., Tice, D.A., Cox, M.E., Leu, T.H. and Parsons, S.J. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**:8335-43
- [188] Keely, S.J., Calandrella, S.O. and Barrett, K.E. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:12619-25
- [189] Moughal, N.A., Waters, C.M., Valentine, W.J., Connell, M., Richardson, J.C., Tigyi, G., Pyne, S. and Pyne N.J. (2006) *J. Neurochem.* **98**:1920-9
- [190] Toman, R.E., Payne, S.G., Watterson, K.R., Maceyka, M., Lee, N.H., Milstien, S., Bigbee, J.W. and Spiegel, S. (2004) *J. Cell. Biol.* **166**:381-92
- [191] Sobue, S., Hagiwara, K., Banno, Y., Tamiya-Koizumi, K., Suzuki, M., Takagi, A., Kojima, T., Asano, H., Nozawa, Y. and Murate, T. (2005) *J. Neurochem.* **95**:940-9.
- [192] Shu, X., Wu, W., Mosteller, R.D. and Broek, D. (2002) *Mol. Cell. Biol.* **22**:7758-7768
- [193] Tanimoto, T., Jin, Z.G. and Berk, B.C. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:42997-3001

- [194] Endo, A., Nagashima, K., Kurose, H., Mochizuki, S., Matsuda, M. and Mochizuki, N. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:23747-54
- [195] Oskeritzian, C.A., Milstien, S. and Spiegel, S. (2007) *Pharmacol. Ther.* **115**:390-399
- [196] Olivera, A., Mizugishi, K., Tikhonova, A., Ciaccia, L., Odom, S., Proia, R.L. and Rivera J. (2007) *Immunity.* **26**:287-297
- [197] Pettus, B.J., Bielawski, J., Porcelli, A.M., Reames, D.L., Johnson, K.R., Morrow, J., Chalfant, C.E., Obeid, L.M. and Hannun, Y.A. (2003) *FASEB J.* **17**:1411-1421
- [198] Hammad, S.M., Crellin H.G., Wu, B.X., Melton, J., Anelli, V. and Obeid L.M. (2008) *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **85**:107-114
- [199] El-Shewy, H.M., Johnson, K.R., Lee, M.H., Jaffa, A.A., Obeid, L.M. and Luttrell, L.M. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**:31399-31407
- [200] Conway, A.M. et al. (1999) *Biochem. J.* **337**:171-177
- [201] Waters, C., Pyne, S. and Pyne, N.J. (2004) *Sem. In Cell & Develop. Biology* **15**:309-323
- [202] Alderton, F., Rakhit, S., Choi, K.K., Palmer, T., Sambhi, B., Pyne, S. and N. J. Pyne. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:28578-28585
- [203] Rakhit, S., Pyne, S. and Pyne, N.J. (2000) *Mol. Pharmacol.* **58**:413-420
- [204] Lin, F.T., Daaka, Y. and Lefkowitz, R.J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**:31640-31643
- [205] Pierce, K.L., Luttrell, L.M. and Lefkowitz, R.J. (2001) *Oncogene* **20**:1532-1539
- [206] Urs, A.N. et al. (2006) *Endocrinology* **147**:5249-5258
- [207] Urs, A.N. et al. (2007) *Mol. Cell. Endocrinol.* **265-266**:174-178
- [208] Sukocheva, O.A. et al. (2003) *Mol. Endocrinol.* **17**:2002-2012
- [209] Sukocheva, O. et al. (2006) *J. Cell. Biol.* **173**:301-310
- [210] Yamanaka, M., Shegogue, D., Pei, H., Bu, S., Bielawska, A., Bielawski, J., Pettus, B., Hannun, Y.A., Obeid, L. and Trojanowska, M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:53994-54001
- [211] Sauer, B., Vogler, R., von Wenckstern, H., Fujii, M., Anzano, M.B., Glick, A.B., Schafer-Korting, M., Roberts, A.B. and Kleuser, B. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:38471-38479
- [212] Radeke, H.H., von Wenckstern, H., Stoidtner, K., Sauer, B., Hammer, S. and Kleuser, B. (2005) *J. Immunol.* **174**:2778-2786
- [213] Keller, C.D., Rivera Gil, P., Tolle, M., van der Giet, M., Chun, J., Radeke, H.H., Schafer-Korting, M. and Kleuser, B. (2007) *Am. J. Pathol.* **170**:281-292
- [214] Xin, C., Ren, S., Kleuser, B., Shabahang, S., Eberhardt, W., Radeke, H., Schafer-Korting, M., Pfeilschifter, J. and Huwiler, A. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:35255-35262
- [215] Xin, C., Ren, S., Eberhardt, W., Pfeilschifter, J. and Huwiler, A. Br. (2006) *J. Pharmacol.* **147**:164-174
- [216] Miller, A.V., Alvarez, S.E., Spiegel, S. and Lebman, D.A. (2008) *Mol. Cell. Biol.* **28**:4142-4152
- [217] Goparaju, S.K., Jolly, P.S., Watterson, K.R., Bektas, M., Alvarez, S., Sarkar, S., Mel, L., Ishii, I., Chun, J., Milstien, S. and Spiegel, S. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**:4237-4249
- [218] Sugimoto, N., Takuwa, N., Okamoto, H., Sakurada, S. and Takuwa, Y. (2003) *Mol. Cell. Biol.* **23**:1534-1545
- [219] Tracey, K. J. and Cerami, A. (1993) *Annu. Rev. Cell. Bio.* **9**:317-343
- [220] Mocellin, S., Rossi, C.R., Pilati, P. and Nitti, D. (2005) *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**:35-53
- [221] Ghosh, S. and Karin, M. (2002) *Cell* **109**:81-96
- [222] Leist, M. and Jaattela, M. (2001) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **2**:589-98

- [223] Locksley, R.M., Killeen, N. and Lenardo, M.J. (2001) *Cell* **104**:487-501
- [224] Varfolomeev, E.E. and Ashkenazi, A. (2004) *Cell* **116**:491-7
- [225] Saghizadeh, M., Ong, J., Garvey, W.T., Henry, R.R. and Kern, P.A. (1996) *J. Clin. Invest.* **97**:1111-1116
- [226] Camus, G., Nys, M., Poortmans, J.R., Venneman, I., Monfils, T., Deby-Dupont, G., Juchmes-Ferir, A., Deby, C., Lamy, M. and Duchateau, J. (1998) *Eur. J. Appl. Physiol.* **79**:62-68
- [227] Ostrowski, K., Rhode, T., Asp, S., Schjerling, P. and Pedersen, B.K. (1999) *J. Physiol. (Lond)* **515**:287-291
- [228] Yokoyama, T., Nakano, M., Bednarczyk, J.L., McIntyre, B.W., Entman, M. and Mann, D.L. (1997) *Circulation* **95**:1247-1252
- [229] Hsu, H., Shu, H.B., Pan, M.G. and Goeddel D.V. (1996) *Cell* **84**:299-308
- [230] Rothe, M., Sarma, V., Dixit, V.M. and Goeddel, D.V. (1995) *Science* **269**:1424-1427
- [231] MacLachlan, T.K. and Giordano, A. (1998) *Cell. Biochem.* **71**:461-466
- [232] Xia, P. et al. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**:7996-8003
- [233] Soulez, M., Rouviere, C.G., Chafey, P., Hentzen, D., Vandromme, M., Lautredou, N., Lamb, N., Kahn, A. and Tuil, D. (1996) *Mol. Cell. Biol.* **16**:6065-6074
- [234] Vandromme, M., Gauthier-Rouviere, C., Carnac, G., Lamb, N. and Fernandez, A. (1992) *J. Cell. Biol.* **118**:1489-1500
- [235] Croissant, J.D., Kim, J.H., Eichele, G., Goering, L., Lough, J., Prywes, R. and Schwartz, R.J. (1996) *Dev. Biol.* **177**:250-264
- [236] Miwa, T. and Kedes, L. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**:2803-2813
- [237] Muscat, G.E. and Kedes, L. (1987) *Mol. Cell. Biol.* **7**:4089-4099
- [238] Ernst, H., Walsh, K., Harrison, C.A. and Rosenthal, N. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**:3735-3744
- [239] Gilgenkrantz, H., Hugnot, J.P., Lambert, M., Chafey, P., Kaplan, J.C. and Kahn, A. (1992) *J. Biol. Chem.* **267**:10823-10830
- [240] Li, YP and Schwartz, R.J. (2001) *FASEB J.* **15**:1413-5
- [241] Antoniadou, H.N., Scher, C.D. and Stiles, C.D. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:1809-13
- [242] Heldin, C.H., Westermark, B. and Wasteson, A. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**:3722-6
- [243] Raines, E.W. and Ross, R. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**:5154-60
- [244] Deuel, T.F., Huang, J.S., Proffitt, R.T., Baenziger, J.U., Chang, D. and Kennedy, B.B. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**:8896-9
- [245] Andrae, J., Gallini, R. and Betsholtz, C. (2008) *Genes Dev.* **22**:1276-1312
- [246] Claesson-Welsh, L. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**:32023-6
- [247] Bar-Sagi, D. and Feramisco, J.R. (1986) *Science* **233**:1061-1068.
- [248] Seger, R. and Krebs, E.G. (1995) *FASEB J.* **9**:726-735
- [249] Kundra, V., Escobedo, J.A., Kazlauskas, A., Kim, H.K., Rhee, S.G., Williams, L.T. and Zetter, B.R. (1994) *Nature* **367**:474-476
- [250] Hu, Q., Klippel, A., Muslin, A.J., Fantl, W.J. and Williams, L.T. (1995) *Science* **268**:100-102
- [251] Assoian, R.K. (1997) *J. Cell. Biol.* **136**:1-4
- [252] Frisch, S.M. and Ruoslahti, E. (1997) *Curr. Opin. Cell. Biol.* **9**:701-706
- [253] Clark, E.A. and Brugge, J.S. (1995) *Science* **268**:233-239
- [254] Lawlor, M. A., Feng, X., Everding, D. R., Sieger, K., Stewart, C.E. and Rotwein P. (2000) *Mol. Cell. Biol.* **20**:3256-3265
- [255] Jin P., Sejersen, T. and Ringertz, N. R. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**:1245-1249

- [256] Yablonka-Reuveni, Z., Balestreri, T. M. and Bowen-Pope, D. F. (1990) *J. Cell. Biol.* **111**:1623–1629
- [257] Fiaschi, T., Chiarugi, P., Buricchi, F., Giannoni, E., Taddei, M. L., Magnelli, L., Cozzi, G., Raugeri, G. and Ramponi, G. (2003) *Cell. and Mol. Life Sciences Sci.* **60**:2721–2735
- [258] Massagué, J. (1990) *Annu. Rev. Cell. Biol.* **6**:597-641
- [259] Massagué, J. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**:753-791
- [260] Massagué, J. and Chen, Y.G. (2000) *Genes. Dev.* **14**:627-644
- [261] Massagué, J. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **1**:169-178
- [262] Massagué, J. and Wotton, D. (2000) *EMBO J.* **19**:1745-1754
- [263] Massagué, J. and Gomis, R.R. (2006) *FEBS Lett.* **580**:2811-2820
- [264] Barnard, J.A., Lyons, R.M. and Moses, H.L. (1990) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **163**:56-63
- [265] Massagué, J., Cheifetz, S., Laiho, M., Ralph, D.A., Weiss, F.M.B. and Zentella, A. (1992) *Cancer Surv.* **12**:81-103
- [266] Wrana, J.L., Attisano, L., Wieser, R., Ventura, F. and Massagué, J. (1994) *Nature* **370**:341-347
- [267] Okadome, T., Yamashita, H., Franzen, P., Moren A., Heldin C.H. and Miyazono K. (1995) *J. Biol. Chem.* **269**:30753-30756
- [268] Feng, X.H., Filvaroff, E.H. and Derynck, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:24237-24245
- [269] Vivien, D., Attisano, L., Wrana, J.L. and Massagué, J. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**:7134-7141
- [270] Huse, M., Muir, T.W., Xu, L., Chen, Y.G., Kuriyan, J. and Massagué, J. (2001) *Mol. Cell.* **8**:671-682
- [271] Kretschmar, M. and Massagué, J. (1998) *J. Curr. Opin. Genet. Dev.* **8**:103-111
- [272] Shi, Y., Wang, Y.-F., Jayaraman, L., Yang, H., Massague, J. and Pavletich, N. (1998) *Cell* **94**:585-594
- [273] Wu, G., Chen, Y.G., Ozdamar, B., Gyuricza, C.A., Chong, P.A., Wrana, J.L., Massagué, J. and Shi, Y. (2000) *Science* **287**:92-97
- [274] Wu, J.W. et al. (2001) *Mol. Cell.* **8**:1277-1289
- [275] Hoodless, P.A., Haerry, T., Abdollah, S., Stapleton, M., O'Connor, M.B., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1996) *Cell* **85**:489-500
- [276] Macias-Silva, M., Abdollah, S., Hoodless, P.A., Pirone, R., Attisano, L. and Wrana, J.L. (1996) *Cell* **87**:1215-1224
- [277] Souchelnytskyi, S., ten Dijke, P., Miyazano, K. and Heldin, C.H. (1996) *EMBO J.* **15**:6231-6240
- [278] Zhang, Y., Feng, X., We, R. and Derynck, R. (1996) *Nature* **383**:168-172
- [279] Shi, Y. and Massagué, J. (2003) *Cell* **113**:685-700
- [280] Hayashi, H., Abdollah, S., Qiu, Y., Cai, J., Xu, Y.Y., Grinnell, B.W., Richardson, M.A., Topper, J.N., Gimbrone Jr., M.A., Wrana, J.L. and Falb, D. (1997) *Cell* **89**:1165-1173
- [281] Nakao, A., Afrakhta, M., Moren, A., Najayama, T., Christian, J.L., Heuchel, R., Itoh, S., Kawabata, M., Heldin, N.-E., Heldin, C.H. and Dijke, P. (1997) *Nature* **389**:631-635
- [282] Imamura, T., Takase, M., Nishihara, A., Oeda, E., Hanai, J.-I., Kawabata, M. and Miyazano, K. (1997) *Nature* **389**:622-626
- [283] Hata, A., Lagna, G., Massagué, J. and Hemmati-Brivanlou, A. (1998) *Genes & Dev.* **12**:186-197
- [284] Chen, H.B., Rud, J.G., Lin, K. and Xu, L. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**:21329-21336

- [285] Denissova, N.G., Pouponnot, C., Long, J., He, D., and Liu, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* **97**:6397-6402
- [286] Derynck, R., Zhang, Y., and Feng, X.H. (1998) *Cell* **95**:737-740
- [287] Derynck, R. and Zhang, Y.E. (2003) *Nature* **425**:577-584
- [288] Hawke, T.J. and Garry, D.J. (2001) *J. Appl. Physiol.* **91**: 534-551
- [289] Smith, T.H., Block, N.E., Rhodes, S.J., Konieczny, S.F. and Miller, J.B. (1993) *Development* **117**: 1125-1133
- [290] Sassoon, D.A. (1993) *Dev. Biol.* **156**: 11-23
- [291] De Angelis, L., Berghella, L., Coletta, M., Lattanzi, L., Zanchi, M., Cusella-De Angelis, M.G., Ponzetto, C. and Cossu, G. (1999) *J. Cell. Biol.* **147**: 869-877
- [292] Cossu, G. (1997) *Histol. Histopathol.* **12**: 755-760
- [293] Ferrari, G., Cusella-De Angelis, M.G., Coletta, M., Paolucci, E., Stornaiuolo, A. and Cossu, G. (1998) *Science* **279**: 1528-1530
- [294] Qu-petersen, Z., Deasy, B., Jankowski, R., Ikezawa, M., Cummins, J., Pruchnic, R., Mytinger, J., Cao, B., Gates, B., Wernig, A. and Huard, J. (2002) *J. Cell. Biol.* **157**: 851-864
- [295] De Bari, C., Dell'Accio, F., Vandenabeele, F., Vermeesch, J.R., Raymackers, J.M. and Luyten, F.P. (2003) *J. Cell. Biol.* **160**: 909-918
- [296] Galli, R., Borello, U., Gritti, A., Minasi, M.G., Bjorson, C.R., Coletta, M., Mora, M., De Angelis, M.G., Fiocco, R., Cossu, G. and Vescovi, A.L. (2000) *Nat. Med.* **3**: 986-991
- [297] Cornelison, D.D. and Wold, B.J. (1997) *Dev. Biol.* **191**: 270-283
- [298] Tagliafico, E., Brunelli, S., Bergamaschi, A., De Angelis, L., Scardigli, R., Galli, D., Battini, R., Bianco, P., Ferrari, S., Cossu, G. and Ferrari, S. (2004) *Journal of Cell Science* **117**: 4377-4388
- [299] Emery, A.E. (2002) *Lancet* **359**: 687-695
- [300] Sampaolesi, M., Torrente, Y., Innocenzi, A., Tonlorenzi, R., D'Antona, G., Pellegrino, M.A., Barresi, R., Bresolin, N., Cusella De Angelis, M.G., Campbell, K.P., Bottinelli, R. and Cossu, G. (2003) *Science* **301**: 487-492
- [301] Seale, P., Asakura, A. and Rudnicki, M.A. (2001) *Dev. Cell.* **1**: 333-342
- [302] Kornegay, J.N., Tuler, S.M., Miller, D.M. and Levesque, D.C. (1988) *Muscle Nerve* **11**:1056-1064
- [303] Sharp, N. J. et al. (1992) *Genomics* **13**:115-121
- [304] Sampaolesi, M., Blot, S., D'Antona, G., Granger, N., Tonlorenzi, R., Innocenzi, A., Mognol, P., Thibaud, J.L., Galvez, B.G., Barthèlèmy, I., Perani, L., Mantero, S., Guttinger, M., Pansarasa, O., Rinaldi, C., De Angelis, M.G.C., Torrente, Y., Bordignon, C., Bottinelli, R. and Cossu G. (2006) *Nature* **444**:574-579
- [305] Galvez, B.G. et al. (2006) *J. Cell. Biol.* **174**:231-243
- [306] Olivera, A., Kohama, T., Tu, Z., Milstein, S. and Spiegel, S. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**: 12576-12583
- [307] Tagliafico, E., Brunelli, S., Bergamaschi, A., De Angelis, L., Scardigli, R., Galli, D., Battini, R., Bianco, P., Ferrari, S. and Cossu, G. (2004) *Journal of Cell Science* **117**: 4377-4388
- [308] Brunelli, S. and Cossu, G. (2005) *Trends. Cardiovasc. Med.* **15**: 96-100
- [309] Lebman, D.A. and Spiegel, S. (2008) *J. of Lipid Research* **49**:1388-1394
- [310] M. Puceat (2007) *Cardiovascular Res.* **74**:256-261
- [311] Taha, T.A., Mullen, T.D. and Obeid, L.M. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1758**:2027-2036
- [312] Taha T.A., Osta W., Kozhaya L., Bielawski J., Johnson K.R., Gillanders W.E., Dbaiibo G.S., Hannun Y.A. and Obeid L.M. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**:20546-20554

- [313] Taha, T.A., El-Alwani, M., Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2006) *FEBS Lett.* **580**:6047-6054
- [314] Sánchez-Capelo, A. (2005) *Cytokine Growth Factor Rev.* **16**:15-34
- [315] Langen, R.C., Van Der Velden, J.L., Schols, A.M., Kelders, M.C., Wouters, E.F. and Janssen-Heininger, Y.M. (2004) *FASEB J.* **18**:227–237
- [316] Petersen, A.M. and Pedersen, B.K. (2005) *J. Appl. Physiol.* **98**:1154–1162
- [317] Xia, P., Gamble, J.R., Rye, K.A., Wang, L., Hii, C.S., Cockerill, P., Khew-Goodall, Y., Bert, A.G., Barter, P.J. and Vadas, M.A. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:14196–14201
- [318] De Palma, C., Meacci, E., Perrotta, C., Bruni, P. and Clementi, E. (2006) *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **26**:99–105
- [319] Pyne, N.J. and Pyne, S. (2008) *Biochim. Biophys. Acta* **1781**:467-476
- [320] Tolan, D. et al. (1999) *Cell. Signal.* **11**:349-354
- [321] Waters, C.M. et al (2006) *FASEB J.* **20**: 509-511
- [322] Meacci, E., Cencetti, F., Donati, C., Nuti, F., Farnararo, M., Khono, T., Igarashi, Y. and Bruni, P. (2003) *Biochim. Biophys. Acta.* **1633**:133-142
- [323] Meacci, E., Vasta, V., Donati, C., Farnararo, M. and Bruni, P. (1999) *FEBS Lett.* **457**:184-188
- [324] Meacci, E., Cencetti, F., Formigli, L., Squecco, R., Donati, C., Tiribilli, B., Quercioli, F., Zecchi Orlandini, S., Francini, F. and Bruni, P. (2002) *Biochem. J.* **362**:349-357
- [325] Ishii, I., Fukushima N., Ye, X. et al. (2004) *Annu. Rev. Biochem.* **73**:321-354
- [326] Tamama, K., Kon, J., Sato, K. et al. (2001) *Biochem. J.* **353**:139–146
- [327] Pebay, A., Wong, R.C.B., Pitson, S.M. et al. (2005) *Stem Cells* **23**:1541-1548
- [328] Katsuma, S., Hada, Y., Ueda, T. et al. (2002) *Genes Cells* **7**:1217-1230
- [329] Dellavalle, A., Sampaolesi, M., Tonlorenzi, R. et al. (2007) *Nat. Cell. Biol.* **9**:255-267
- [330] Van Brocklyn, J., Letterle, C., Snyder, P. et al. (2002) *Cancer Lett.* **181**:195-204
- [331] Pebay, A., Toutant, M., Premont, J. et al. (2001) *Eur. J. Neurosci.* **13**:2067-2076
- [332] Olivera, A., Rosenfeldt, H.M., Bektas, M. et al. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**:46452-46460
- [333] Suomalainen, L., Hakala, J.K., Pentikainen, V. et al. (2003) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88**:5572-5579
- [334] Boujaoude, L.C., Bradshaw-Wilder, C., Mao, C. et al. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**:35258-35264
- [335] Im, D.S. (2004) *J. Lipid. Res.* **45**:410-418
- [336] Lien, Y.H., Yong, K.C., Cho, C. et al. (2006) *Kidney Int.* **69**:1601-1608
- [337] Gardell, S.E., Dubin, A.E., Chun, J. (2006) *Trends Mol.Med.* **12**:65-75
- [338] Horowitz, J.C., Lee, D.Y., Waghray, M., Keshamouni, V.G., Thomas, P.E., Zhang, H., Cui, Z. and Thannickal, V.J. J. (2004) *Biol. Chem.* **279**:1359-1367
- [339] Pollman, M.J., Naumovski, L. and Gibbons, G.H. (1999) *Circulation* **99**:2019-2026
- [340] Lefer, A.M., Tsao, P., Aoki, N. and Palladino Jr., M.A. (1990) *Science* **249**:61-64
- [341] Baxter, G.F., Mocanu, M.M., Brar, B.K., Latchman, D.S. and Yellon, D.M. (2001) *J. Cardiovasc. Pharmacol.* **38**:930-939
- [342] Sales, V.L., Engelmayr Jr., G.C., Mettler, B.A., Johnson Jr., J.A., Sacks, M.S. and Mayer Jr., J.E. (2006) *Circulation* **4**:I193-I199
- [343] Rahimi, R.A. and Leof J., E.B. (2007) *Cell. Biochem.* **102**:593-608
- [344] Donati, C., Cencetti, F., Nincheri, P., Bernacchioni, C., Brunelli, S., Clementi, E., Cossu, G. and Bruni, P. (2007) *Stem Cells* **25**:1713-1719

- [345] Hannun, Y.A. and Obeid, L.M. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**:139-150
- [346] Tao, R., Zhang, J., Vessey, D.A., Honbo, N. and Karliner, J.S. (2007) *Cardiovasc. Res.* **74**:56-63
- [347] Gomez-Brouchet, A., Pchejetski, D., Brizuela, L., Garcia, V., Altié, M.F., Maddelein, M.L., Delisle, M.B. and Cuvillier, O. (2007) *Mol. Pharmacol.* **72**:341-349
- [348] Mizugishi, K., Yamashita, T., Olivera, A., Miller, G.F., Spiegel, S. and Proia, R.L. (2005) *Mol. Cell. Biol.* **25**:11113-11121
- [349] Katsuma, S., Ruike, Y., Yano, T., Kimura, M., Hirasawa, A. and Tsujimoto, G. (2005) *FEBS Lett.* **579**:2576-2582
- [350] Galliher, A.J., Neil, J.R. and Schiemann, W.P. (2006) *Future Oncol.* **2**:743-763
- [351] Pitson, S.M., Moretti, P.A., Zebol, J.R., Xia, P., Gamble, J.R., Vadas, M.A., D'Andrea, R.J. and Wattenberg, B.W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**:33945-33950
- [352] Serrano-Sanchez, M., Tanfin, Z. and Leiber, D. (2008) *Endocrinology* **149**:4669-4679
- [353] Huwiler, A., Döll, F., Ren, S., Klawitter, S., Greening, A., Römer, I., Bubnova, S., Reinsberg, L. and Pfeilschifter, J. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1761**:367-376
- [354] Joo, C.K., Kim, H.S., Park, J.Y., Seomun, Y., Son, M.J. and Kim, J.T. (2008) *Oncogene* **27**:614-628
- [355] Kariya, Y., Kihara, A., Ikeda, M., Kikuchi, F., Nakamura, S., Hashimoto, S., Choi, C.-H., Lee, Y.-M. and Igarashi, Y. (2005) *Genes Cells* **10**:605-615
- [356] Xia, P., Wang, L., Gamble, J.R. and Vadas, M.A. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**:34499-34505
- [357] Radeff-Huang, J., Seasholtz, T.M., Chang, J.W., Smith, J.M., Walsh, C.T. and Brown, J.H. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**:863-870
- [358] Chen, S.E., Jin, B. and Li, Y.P. (2007) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **292**:C1660-C1671
- [359] Chen, X.L., Grey, J.Y., Thomas, S., Qiu, F.H., Medford, R.M., Wasserman, M.A. and Kunsch, C. (2004) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **287**:H1452-H1458