



*Università degli Studi di Firenze*

**Dipartimento di Scienze Biomediche Sperimentali e Cliniche**

**DOTTORATO DI RICERCA IN  
BIOCHIMICA E BIOLOGIA APPLICATA**

CICLO XXV

COORDINATORE Prof.ssa Degl'Innocenti Donatella

**EFFETTO DI LISOFOSFOLIPIDI BIOATTIVI SULLE PROPRIETA'  
BIOLOGICHE DI CELLULE SATELLITI  
DI MUSCOLO SCHELETRICO**

Settore Scientifico Disciplinare BIO/10

**Dottorando**

Dott.ssa Blescia Sabrina

**Tutore**

Prof.ssa Bruni Paola

Anni 2010/2012

# INDICE

<b>RIASSUNTO</b> .....	<b>2</b>
<b>INTRODUZIONE</b> .....	<b>4</b>
<b>1. CARATTERISTICHE GENERALI DEL MUSCOLO SCHELETRICO</b> .....	<b>4</b>
1.1 POTENZIALE RIGENERATIVO DEL MUSCOLO SCHELETRICO .....	<b>8</b>
<b>2. SFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P)</b> .....	<b>14</b>
2.1 SFINGOSINA CHINASI .....	<b>15</b>
2.2 MODALITA' DI AZIONE DI S1P .....	<b>22</b>
2.3 FUNZIONI BIOLOGICHE DI S1P .....	<b>28</b>
<b>3. ACIDO LISOFOSFATIDICO (LPA)</b> .....	<b>34</b>
3.1 MODALITA' D'AZIONE DI LPA .....	<b>36</b>
3.2 FUNZIONI BIOLOGICHE DI LPA .....	<b>42</b>
<b>4. EFFETTI DI S1P e LPA SULLA CRESCITA CELLULARE, DIFFERENZIAMENTO E MOTILITA' DI MIOBLASTI</b> .....	<b>47</b>
<b>5. CROSS-TALK FUNZIONALE DI S1P E LPA CON FATTORI DI CRESCITA, CITOCHINE E ORMONI</b> .....	<b>50</b>
<b>6. EFFETTI DI S1P E LPA NEL METABOLISMO DEL MUSCOLO SCHELETRICO</b> .....	<b>54</b>
<b>7. EFFETTI DI S1P E LPA NELLA FISIOLOGIA E BIOLOGIA DEL MUSCOLO SCHELETRICO</b> .....	<b>56</b>
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	<b>58</b>
MATERIALI .....	<b>58</b>
ISOLAMENTO E COLTURA DI CELLULE SATELLITI MURINE .....	<b>59</b>
TRASFEZIONE CELLULARE .....	<b>61</b>
RETROTRASCRIZIONE .....	<b>61</b>
REAL TIME PCR .....	<b>62</b>
PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER WESTERN BLOTTING .....	<b>63</b>
DOSAGGIO DELLE PROTEINE .....	<b>63</b>
ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE E WESTERN BLOTTING .....	<b>64</b>
STRIPPING DELLE MEMBRANE DI PVDF .....	<b>66</b>
VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE SATELLITI MEDIANTE INCORPORAZIONE DI TIMIDINA TRIZIATA .....	<b>66</b>
SAGGI DI MIGRAZIONE DI CELLULE SATELLITI .....	<b>67</b>
ANALISI STATISTICA .....	<b>68</b>
<b>RISULTATI I PARTE</b> .....	<b>69</b>
SFINGOSINA 1-FOSFATO MEDIA LA PROLIFERAZIONE E LA MIGRAZIONE DI CELLULE SATELLITI MURINE .....	<b>69</b>
<b>RISULTATI II PARTE</b> .....	<b>90</b>
CROSS-TALK FUNZIONALE TRA LPA E ASSE SPHK/S1P .....	<b>90</b>
<b>DISCUSSIONE I</b> .....	<b>104</b>
<b>DISCUSSIONE II</b> .....	<b>109</b>
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	<b>114</b>

## RIASSUNTO

Le cellule satelliti rappresentano il compartimento staminale del muscolo scheletrico responsabile della sua capacità rigenerativa. Tali cellule nel muscolo a riposo sono quiescenti ma in risposta ad opportuni stimoli, come quelli rilasciati a seguito di un danno, vengono indotte ad entrare nel ciclo cellulare, proliferare e differenziare in mioblasti che a loro volta si fondono con le fibre danneggiate al fine di favorirne la riparazione. Tuttavia non sono stati completamente caratterizzati i segnali extracellulari e i meccanismi molecolari che contribuiscono alla riparazione tissutale.

Nel corso di questa tesi sono stati valutati gli effetti biologici del lipide bioattivo sfingosina 1-fosfato (S1P) sulle cellule satelliti murine, in quanto questo sfingolipide è stato identificato tra i pochi agenti extracellulari capaci di attivare cellule satelliti muscolari. In particolare è stato valutato l'effetto di S1P sulla proliferazione e migrazione delle cellule satelliti. Attraverso esperimenti d'incorporazione di timidina triziata è stato dimostrato il ruolo positivo di S1P nella proliferazione di cellule satelliti. Inoltre tramite l'impiego di approcci farmacologici e genetici, è stato dimostrato che l'azione mitogenica di S1P in tali cellule dipende dai recettori S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub>. Inoltre, utilizzando diversi approcci sperimentali, S1P è risultato un modulatore positivo della motilità delle cellule satelliti, evento fondamentale per la loro corretta localizzazione dopo l'attivazione, al fine di riparare il tessuto danneggiato. È interessante notare che la specifica down-regolazione di ciascuna isoforma recettoriale per S1P ha dimostrato il ruolo fondamentale di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>4</sub> nel mediare l'effetto chemiotattico del lipide bioattivo. Quest'ultimo risultato dimostra per la prima volta che il recettore S1P<sub>4</sub> svolge un ruolo in cellule muscolari scheletriche, supportando l'idea che questo sottotipo recettoriale svolga un'azione biologica più ampia di quella finora identificata nel tessuto linfoide. Al contrario, è stato visto che S1P<sub>2</sub> regola negativamente la migrazione cellulare S1P dipendente (Calise et al., 2012).

Inoltre è stato dimostrato per la prima volta che il lisofosfolipide bioattivo acido lisofosfatidico (LPA) media un effetto pro-mitogenico in cellule satelliti murine. Attraverso esperimenti d'incorporazione di timidina triziata e tramite l'utilizzo di un antagonista specifico per i recettori LPA<sub>1/3</sub> (Ki16425), è stato verificato il coinvolgimento di tali recettori nel mediare l'effetto proliferativo del lisofosfolipide. In seguito è stato osservato che il trattamento per 24 ore con LPA è in grado di aumentare l'espressione dell'isoforma 1 della sfingosina chinasi (SphK1), enzima responsabile della produzione di S1P e del quale esistono due isoforme, SphK1 e SphK2. Sulla base di questi risultati, è

stato ipotizzato un cross-talk funzionale tra LPA e l'asse SphK/S1P. Inizialmente è stato quindi valutato il coinvolgimento di entrambe le isoforme enzimatiche nell'effetto proliferativo di LPA tramite approcci farmacologici e genetici. Mentre l'utilizzo degli inibitori farmacologici non ha determinato alcun effetto significativo, il silenziamento di ciascuna isoforma enzimatica ha rilevato un ruolo negativo di SphK2 e un ruolo positivo di SphK1 nella proliferazione indotta dal lisofosfolipide.

Tramite saggio di Boyden, LPA è risultato un modulatore positivo della motilità delle cellule satellite, effetto mediato sia da SphK1 che da SphK2, come dimostrato sia con l'utilizzo di inibitori farmacologici specifici per le due isoforme enzimatiche sia con la tecnica dell'interferenza a RNA.

Gli esiti di questi studi permetteranno di caratterizzare al meglio gli effetti dei lipidi bioattivi in cellule satelliti, con l'obiettivo di agire sul loro meccanismo d'azione al fine di migliorare la capacità di questa popolazione cellulare di ripopolare il tessuto muscolare danneggiato, in seguito sia a traumi che a patologie degenerative, quali le distrofie.

# **INTRODUZIONE**

## **1. CARATTERISTICHE GENERALI DEL MUSCOLO SCHELETRICO**

I tessuti muscolari hanno come caratteristica comune la contrattilità. Sulla base di caratteristiche fisiche ultrastrutturali, istologiche e fisiologiche possono essere distinti in tessuto muscolare striato e tessuto muscolare liscio. Il tessuto muscolare striato è così detto per la presenza di bande chiare e scure all'osservazione microscopica ed è di due tipi: scheletrico e cardiaco. Il muscolo scheletrico è un muscolo volontario, cioè condizionato e regolato da impulsi che partono dal sistema nervoso centrale. Il tessuto muscolare cardiaco è strutturalmente simile al precedente ma è completamente indipendente dalla volontà: le sue fibre infatti sono dotate di contrazione ritmica automatica, indipendente dall'arrivo dell'impulso nervoso. Il muscolo cardiaco è composto da cardiomiociti, la cui contrazione assicura la corretta circolazione del sangue nel corpo.

Il tessuto muscolare liscio è costituito da cellule muscolari lisce, prive di striature trasversali. Si differenzia anche per la ridotta organizzazione strutturale del tessuto stesso, è involontario, sotto il controllo del sistema nervoso vegetativo. Il muscolo liscio è responsabile della contrazione di organi come la vescica, l'utero e regola la funzione dei tratti gastrointestinale e respiratorio così come la pressione sanguigna. Inoltre, al contrario delle cellule del muscolo scheletrico e cardiaco che sono differenziate in maniera terminale, le cellule muscolari lisce mantengono una plasticità significativa e possono cambiare fenotipo in risposta ad alterazioni dei segnali dell'ambiente locale (Owens et al., 2004).

Il muscolo scheletrico è il tessuto più abbondante del corpo umano, costituendo il 50% circa della massa corporea dell'adulto. La contrazione del muscolo scheletrico induce movimenti coordinati del corpo attraverso l'attacco dei singoli muscoli allo scheletro. L'unità morfologica del muscolo è rappresentata dalla fibra muscolare, sincizio polinucleato derivato, durante lo sviluppo, dalla fusione di elementi mononucleati, i mioblasti. Ogni miofibrilla è caratterizzata dalla presenza di miofibrille, costituite da unità ripetute, i sarcomeri, formati da filamenti di actina e miosina. Le fibre muscolari sono disposte parallelamente le une alle altre e sono tenute insieme da un'impalcatura di connettivo; in particolare si definisce epimisio la guaina connettivale che avvolge

esternamente il muscolo, distinto dal perimisio che circonda più fasci di fibre, e dall'endomysio che avvolge le singole fibre muscolari e costituisce la membrana basale di ciascuna miofibrilla.

Le fibre muscolari sono classificate in tipo I, IIA, IIB, IIX e differiscono tra loro per l'espressione di specifiche isoforme delle catene pesanti di miosina (MyHC) e le conseguenti diverse caratteristiche contrattili di velocità e resistenza alla fatica. Nel muscolo, la percentuale di questi differenti tipi di miofibrille non è fissa e può variare nel corso della vita. Le fibre muscolari di tipo I (lente) sono caratterizzate da un elevato contenuto in mitocondri e quindi da un metabolismo prevalentemente ossidativo, da un'alta resistenza alla fatica e da una lenta velocità di contrazione. Le fibre di tipo IIA (rapide) possiedono alti livelli di enzimi glicolitici e ossidativi, si contraggono velocemente e si affaticano moderatamente. Le fibre di tipo IIB (rapide), al contrario, hanno un metabolismo prevalentemente glicolitico, si contraggono molto velocemente e si affaticano rapidamente. Le fibre di tipo IIX hanno caratteristiche contrattili e metaboliche intermedie tra le fibre di tipo I e le fibre di tipo IIB.

Le fibre lente sono utilizzate per il mantenimento della postura in cui si richiede un'attività contrattile prolungata, mentre le fibre rapide sono coinvolte nei movimenti in cui si richiedono forza e velocità. Durante la vita embrionale e neonatale o durante i processi rigenerativi le fibre esprimono una catena pesante della miosina (MyHC) di tipo embrionale, che è sostituita poi da quella di tipo adulto. Oltre all'isoforma delle MyHC, le fibre muscolari possono esprimere diverse isoforme di proteine miofibrillari come le catene leggere della miosina, la troponina C, troponina T, la troponina I e la tropomiosina. Tra i fattori che influenzano l'espressione genica delle fibre e quindi la prestazione contrattile, il più importante e più noto è rappresentato dalla frequenza e dalla durata della stimolazione elettrica del motoneurone. Infatti, l'attività prolungata e a bassa frequenza (10-20 Hz) promuove un fenotipo lento, mentre scariche di breve durata ad alta frequenza (100-150 Hz) favoriscono un fenotipo rapido.

I muscoli scheletrici differiscono tra loro oltre che per forma, dimensione e organizzazione delle miofibrille, anche per la loro composizione specifica, che ne detta la sua caratteristica contrattile (Geeves et al., 1999; Schiaffino et al., 2011).

Sebbene l'attività principale del muscolo scheletrico sia quella di produrre forza per il movimento, tale tessuto svolge anche altre funzioni. Ad esempio durante una contrazione intensa, il muscolo scheletrico produce calore per effetto di un accoppiamento non perfetto tra l'energia chimica dell'ATP e il lavoro meccanico della contrazione. Questa produzione

di calore può essere utile quando la temperatura ambientale è bassa: la termogenesi da tremore è un processo che il muscolo scheletrico utilizza per generare calore ma poco movimento, e serve a mantenere la temperatura corporea a 37°C.

Un'altra funzione verte sul controllo del metabolismo del corpo. Se si tiene in considerazione che tale tessuto rappresenta approssimativamente il 38% e il 30% della massa corporea totale rispettivamente negli uomini e nelle donne (Janssen et al., 2000), in condizioni di digiuno esso funge da principale riserva di aminoacidi per mantenere la sintesi proteica nei tessuti e negli organi e fornisce i precursori per la gluconeogenesi epatica.

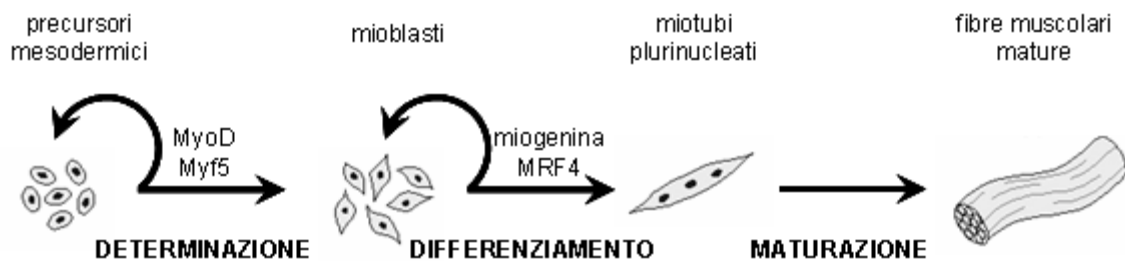
Esiste una cooperazione metabolica tra muscolo scheletrico e fegato che va sotto il nome di ciclo di Cori. Durante un'attività muscolare molto intensa, il muscolo utilizza il glicogeno come fonte di energia, generando lattato attraverso la glicolisi. Durante il periodo di recupero, parte del lattato formato nel muscolo viene trasportato al fegato e usato per produrre glucosio tramite la gluconeogenesi. Il glucosio prodotto è rilasciato nel sangue e ritorna al muscolo per ripristinare le riserve di glicogeno.

Dopo i pasti, l'insulina stimola l'assunzione di glucosio ematico da parte del tessuto muscolare il quale lo convertirà in glicogeno.

Il muscolo scheletrico è un esempio paradigmatico di come i sistemi biologici abbiano acquisito strategie adattative volte a far fronte alle varie esigenze fisiologiche e a massimizzare i processi biochimici. Il tessuto muscolare striato dimostra una notevole flessibilità e può adattarsi sia dal punto di vista metabolico che contrattile ad alterazioni delle esigenze funzionali. È noto che l'esercizio fisico influenza l'espressione genica determinando cambiamenti qualitativi e quantitativi nelle cellule muscolari, insieme al rimodellamento del metabolismo energetico muscolare (Schiaffino et al., 2007).

Il tessuto muscolare scheletrico dei vertebrati deriva da precursori cellulari mesodermici che si formano a partire dai somiti, ammassi di cellule mesodermiche, localizzati lateralmente al tubo neurale nell'embrione.

Nei mammiferi la miogenesi, ovvero la formazione di cellule muscolari scheletriche durante l'embriogenesi, procede attraverso tre stadi: la determinazione dei precursori cellulari muscolari, chiamati mioblasti, la proliferazione dei mioblasti e il loro successivo differenziamento in fibre muscolari mature (Fig. 1).



**Fig. 1. Rappresentazione schematica dello sviluppo del muscolo scheletrico nei mammiferi.**

I mioblasti sono cellule commissionate, “destinate” a diventare fibre muscolari, ma non ancora differenziate. In seguito alla proliferazione, i mioblasti escono dal ciclo cellulare, si allineano e si fondono tra loro. Si formano così sincizi plurinucleati, denominati miotubi, che differenziano in cellule muscolari mature, contrattili. Specifici segnali provenienti dai tessuti circostanti, inclusi il tubo neurale e l'ectoderma laterale, svolgono un ruolo fondamentale nel determinare la porzione dei somiti in cui si formeranno i mioblasti (Hawke and Garry, 2001). Tali segnali sono espressi solo temporaneamente ed innescano l'espressione di numerosi fattori di trascrizione che consentono il mantenimento del programma miogenico in assenza dei segnali che lo hanno generato. La determinazione della linea miogenica richiede l'induzione dell'espressione di MyoD e Myf5, fattori trascrizionali con dominio basico elica-ansa-elica (bHLH) appartenenti alla famiglia degli MRF (fattori regolatori miogenici). Le proteine appartenenti alla famiglia bHLH sono omo- o eterodimeri che legano la sequenza consenso CANNTG, nota come *E box*, presente a livello dei promotori di geni muscolo-specifici (Berkes et al., 2005). Al fine di promuovere l'attivazione dei geni di cui regolano l'espressione, gli MRF interagiscono con altri fattori di trascrizione bHLH, appartenenti alla famiglia E2, e con i fattori di trascrizione MEF2 (Muscle Enhancer-binding Factor), appartenenti alla famiglia MADS (MCM1, Agamous, Deficiens, Serum Response Factor), che funzionano come co-attivatori trascrizionali delle proteine miogeniche (Lassar et al., 1991). Mentre MyoD e Myf5 sono espresse precocemente e sono necessarie per la determinazione delle cellule mesodermiche in mioblasti, altri due membri della famiglia MRF, miogenina e MRF4, sono espressi più tardivamente e sono indispensabili per il differenziamento a miotubi. MRF4 sembra inoltre contribuire al mantenimento della specificità cellulare.

Al fine di garantire che la morfogenesi proceda correttamente, è necessario che la transizione tra lo stato determinato e quello differenziato avvenga al momento opportuno. Il controllo temporale di questo evento coinvolge l'espressione di proteine inibitrici, come Id (*Inhibitor of DNA binding*), che contengono un sito di dimerizzazione ma sono però



prive del dominio di legame al DNA. Di conseguenza, Id forma eterodimeri con gli MRF impedendone il legame al DNA; risulta così bloccata l'attivazione della trascrizione di geni muscolo-specifici.

Il differenziamento è associato all'arresto del ciclo cellulare. Ciò suggerisce il coinvolgimento delle proteine del ciclo cellulare (Cdk, ciclina) nella regolazione della transizione stato determinato-stato differenziato. A tale proposito, è stato dimostrato che inibitori dell'attività chinasi dei complessi ciclina-Cdk possono indurre il differenziamento di cellule in coltura e questi inibitori sono espressi a livello delle cellule in via di differenziamento *in vivo*.

Una volta innescato, il programma miogenico si automantiene in quanto i fattori miogenici stessi regolano positivamente la loro espressione e, interagendo tra loro, agiscono sinergicamente nel promuovere l'espressione di geni i cui prodotti guidano il differenziamento delle cellule muscolari.

Durante lo sviluppo embrionale, una sottopopolazione dei precursori miogenici non differenzia e rimane quiescente nell'organismo adulto (Gros et al., 2005). Si tratta delle cellule satelliti, così definite per la posizione che occupano, tra il sarcolemma della fibra muscolare e la lamina basale che circonda le miofibre.

## 1.1 POTENZIALE RIGENERATIVO DEL MUSCOLO SCHELETRICO

In normali condizioni fisiologiche, il muscolo scheletrico adulto è un tessuto estremamente stabile, ma a seguito di danni dovuti a malattie, traumi o esercizio fisico intenso, mostra una notevole capacità di rigenerazione. Questo processo dipende quasi esclusivamente dall'abilità delle cellule satelliti di attivarsi in risposta a trauma muscolare, sia in seguito a lesioni che nel contesto di patologie miodegenerative (Chargé et al., 2004).

Le cellule satelliti sono state identificate per la prima volta mediante studi di microscopia elettronica (Mauro, 1961) e definite come “mioblasti dormienti pronti a riavviare lo sviluppo di fibre muscolari scheletriche in seguito a danno”. Tale popolazione di cellule esprime i fattori di trascrizione Pax3 e Pax7 (Chargé et al., 2004). I fattori trascrizionali Pax (Paired-Box Proteins) sono coinvolti nella determinazione della linea miogenica e allo stesso tempo reprimono i geni necessari per il differenziamento. La popolazione progenitrice che si sviluppa dalla porzione centrale del dermomiotomo durante la miogenesi esprime contemporaneamente Pax3 e Pax7, nell'adulto invece le cellule satelliti esprimono Pax7 mentre l'espressione di Pax3 risulta diminuita. Nonostante Pax7 sia il

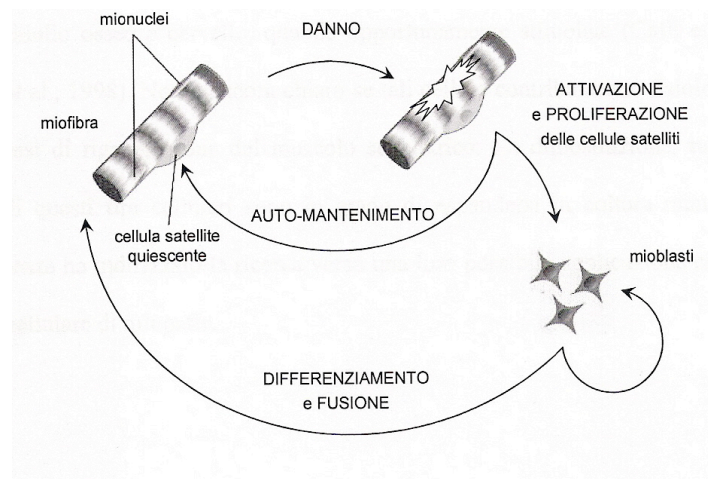
marcatore per eccellenza delle cellule satelliti quiescenti, sono stati identificati altri marcatori molecolari per tale popolazione cellulare tra cui VCAM-1 (molecole di adesione cellulare vascolare-1), c-Met (recettore del fattore di crescita degli epatociti, HGF), M-caderina, CD34, Myf5. È stato ipotizzato che CD34 mantenga i precursori cellulari in uno stato di quiescenza (Morgan et al., 2003).

Le cellule satelliti sono quindi cellule indifferenziate che mantengono la capacità di proliferare e differenziare, dando luogo a nuove fibre muscolari. Di conseguenza esse rappresentano il compartimento staminale del tessuto muscolare scheletrico, la principale fonte di nuove miofibre, svolgendo un ruolo fondamentale nell'omeostasi del muscolo, sia nel contesto del normale *turnover* che in seguito a traumi o patologie. Le cellule satelliti si dividono in maniera asimmetrica, dando origine a due cellule figlie: una commissionata al differenziamento miogenico ed una che rimane invece a far parte del compartimento staminale, impedendone così la deplezione (Kuang et al., 2007). Questa capacità di auto-mantenimento è una delle proprietà che caratterizzano le cellule staminali, insieme alla capacità di dividersi indefinitamente e di dare origine ad uno o più tipi di cellule differenziate (Anderson et al., 2001). L'auto-mantenimento delle cellule satelliti è quindi un processo fondamentale affinché i cicli ricorrenti di rigenerazione muscolare non causino l'esaurimento del pool cellulare. Tuttavia, la riduzione nel numero di questo tipo cellulare legata all'invecchiamento (Carosio et al., 2011) indica che il self-renewal delle cellule satelliti non può completamente bilanciare la perdita cronica dei mio nuclei legata all'invecchiamento (Carlson et al., 2009). Inoltre l'auto-mantenimento non sembra essere in grado di compensare il depauperamento del pool di cellule satelliti legato alla continua attivazione del processo di rigenerazione del muscolo nelle malattie degenerative come le distrofie muscolari (Matsumura et al., 1993).

Le cellule satelliti sono presenti a livello di tutti i tipi di muscolo scheletrico, sebbene con diversa distribuzione. Ad esempio, la densità di cellule satelliti nel soleo dell'adulto è due, tre volte maggiore rispetto a quella del tibiale anteriore e dell'estensore lungo delle dita (Chargé et al., 2004). A livello della giunzione neuromuscolare ed in prossimità dei capillari la densità di questo tipo cellulare è maggiore, suggerendo che alcuni fattori rilasciati da queste strutture potrebbero svolgere un ruolo fondamentale nel processo di *homing* delle cellule satelliti, e quindi nella specificazione della loro localizzazione nel muscolo e nell'omeostasi del compartimento cellulare. Il numero di cellule satelliti associate a ciascuna miofibra dipende, oltre che dal tipo di fibra, dalla specie e dall'età dell'organismo.

Molteplici sono i fattori ambientali, caratteristici della nicchia in cui risiedono le cellule staminali, che influiscono sulla funzionalità delle cellule satelliti. I capillari, ad esempio, che si trovano spesso localizzati in prossimità delle cellule staminali, rappresentano un'importante fonte di fattori di segnalazione (Kuang et al., 2008); le citochine secrete dalle cellule che risiedono nel muscolo scheletrico, quali fibroblasti e cellule del sistema immunitario, possono influenzare la funzionalità delle cellule satelliti. Anche la matrice extracellulare riveste un ruolo fondamentale nel controllo del differenziamento miogenico: infatti è stato dimostrato che la fibronectina inibisce il differenziamento dei mioblasti in coltura, mentre la laminina ha effetto opposto (Kuang et al., 2008).

Come già detto in precedenza, sebbene nel muscolo normale le cellule satelliti siano mitoticamente quiescenti, con limitata attività trascrizionale, in risposta ad opportuni stimoli, come quelli rilasciati in seguito ad un danno, esse vengono indotte ad entrare nel ciclo cellulare e proliferare. Alcuni dei fattori responsabili della transizione da quiescenza a proliferazione sono prodotti dalle cellule satelliti stesse, altri invece sono rilasciati dal microambiente circostante. Una volta attivate quindi le cellule satelliti escono dalla loro nicchia, entrano nel ciclo cellulare, coesprimendo Pax7 e MyoD. I mioblasti andranno incontro a numerosi cicli di divisione, dopodiché smetteranno di proliferare e l'espressione della miogenina indurrà il differenziamento e la fusione tra mioblasti e fibre danneggiate, per riparare il danno, oppure tra loro per dare origine a nuove miofibre (Bischoff et al., 1994). La rigenerazione del muscolo scheletrico ripercorre quindi le tappe della miogenesi durante lo sviluppo embrionale, ed è anch'essa un processo altamente coordinato, regolato dalle proteine miogeniche MRF, che vengono espresse secondo una precisa sequenza temporale durante le fasi di attivazione, proliferazione e differenziamento (Cornelison et al., 1997).



**Fig. 2. Rappresentazione schematica del processo di rigenerazione del muscolo scheletrico in seguito a danno.**

Il processo di rigenerazione muscolare procede attraverso tre stadi: l'induzione della risposta infiammatoria, dominata dall'invasione dei macrofagi, l'attivazione delle cellule satelliti, la maturazione delle miofibre neoformate (Ciciliot and Schiaffino, 2010). Un trauma muscolare comporta un'alterazione dell'integrità del sarcolemma e dunque è causa di necrosi delle miofibre, fenomeno che evoca la risposta infiammatoria. Il ruolo della risposta infiammatoria nella rigenerazione muscolare è controverso, in quanto, se da un lato tale processo favorisce il recupero della funzionalità del tessuto lesa, dall'altro è esso stesso causa di danno cellulare. Le prime cellule della risposta infiammatoria ad essere reclutate a livello del sito di danno sono i neutrofili (Tidball, 2005). Oltre a fagocitare i detriti necrotici, i neutrofili rilasciano molecole citolitiche e citotossiche che danneggiano ulteriormente il tessuto invaso. L'altra popolazione di cellule della risposta infiammatoria che viene reclutata al sito di danno è rappresentata dai macrofagi, che rivestono un ruolo fondamentale nel promuovere la rigenerazione muscolare. Due sottopopolazioni di macrofagi invadono il tessuto danneggiato: i macrofagi  $CD68^+/CD163^-$ , che per primi raggiungono il sito di danno, e i macrofagi  $CD68^+/CD163^+$ . I primi secernono citochine pro-infiammatorie, come il  $TNF-\alpha$  (fattore di necrosi tumorale- $\alpha$ ) e l'interleuchina- $1\beta$  ( $IL-1\beta$ ), e sono responsabili della fagocitosi dei detriti necrotici. La seconda sottopopolazione di macrofagi secerne citochine, quali  $IL-10$ , fattori di crescita che promuovono il processo di rigenerazione muscolare favorendo l'attivazione delle cellule satelliti, la loro proliferazione ed il successivo differenziamento (Ciciliot and Schiaffino, 2010). Oltre a rappresentare una fonte di fattori di crescita e citochine, i macrofagi, come i neutrofili, rilasciano radicali liberi e monossido d'azoto ( $NO$ ) che contribuiscono ad alterare l'integrità

del tessuto muscolare. Il NO riveste un ruolo controverso nel processo di rigenerazione muscolare, contribuendo da un lato ad alterare ulteriormente l'integrità del tessuto sede di danno, dall'altro svolge un'azione citoprotettiva e favorisce l'attivazione delle cellule satelliti (Tidball, 2005). Quest'ultimo processo può dipendere dall'attivazione NO-dipendente delle metalloproteasi che inducono il rilascio di HGF dalla matrice extracellulare. Tale fattore di crescita si lega al proprio recettore, c-Met, espresso a livello delle cellule satelliti che vengono di conseguenza attivate (Ciciliot and Schiaffino, 2010). L'attivazione delle cellule satelliti è indotta anche da sfingosina 1-fosfato. Quando la sintesi dello sfingolipide è inibita, le cellule satelliti non entrano nel ciclo cellulare e il processo di rigenerazione muscolare risulta compromesso (Ciciliot and Schiaffino, 2010). Tra i fattori di crescita che influiscono sulla proliferazione ed il differenziamento dei mioblasti *in vitro* vanno ricordati l'IGF-1 (fattore di crescita insulino-simile), bFGF (fattore di crescita basico dei fibroblasti), TGF- $\beta$  (fattore di crescita trasformante- $\beta$ ), TNF- $\alpha$ . L'IGF-1, in particolare ha un effetto mitogenico. Nei mioblasti murini C2C12 tale effetto coinvolge la proteina chinasi PKC $\delta$  che determina l'attivazione delle MAPK (proteine chinasi attivate da mitogeni) ERK1/2 (chinasi regolate da segnali extracellulari) (Clemmons, 2009; Czifra, 2006). L'IGF-1 induce un aumento del profilo di espressione dei fattori coinvolti nella regolazione del ciclo cellulare. Oltre che nella proliferazione, IGF-1 è implicato anche nella regolazione del differenziamento. Nella regolazione di tale processo, l'IGF-1 agisce tramite la via PI3K (fosfatidilinositolo 3-chinasi), il cui prodotto fosforilato, PIP3 (fosfatidilinositolo 3,4,5-trisfosfato) attiva altri effettori a valle che portano all'attivazione di geni muscolo-specifici. In questa via di segnalazione sono coinvolti alcuni membri della famiglia delle MAPK: ERK1/2, JNK e p38 MAPK, quest'ultima è in grado di accelerare la formazione dei miotubi (Clemmons, 2009; Czifra, 2006). HGF è coinvolto nell'attivazione delle cellule satelliti (Chargé and Rudnicki, 2004). I livelli di espressione della proteina aumentano proporzionalmente all'entità del danno muscolare. HGF promuove l'ingresso delle cellule satelliti nel ciclo cellulare ed inibisce il differenziamento. È interessante notare che la transizione proliferazione-differenziamento delle cellule satelliti è controllata dalle vie di segnalazione di Notch e Wnt, in particolare la prima sembra essere coinvolta nella fase proliferativa, infatti alterazioni nella via di segnalazione di Notch portano all'inibizione della proliferazione e dell'auto-mantenimento delle cellule satelliti; la seconda via di segnalazione svolge un ruolo fondamentale durante il differenziamento (Ciciliot and Schiaffino, 2010). Inoltre HGF promuove la migrazione delle cellule satelliti al sito di danno (Chargé and Rudnicki, 2003).

Come HGF, anche il bFGF induce la proliferazione delle cellule satelliti e ne inibisce il differenziamento. Il ruolo del bFGF nel processo rigenerativo rimane ancora da chiarire. Esistono nove isoforme del fattore di crescita, bFGF<sub>1-9</sub>. bFGF-1, -2, -4, -6 e -9 stimolano la proliferazione cellulare, mentre bFGF-5, -7, -8 non mostrano effetti mitogenici (Hawke and Garry, 2001). È stato dimostrato che nei topi *knock-out* per l'isoforma 6, caratteristica del muscolo scheletrico, l'attività proliferativa delle cellule satelliti è inferiore ed il processo rigenerativo risulta compromesso (Floss et al., 1997). Viceversa, altri studi presenti in letteratura mostrano che la mancata espressione del bFGF-6 non comporta alcuna alterazione della riparazione del tessuto danneggiato (Fiore et al., 2000). È probabile che queste apparenti contraddizioni siano dovute alla ridondanza di funzione delle isoforme del bFGF, che quindi si compensano a vicenda. La trasduzione del segnale del bFGF è mediata dalla via delle MAPK e tale via di segnalazione, però, non sembra essere coinvolta nell'inibizione del differenziamento cellulare indotto dal bFGF (Hawke and Garry, 2001).

Non sempre i fattori di crescita agiscono promuovendo il processo rigenerativo, ma possono anche esercitare un effetto opposto, come la miostatina ed il TGF- $\beta$ 1 (Doumit et al., 1993).

Il TGF- $\beta$ 1 è coinvolto nella formazione del tessuto fibrotico, che da una parte funziona da “supporto” per le miofibre danneggiate, dall'altra, in caso di formazione eccessiva, può compromettere la rigenerazione, impedendo anche la formazione di nuove giunzioni neuromuscolari. Il TGF- $\beta$ 1 stimola la produzione della matrice extracellulare e sembra indurre il differenziamento delle cellule satelliti a miofibroblasti, che contribuiscono alla formazione del tessuto fibrotico (Doumit et al., 1993).

La miostatina è un membro della superfamiglia del TGF- $\beta$  e funziona da regolatore negativo della crescita del muscolo scheletrico. È stato dimostrato che nei mioblasti C2C12 la miostatina promuove l'arresto del ciclo cellulare bloccando la transizione G<sub>1</sub>-S mediante l'aumento del livello di espressione di p21, inibitore delle chinasi ciclina-dipendente, e la riduzione dell'espressione di Cdk2, chinasi ciclina-dipendente coinvolta nel controllo della progressione della cellula dalla fase G<sub>1</sub> alla fase S (Thomas et al., 2000).

I fattori molecolari che caratterizzano il microambiente tipico del tessuto muscolare lesionato non sono rilasciati esclusivamente dalle cellule della risposta infiammatoria; le cellule miogeniche stesse possono secernere fattori di crescita, citochine, prostanoidi che contribuiscono al processo di rigenerazione. Le cellule satelliti e le miofibre partecipano attivamente alla modulazione della risposta infiammatoria in maniera antitetica. Infatti, il

NO rilasciato dalle miofibre inibisce l'espressione di proteine di adesione necessarie per l'interazione dei leucociti con le cellule endoteliali, riducendo di conseguenza l'extravasazione, mentre le cellule satelliti rilasciano fattori chemoattrattanti, quali MCP-1 (proteina chemoattrattante monocitaria-1), VEGF (fattore di crescita dell'endotelio vascolare), MDC (chemochina derivata dai macrofagi), che, in particolare, favoriscono il reclutamento dei macrofagi (Tidball, 2005).

Le cellule satelliti, e in particolare una conoscenza dettagliata dei meccanismi che regolano il processo di rigenerazione muscolare, rivestono un grande interesse per le loro potenzialità applicative. La capacità di queste cellule di rigenerare il tessuto muscolare danneggiato ha portato ad ipotizzare un loro utilizzo in campo terapeutico, nel trattamento di patologie degenerative della muscolatura scheletrica, quali le distrofie muscolari, malattie eterogenee dal punto di vista clinico e molecolare, caratterizzate dall'atrofizzazione dei muscoli scheletrici che compromette la mobilità del paziente.

## **2. SFINGOSINA 1-FOSFATO (S1P)**

S1P è un lipide biologicamente attivo che riveste un ruolo fondamentale nella regolazione di molti processi biologici essenziali, quali la crescita cellulare e la sopravvivenza, la regolazione della motilità cellulare e dell'invasività, l'angiogenesi e la maturazione vascolare, in molti tipi cellulari di vari organismi. Inoltre l'aumento della produzione di S1P è implicato in diversi processi patologici come il cancro, le allergie, l'aterosclerosi e le malattie autoimmuni.

La principale riserva di S1P extracellulare è il sangue ed esiste un gradiente di concentrazione di S1P significativo tra il plasma e i fluidi interstiziali: il livello di S1P nei tessuti è generalmente basso (Kim et al., 2009) mentre nel plasma la concentrazione di S1P è molto più alta (nell'ordine di nM). Tale gradiente di concentrazione risulta particolarmente importante per la regolazione dell'ingresso delle cellule del sistema immunitario nel sistema circolatorio e linfatico.

S1P è sintetizzata in molti tipi cellulari, in particolare a livello delle piastrine responsabili, insieme agli eritrociti, del rilascio del lipide bioattivo in circolo, dove la concentrazione si stima intorno a 0.1  $\mu\text{mol/L}$  nel plasma e 1-5  $\mu\text{mol/L}$  nel siero. Eritrociti e piastrine sono privi degli enzimi responsabili della degradazione di S1P (Yatomi et al., 2001). Anche monociti, mastociti, cellule endoteliali rilasciano lo sfingolipide nel sangue (Yang et al.,

1999).

La quota di molecola biologicamente attiva sembra essere tuttavia ridotta dal momento che S1P ha un'emivita breve nei fluidi extracellulari e che, nel sangue, essa è legata a varie componenti del plasma, quali l'albumina ed altre proteine oppure particelle lipoproteiche (Aoki et al., 2005), in particolare le lipoproteine ad alta densità (HDL) (Kim et al., 2009). Se da un lato l'interazione con le lipoproteine riduce l'effettiva concentrazione di S1P bioattiva e quindi l'attivazione completa dei recettori di membrana per S1P, dall'altro è stato osservato che l'emivita dello sfingolipide associato alle HDL risulta quattro volte maggiore dello stesso associato all'albumina (Kim et al., 2009). Questo permette di ipotizzare che il legame con le HDL possa proteggere S1P dalla degradazione, fornire una riserva stabile di S1P nel sangue e modularne il rilascio ai recettori specifici.

## 2.1 SFINGOSINA CHINASI

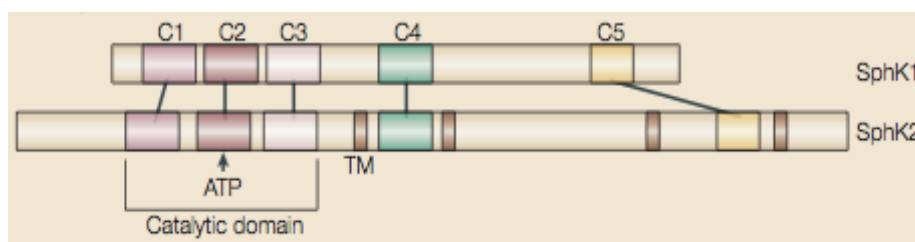
I livelli intracellulari di S1P sono finemente modulati: ciò avviene attraverso la regolazione degli enzimi della via biosintetica e di quelli della via degradativa. Questo permette alla cellula di mantenere la concentrazione del lipide bioattivo a livelli ottimali e di generarne variazioni spazio-temporali in risposta ad opportuni stimoli (Le Stunff et al., 2004). I livelli di S1P possono essere quindi potenzialmente alterati da tutti quegli stimoli capaci di influenzare l'attività o l'espressione degli enzimi responsabili della sua sintesi e degradazione. In realtà la modulazione del metabolismo, e quindi dei livelli intracellulari di S1P, da parte di agenti extracellulari, è realizzata principalmente attraverso la regolazione dell'attivazione e/o espressione di sfingosina chinasi (SphK). La SphK è una chinasi lipidica che catalizza la fosforilazione del gruppo ossidrilico del carbonio in posizione 1 della sfingosina (Sph), in una reazione che richiede ATP ed un catione divalente, con conseguente formazione di S1P e la concomitante riduzione del contenuto cellulare di ceramide (Pyne and Pyne, 2000). Esistono due isoforme di questo enzima nelle cellule di mammifero: SphK1 e SphK2 (Liu et al., 2002); di queste sono inoltre state descritte diverse varianti di splicing, che differiscono tra loro per la porzione N-terminale. I due isoenzimi differiscono anche per la loro distribuzione spaziale e temporale. Analisi di Western Blotting e PCR quantitativa hanno mostrato che, durante lo sviluppo embrionale del topo, l'espressione di SphK1 raggiunge i livelli massimi al giorno 7 per poi diminuire, mentre i livelli di SphK2 aumentano gradualmente fino al diciassettesimo giorno. In tessuti di topo adulto, l'mRNA codificante SphK1 è maggiormente espresso nel polmone, nel



rene, nel sangue e nella milza; mentre l'mRNA di SphK2 si trova maggiormente espresso nel rene, nel cervello, nel cuore e nel fegato (Alemany et al., 2007).

Le proteine SphK costituiscono una famiglia a sé stante di chinasi lipidiche, in quanto non hanno omologia con altre famiglie di chinasi (Taha et al., 2006). Sono enzimi evolutivamente molto conservati e presentano tra di loro un elevato grado di identità, con l'isoforma 2 che presenta rispetto alla 1 ca. 240 amminoacidi in più, localizzati nella porzione ammino-terminale e nella regione centrale della proteina.

SphK1 e SphK2 presentano cinque domini conservati (C1-C5) (Spiegel and Milstien, 2003). Il dominio catalitico è localizzato entro C1-C3 (Fig. 3). Nel dominio C2 è presente il sito di legame dell'ATP. Dall'analisi del profilo di idropatia della sequenza aminoacidica di SphK1 non è stata evidenziata la presenza di regioni transmembrana (TM), viceversa SphK2 presenta quattro potenziali regioni TM.



**Fig. 3. Motivi strutturali delle due isoforme dell'enzima sfingosina chinasi.**

Inoltre SphK1 ha due sequenze di esporto nucleare (NES), che funzionano in modo cooperativo per la ri-localizzazione dell'enzima dal nucleo al citoplasma. In SphK2 sono state invece identificate sia una sequenza NES (Ding et al., 2007) che una sequenza di localizzazione nucleare (NLS); contiene inoltre un motivo di 9 amminoacidi, simile a quello presente nelle proteine pro-apoptotiche Bcl2 homology domain 3 (BH3)-only, un sottogruppo pro-apoptotico della famiglia di proteine Bcl-2. Le proteine BH3-only, infatti, agiscono a monte della cascata di trasduzione del segnale dell'apoptosi, attivando direttamente o indirettamente Bax e Bak e inducendo la loro oligomerizzazione che porta alla permeabilizzazione della membrana esterna del mitocondrio, al rilascio del citocromo c e all'attivazione delle caspasi (Taha et al., 2006).

Nonostante quindi SphK1 e SphK2 abbiano un elevato grado d'identità e catalizzino la formazione dello stesso prodotto, mostrano diverse proprietà catalitiche, localizzazione subcellulare, diverso profilo di espressione spazio-temporale, differente meccanismo di regolazione (Wattenberg et al., 2006). Tutto questo porta ad ipotizzare che svolgano funzioni cellulari distinte. Effettivamente è stato dimostrato che, sebbene catalizzino la stessa reazione, SphK1 e SphK2 evocano due risposte biologiche opposte: SphK1 promuove la sopravvivenza cellulare e la proliferazione (Olivera et al., 1999), SphK2 induce l'arresto del ciclo cellulare e promuove l'apoptosi (Igarashi et al., 2003). La ragione di questa differenza funzionale va ricercata nella diversa localizzazione subcellulare delle isoforme. Ciò comporta quindi la produzione di S1P in distretti cellulari distinti in cui lo sfingolipide può indurre effetti diversi (Maceyka et al., 2005). Infatti, mentre la SphK1 è localizzata prevalentemente nel citoplasma, e sembra essere la più importante fonte di S1P rilasciata nel mezzo extracellulare (Pitson et al., 2003), SphK2 è principalmente localizzata a livello del reticolo endoplasmatico e nel nucleo (Igarashi et al., 2003). La localizzazione di SphK2 a livello del reticolo endoplasmatico potrebbe giustificare la sua azione pro-apoptotica. Infatti, è proprio a livello di questo organello cellulare che risiedono gli enzimi della via degradativa di S1P, quali sfingosina 1-fosfato fosfatasi (SPP) e la ceramidasi che

convertono S1P, prodotta da SphK2, a Sph e quindi a ceramide, metabolita pro-apoptotico. Secondo recenti evidenze, SphK2 potrebbe promuovere l'arresto del ciclo cellulare ed il processo apoptotico anche indipendentemente dalla produzione di S1P, inibendo direttamente la sintesi di DNA e attivando la via mitocondriale dell'apoptosi. In particolare è stata dimostrata un'associazione tra la localizzazione della SphK2 nel nucleo e l'arresto del ciclo cellulare in fase G<sub>1</sub>/S (Igarashi et al., 2003); l'azione pro-apoptotica della SphK2 potrebbe essere spiegata dalla presenza della sequenza di 9 aminoacidi simile a quella caratteristica delle proteine pro-apoptotiche Bcl2-homology domain (BH3)-only (Liu et al., 2003).

Recentemente è stato dimostrato che SphK2 nel nucleo interagisce con il complesso istone H3-istone deacetilasi (HDAC)1/2. La S1P prodotta in prossimità di questi complessi agisce inibendo le HDAC1/2 e di conseguenza impedisce la deacetilazione degli istoni promuovendo la trascrizione del gene che codifica p21, inibitore delle chinasi ciclina-dipendenti, evento che contribuisce a spiegare i meccanismi con i quali la SphK2 induce l'arresto del ciclo cellulare (Pitson, 2010).

Nonostante queste differenze, le funzioni di SphK1 e SphK2 sono almeno parzialmente ridondanti, in quanto è stato osservato che topi mancanti di una delle due isoforme mantengono livelli di S1P vicini a quelli normali e non mostrano fenotipi particolari. Invece, topi *knock-out* per entrambi gli isoenzimi muoiono durante lo sviluppo embrionale, a causa di un'incompleta maturazione del sistema vascolare e del cervello (Fyrst and Saba, 2010).

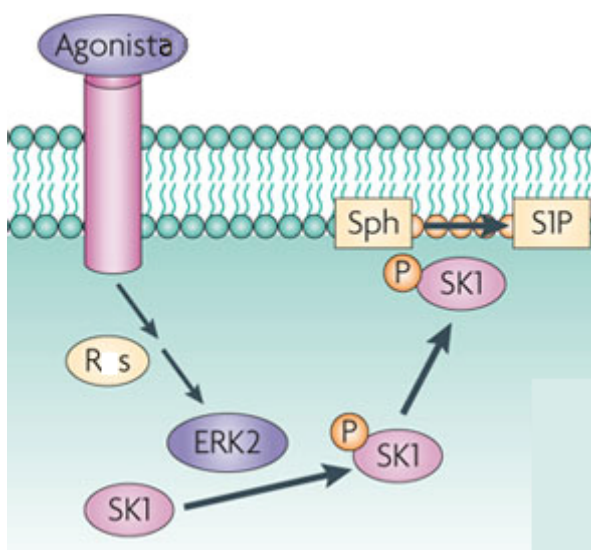
La regolazione della SphK è un evento fondamentale nella modulazione dei livelli intracellulari di S1P, e quindi dei suoi effetti biologici. L'attivazione di SphK1 può essere indotta da una vasta gamma di fattori di crescita tra cui il PDGF (fattore di crescita derivato dalle piastrine), il VEGF, l'EGF (fattore di crescita dell'epidermide), HGF, NGF (fattore di crescita dei nervi); varie citochine come il TNF- $\alpha$ , il TGF- $\beta$ ; ormoni, come estrogeni e glucocorticoidi; ligandi per recettori accoppiati a proteine G, tra cui l'acetilcolina, l'acido lisofosfatidico, S1P stessa (Maceyka et al., 2002). Molti di questi stimoli sono in grado di aumentare l'attività dell'enzima mediante meccanismi post-traduzionali, agendo sulla sua localizzazione, sul suo stato di fosforilazione, sulla sua interazione con proteine e fosfolipidi di membrana. Altri stimoli, invece, agiscono preferenzialmente a livello trascrizionale, modulando quindi i livelli intracellulari dell'enzima. Si pensa che questi meccanismi di regolazione della SphK1 agiscano sinergicamente nell'attivazione dell'enzima.

La regolazione della localizzazione della SphK1 rappresenta un meccanismo estremamente importante ai fini dell'attivazione dell'enzima (Spiegel and Milstien, 2003). In seguito a stimolazione, la SphK1, è traslocata dal citosol alla membrana plasmatica o alle membrane interne, dove risiede, per le sue caratteristiche chimico-fisiche, il substrato Sph. La traslocazione a membrana richiede la fosforilazione di SphK. Il TNF- $\alpha$ , gli esteri del forbolo (PMA) stimolano la fosforilazione dell'enzima sul residuo di serina in posizione 225 (Ser225) (Pitson et al., 2003) tramite l'attivazione di MAP-chinasi, in particolare ERK1/2. Tale fosforilazione di per sé non aumenta l'attività catalitica intrinseca dell'enzima, ma piuttosto facilita l'associazione enzima-membrana, processo che porta SphK1 in prossimità di lipidi anionici, principalmente la fosfatidilserina, in grado di stimolarne l'attività (Olivera et al., 1996). La traslocazione, inoltre, è importante non solo 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 (Pitson et al., 2003), evento importante per la chemiotassi in risposta a tale fattore di crescita.

Per quanto riguarda i meccanismi molecolari che mediano la traslocazione di SphK1 dal citosol alla membrana, è stato ipotizzato il coinvolgimento di lipidi anionici di membrana, quali l'acido fosfatidico, che oltre ad indurre l'attivazione di SphK1, possano funzionare da siti di legame della proteina, regolandone la localizzazione a livello della membrana.

I vari meccanismi di regolazione della SphK1 possono agire anche contemporaneamente nell'attivazione dell'enzima. Per esempio la stimolazione dell'attività della SphK1 mediata da alcuni agonisti è dovuta alla fosforilazione della Ser225 che, come già accennato, risulta essenziale per il suo reclutamento al plasmalemma. In particolare i residui di treonina-54 e asparagina-89 (Thr54 e Asn89), localizzati nel putativo dominio di interazione con la membrana, sembrano necessari per favorire l'interazione di SphK1 con specifici target di membrana, tra cui la fosfatidilserina. È stato proposto un modello secondo il quale la fosforilazione di Ser225 causa l'esposizione dei residui aminoacidici Thr54 e Asn89 e/o di altri residui che interagiscono con la fosfatidilserina, favorendo di conseguenza l'associazione di SphK1 alla membrana e la sua localizzazione in prossimità del substrato, in quanto la mutazione della Ser225 ad Ala non impedisce la traslocazione ma semplicemente la riduce. Ad oggi non è ancora stata risolta la struttura di SphK1, di conseguenza non è nota la localizzazione relativa all'interno della proteina di Ser225 e dei due residui che interagiscono con la fosfatidilserina. Nel caso si trovassero in prossimità uno dell'altro si potrebbe ipotizzare che la fosforilazione della serina regoli l'interazione di

Thr e Asn con la membrana tramite interazioni elettrostatiche a corto raggio, invece se si dovessero trovare in regioni lontane della proteina, questo potrebbe significare che la regolazione ad opera della fosforilazione avvenga attraverso cambiamenti conformazionali a lungo raggio. In questo modello, l'attività enzimatica risulterebbe aumentata grazie alla localizzazione di SphK1 in stretto contatto con il suo substrato, Sph, e all'attività stimolatoria della fosfatidilserina (Stahelin et al., 2005). È stato infatti stimato che a pH fisiologico la Sph si trova per il 70% all'interno delle membrana e solo per il 30% è invece solubile.



**Fig. 4. Indirizzamento di SphK1 verso la membrana plasmatica.**

Una conseguenza della traslocazione localizzata dell'enzima a membrana è rappresentata dal fatto che S1P è rilasciata nell'ambiente extracellulare e quindi nelle immediate vicinanze dei recettori di membrana per lo sfingolipide. Ciò potrebbe avere importanti conseguenze nella determinazione degli effetti biologici indotti da S1P.

Un altro meccanismo di regolazione di SphK1 è basato sulla sua esportazione dalla cellula, con conseguente produzione di S1P direttamente nell'ambiente extracellulare (Ancellin et al., 2002).

Oltre alla ri-localizzazione presso la membrana plasmatica, è stato dimostrato che SphK1 è anche in grado di migrare nella regione perinucleare e all'interno del nucleo; in più le due sequenze NES identificate in SphK1 mediano il trasporto della proteina dal nucleo al citoplasma. Così l'indirizzamento fisiologico di SphK verso diverse membrane può facilitare la produzione di S1P nelle vicinanze dei vari effettori.

Meno conosciuto è il meccanismo di regolazione di SphK2. Questa presenta delle differenze nella sua localizzazione a seconda del tipo cellulare e delle condizioni della

cellula: in alcuni tipi cellulari si trova maggiormente nel nucleo, mentre in altri mostra livelli maggiori nel citosol; o ancora può variare la sua localizzazione a seconda del grado di confluenza delle cellule, come nelle COS7, dove mostra alti livelli citosolici a bassa confluenza e maggiori livelli nel nucleo in condizioni di alta confluenza (Igarashi et al., 2003). SphK2 possiede una sequenza NLS che è stato dimostrato essere necessaria e sufficiente per il suo accumulo nel nucleo (Igarashi et al., 2003). È da notare che la localizzazione di SphK2 nel nucleo inibisce la sintesi di DNA (Igarashi et al., 2003), quindi la traslocazione di SphK2 dal citosol al nucleo potrebbe essere un segnale per l'arresto della crescita cellulare.

Recenti evidenze vedono coinvolti nella stimolazione della proteina l'EGF, gli attivatori della PKC, gli esteri del forbole. Tali molecole attivano ERK1/2 MAPK che fosforilano SphK2 sui residui di Ser351 e Thr578 aumentandone l'attività enzimatica. Inoltre sembra che la fosforilazione di SphK2 sia catalizzata anche dalla PKD, evento che regola la localizzazione nucleare della chinasi (Ding et al., 2007).

Per quel che riguarda l'attivazione di SphK ad opera della PKC, numerosi studi dimostrano che tale proteina chinasi attiva SphK in due fasi: con effetti a breve termine, cioè attraverso la traslocazione dell'enzima presso la membrana plasmatica, e con effetti a lungo termine, aumentandone cioè la trascrizione, attraverso la stimolazione dell'attività del suo promotore. È interessante notare che l'effetto a livello trascrizionale, analogamente a quello di traslocazione, appare essere ERK-dipendente.

Un'altra proteina che sembra implicata nella regolazione di SphK è la fosfolipasi D (PLD): in particolare è stato osservato che in cellule non stimolate PLD e SphK1 sono co-localizzate nella regione perinucleare e che questa co-localizzazione aumenta ulteriormente a seguito dell'attivazione di PLD1. In più nello stesso studio è stato dimostrato che SphK1 si lega a uno dei prodotti della PLD ovvero l'acido fosfatidico, che è risultato un attivatore di SphK1 *in vitro*.

È stato osservato che tante proteine interagiscono sia con SphK1 che con SphK2 e ne modulano la funzione all'interno delle cellule. Ad esempio l'attivazione di SphK1 a opera del fattore TNF $\alpha$  richiede l'interazione tra SphK1 e TRAF2 (TNF receptor-associated factor-2) (Alvarez et al., 2010) e gli effetti pro-apoptotici dovuti alla over-espressione di SphK2 sono dovuti alla sua abilità di associarsi con Bcl-xL e comportarsi come una BH3-only protein.

Un altro aspetto importante della regolazione di SphK è costituito dall'influenza della concentrazione di ioni calcio sulla sua attività enzimatica. Molti dati indicano un

coinvolgimento dell'enzima SphK nella mobilitazione di ioni calcio dai depositi intracellulari, in più alcuni studi suggeriscono che le due isoforme di SphK, in particolare SphK1, richieda  $\text{Ca}^{2+}$  per la sua attività catalitica. È stato osservato che SphK1 lega il complesso  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, ma una diretta attivazione dell'enzima ad opera del calcio non è stata ancora dimostrata. È stato proposto che il complesso  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina non stimoli l'attività enzimatica ma piuttosto induca la traslocazione di SphK1 presso la membrana plasmatica. È stato, infatti, osservato che, senza un sito di legame funzionale per  $\text{Ca}^{2+}$ /calmodulina, SphK1 non trasloca verso la membrana a seguito di stimolazione con esteri del forbolo, mentre la sua attività catalitica e il suo stato di fosforilazione rimangono invariate.

Dai dati brevemente presentati risulta evidente come l'enzima SphK, nelle sue due isoforme, e di conseguenza la concentrazione intracellulare e extracellulare di S1P siano finemente modulati: indice dell'importanza di questo metabolita nella regolazione del destino cellulare.

## 2.2 MODALITA' DI AZIONE DI S1P

S1P può agire come secondo messaggero, modulando l'attività di specifici bersagli intracellulari (Spiegel and Merrill, 1996) oppure può funzionare come una molecola di segnalazione autocrina o paracrina (Lee et al., 1998) (Fig. 5). In quest'ultimo caso S1P si lega a recettori di membrana accoppiati a proteine G (GPCR). Affinchè S1P possa agire come agonista extracellulare è necessario che venga esportato fuori dalla cellula. Data la natura polare della testa dello sfingolipide, si suppone che esso non attraversi facilmente la membrana ma richieda l'intervento di specifici trasportatori appartenenti alla famiglia ABCC1 (ATP-Binding Cassette transporter) (Mitra et al., 2006) e Spns2 (transporter spinster homolog 2) (Fukuhara et al., 2012).

Inoltre, in seguito alla secrezione di SphK (Ancellin et al., 2002), sfingomielinasi e ceramidasi (Romiti et al., 2000; Hla, 2001) in forma cataliticamente attiva, S1P può essere prodotta direttamente nell'ambiente extracellulare. Un'ulteriore fonte di S1P nel mezzo extracellulare potrebbe essere rappresentata da un'isoforma di SphK integrata nella membrana plasmatica con il sito catalitico rivolto verso l'ambiente esterno, e capace di agire come ectoenzima (Meacci et al., 2004).

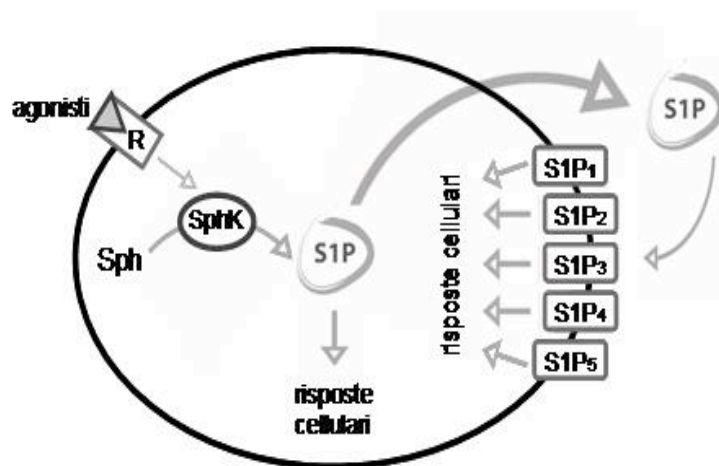


Fig. 5. Azione intracellulare ed extracellulare di S1P.

Sebbene la maggior parte delle funzioni biologiche documentate per S1P siano attribuite all'attivazione di recettori specifici di membrana, è stato dimostrato che lo sfingolipide è in grado di indurre risposte biologiche indipendentemente dall'interazione con i suoi recettori. Le risposte cellulari associate all'azione di S1P come secondo messaggero comprendono la mobilitazione del calcio dalle riserve intracellulari in maniera indipendente dalla formazione di inositolo trisfosfato (Mattie et al., 1994), la proliferazione cellulare e l'inibizione dell'apoptosi (Spiegel and Milstien, 2003). 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.

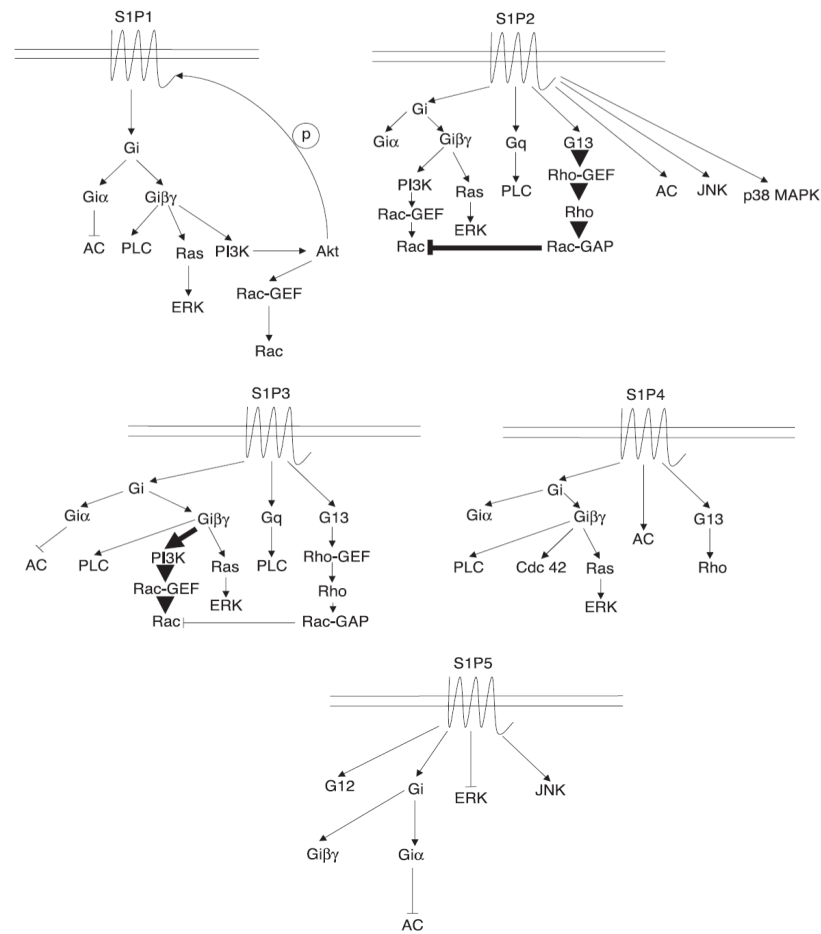
Recentemente sono stati identificati alcuni dei target intracellulari di S1P come secondo messaggero. Oltre a HDAC1/2 già descritto in precedenza, sono stati delineati nuovi bersagli molecolari dello sfingolipide bioattivo quali TRAF2 e proibitina 2 (PHB2). TRAF2, componente chiave nella via di segnalazione Nuclear Factor-KappaB (NF- $\kappa$ B), attivata da TNF- $\alpha$  1/2, è in grado di legare SphK1: S1P è il cofattore mancante per l'attività E3 ubiquitina ligasica di TRAF2. Questi risultati evidenziano che l'asse SphK1/S1P, riveste un ruolo cruciale nell'attivazione della via di segnalazione TNF- $\alpha$ /NF- $\kappa$ B, importante nei processi infiammatori, immunologici e anti-apoptotici (Alvarez et al., 2010).

Recentemente è stata identificata la proteina mitocondriale PHB2 come bersaglio



intracellulare di S1P. Lo sfingolipide prodotto nei mitocondri principalmente dalla SphK2, si lega con elevata affinità e specificità a PHB2, una proteina altamente conservata che regola la funzione mitocondriale. La deplezione della SphK2 o di PHB2 porta ad una alterazione della funzionalità della respirazione mitocondriale. Questi dati dimostrano una nuova azione di S1P nei mitocondri e suggeriscono che la sua interazione con PHB2 sia importante per la respirazione mitocondriale (Spiegel et al., 2011).

La maggior parte degli effetti mediati da S1P sono dovuti alla sua interazione con specifici recettori localizzati sulla membrana plasmatica. I recettori di S1P (S1PRs) finora identificati nelle cellule di mammifero sono cinque. Essi appartengono alla famiglia Edg (Endothelial differentiation gene), recentemente rinominati come S1P<sub>1</sub> (EDG-1), S1P<sub>2</sub> (EDG-5), S1P<sub>3</sub> (EDG-3), S1P<sub>4</sub> (EDG-6), S1P<sub>5</sub> (EDG-8) dalla NC-IUPHAR (Nomenclature Committee of International Union of Pharmacology) (Chun et al., 2002). Si tratta di recettori accoppiati a proteine G e con un'alta affinità per S1P ( $K_d=2-63$  nM). La struttura dei S1PRs consiste di una porzione N-terminale extracellulare, probabilmente glicosilata, sette domini idrofobici transmembrana e di una porzione C-terminale citosolica, coinvolta nell'interazione con specifiche proteine G (Neves et al., 2002). S1P è in grado di evocare diversi processi biologici a seconda del tipo di proteina G con cui il recettore è accoppiato. Nonostante recettori diversi siano accoppiati alle stesse proteine G effettrici, la risposta biologica che inducono può essere diversa. Infatti tali recettori mostrano una “preferenza” per un tipo di proteina G ed attivano con diversa efficacia una stessa via di segnalazione (Fig. 6).



**Fig. 6. Vie di segnalazione attivate da S1P attraverso i suoi recettori.**

Il profilo di espressione dei recettori per S1P è specifico per il tipo cellulare, quindi l'effetto indotto da S1P è cellula-specifico e dipende, di conseguenza, dai livelli relativi dei sottotipi recettoriali espressi dalla cellula stessa. Da tenere presente che la risposta a S1P nell'ambito dello stesso tipo cellulare può variare a seconda del grado di differenziamento, in quanto il profilo di espressione dei recettori varia nel tempo. Questo fenomeno è evidente nella linea cellulare di mioblasti murini C2C12: i mioblasti esprimono i recettori S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub>, con il loro differenziamento a miotubi risulta aumentato il livello di espressione di S1P<sub>3</sub> e diminuito quello di S1P<sub>2</sub> (Meacci et al., 2003).

Lo spegnimento del segnale recettoriale può espletarsi attraverso vie distinte: 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 l'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 a 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.

Il recettore S1P<sub>1</sub> è espresso in vari tipi cellulari, in tutto l'organismo (Liu and Hla, 1997). In cellule over-esprimenti S1P<sub>1</sub>, S1P induce: attivazione di Ras, seguita dall'attivazione di ERK1/2 associata alla promozione della proliferazione cellulare; l'attivazione della fosfolipasi C (PLC), con conseguente aumento dei livelli intracellulari di Ca<sup>2+</sup>, importantissimo mediatore di vari processi cellulari; l'attivazione della PI3K e di Akt, che promuovono la sopravvivenza cellulare attraverso l'inibizione dell'apoptosi. Tutte queste risposte sono sensibili all'azione della tossina della pertosse (PTx), indicando il coinvolgimento della proteina G<sub>i</sub> (Windh et al., 1999). In particolare, questi effetti sono mediati dalla subunità βγ di G<sub>i</sub>, mentre la subunità α inibisce l'adenilato ciclasi (Okamoto et al., 1998; Igarashi and Michel, 2000), con conseguente riduzione dei livelli intracellulari di cAMP.

Lee e collaboratori (2001) hanno dimostrato che la fosforilazione di S1P<sub>1</sub> mediata da Akt è un evento necessario per l'attivazione della proteina monomeric Rac da parte di questo recettore (Lee et al., 1999), che a sua volta promuove l'assemblaggio dell'actina corticale e la migrazione cellulare (Lee et al., 2001).

Il recettore S1P<sub>1</sub> attraverso l'attivazione di queste vie di trasduzione del segnale promuove la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, la riorganizzazione citoscheletrica, la migrazione e la morfogenesi in risposta a S1P in molteplici sistemi cellulari (Lee et al., 2001).

S1P<sub>1</sub> 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 S1P<sub>1</sub> da parte di questo fattore di crescita (Hobson et al., 2001). Il PDGF infatti attiva SphK1, e quindi la produzione di S1P, che fuoriesce dalla cellula e si lega a S1P<sub>1</sub>, attivando così cascate di segnalazione intracellulare che culminano nella modulazione dell'attività di molecole coinvolte nel processo di migrazione cellulare (Rosenfeldt et al., 2001).

Quindi S1P prodotta in seguito alla stimolazione da parte del PDGF, media la risposta cellulare di questo fattore di crescita, tramite attivazione di S1P<sub>1</sub>. Un modello alternativo propone che la transattivazione di S1P<sub>1</sub> non richiederebbe la produzione di S1P ma la formazione di una piattaforma di segnalazione, attraverso l'interazione fisica tra questo recettore e quello per il PDGF (Waters et al., 2003).

Studi *in vivo* condotti su topi *knock-out* per il gene *s1p1* hanno evidenziato il ruolo di S1P

nei processi di sviluppo vascolare e di angiogenesi: infatti topi *s1p1<sup>-/-</sup>* muoiono tra il tredicesimo ed il quattordicesimo giorno dello sviluppo embrionale per emorragia dovuta ad una 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 (Liu et al., 2000). Inoltre S1P<sub>1</sub> risulta essenziale anche nella risposta immunitaria controllando l'uscita dei timociti dal timo e dei linfociti dagli organi linfoidei secondari (Matloubian et al., 2004).

Il recettore S1P<sub>2</sub> è espresso in molti tipi cellulari; è accoppiato alle proteine G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> e G<sub>13</sub> (An et al., 1999). Attraverso la subunità  $\beta\gamma$  di G<sub>i</sub>, S1P<sub>2</sub> attiva ERK1/2, attraverso la subunità  $\alpha$  di G<sub>q</sub> attiva la PLC. Mediante un meccanismo ad oggi sconosciuto, S1P<sub>2</sub> attiva l'adenilato ciclasi (Kon et al., 1999) e le chinasi p38 MAPK e JNK (Gonda et al., 1999). A differenza di S1P<sub>1</sub> che promuove la migrazione cellulare attraverso l'attivazione di Rac, il recettore S1P<sub>2</sub> attiva Rho e viene inibita l'attività di Rac (Okamoto et al., 2000), con conseguente formazione delle fibre da stress e inibizione della migrazione cellulare in risposta a S1P e ad altri chemioattrattanti.

Inoltre a seconda del tipo cellulare, S1P<sub>2</sub> ha effetti opposti sulla proliferazione e sopravvivenza cellulare (An et al., 2000).

Topi *knock-out* per il gene *s1p2* non mostrano gravi anomalie né anatomiche né fisiologiche, fatta eccezione per un'aumentata eccitabilità neuronale, che fa ipotizzare il coinvolgimento di questo sottotipo recettoriale nella regolazione di tale processo (MacLennan et al., 2001). Inoltre poiché S1P<sub>2</sub> è essenziale per un corretto funzionamento dell'udito e del sistema vestibolare, questi topi *knock-out* per il gene *s1p2* risultano avere un udito ridotto o addirittura essere sordi (Herr et al., 2007).

S1P<sub>3</sub>, come S1P<sub>2</sub>, risulta essere ampiamente espresso in vari tipi cellulari ed è accoppiato alle proteine G<sub>i</sub>, G<sub>q</sub> e G<sub>12/13</sub>. G<sub>i</sub> è coinvolta nell'inibizione dell'adenilato ciclasi, nell'attivazione di ERK1/2 a seguito dell'attivazione di Ras, di PI3K; tramite G<sub>q</sub> S1P<sub>3</sub> attiva la PLC. La proteina G<sub>12/13</sub> determina l'attivazione di Rho. Mediante l'attivazione di Rac PI3K-dipendente, S1P<sub>3</sub> favorisce la migrazione cellulare (Lee et al., 1999). Questo recettore regola la riorganizzazione del citoscheletro, l'assemblaggio delle giunzioni aderenti ed il differenziamento morfogenetico (Cheresh et al., 1999). Sono scarsi i dati riguardanti l'effetto della segnalazione di questo recettore sugli eventi di proliferazione e sopravvivenza indotti da S1P.

È interessante notare che S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub>, pur essendo accoppiati alle stesse proteine G, hanno effetti opposti sull'attivazione di Rac e quindi sulla migrazione cellulare. Questo processo

può essere spiegato assumendo che i due recettori mostrino “preferenze” diverse per le proteine G a cui sono associati, attivando perciò preferenzialmente vie di segnalazione distinte.

Topi *knock-out* per il gene *sIp3* non mostrano alcuna anomalia fenotipica (Ishii et al., 2001), in analogia a quanto osservato per S1P<sub>2</sub>. Tuttavia topi omozigoti mancanti di entrambi i recettori S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub>, sono caratterizzati da una marcata mortalità post-natale che sopraggiunge entro la terza settimana (Ishii et al., 2002). Questo dimostra il coinvolgimento di entrambi i recettori nello sviluppo embrionale.

S1P<sub>4</sub> non è un recettore ubiquitario, risulta preferenzialmente espresso a livello delle cellule del sistema ematopoietico (Gräler et al., 1998). Attraverso questo recettore, S1P promuove la sopravvivenza dei linfociti T e B. Ulteriori studi effettuati su linfociti T hanno dimostrato che S1P<sub>4</sub> inibisce la proliferazione di questo tipo cellulare e la produzione di citochine immunostimolanti, mediando così effetti immunosoppressivi anche attraverso la promozione della produzione di citochine immunosoppressive (Wang et al., 2005). Si pensa che il recettore sia accoppiato a proteine G<sub>i</sub>, che sono coinvolte nell'attivazione di ERK1/2 e PLC. È stato dimostrato (Kohno et al., 2003) che S1P<sub>4</sub> promuove l'attivazione di Cdc42, membro della famiglia delle Rho GTPasi, attraverso la subunità βγ di G<sub>i</sub>. S1P<sub>4</sub>, interagendo con G<sub>12/13</sub>, attiva Rho regolando la motilità cellulare. S1P<sub>4</sub> attiva l'adenilato ciclasi, pur non essendo accoppiato alla proteina G<sub>s</sub>.

S1P<sub>5</sub> è localizzato a livello del sistema nervoso centrale (Ishii et al., 2001); in particolare agli oligodendrociti e agli astrociti. Tale recettore è accoppiato a proteine G<sub>i</sub> e G<sub>12/13</sub>.

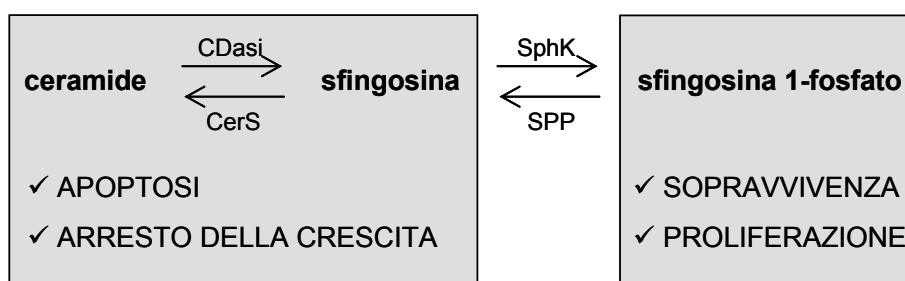
Il suo ruolo rimane ancora in larga parte sconosciuto. Interessante è il ruolo di S1P<sub>5</sub> nell'inibizione di ERK1/2 (Niedernberg et al., 2003), in contrasto con l'azione degli altri sottotipi recettoriali associati all'attivazione di tali MAPK. Quindi, tale recettore risulta in grado di inibire la proliferazione, molto probabilmente tramite il coinvolgimento di una fosfatasi. L'inibizione di ERK1/2 da parte di S1P<sub>5</sub> risulta indipendente dalla proteina G<sub>i</sub>, così come l'attivazione di JNK mediata dallo stesso recettore.

### 2.3 FUNZIONI BIOLOGICHE DI S1P

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

S1P promuove la proliferazione e la sopravvivenza cellulare, inibisce l'apoptosi (Zhang et

al., 1991; Pyne and Pyne, 2000; Hla, 2001). All'opposto, i suoi precursori, il ceramide e la Sph, inducono l'arresto del ciclo cellulare e promuovono l'apoptosi (Hannun and Obeid, 2002). L'interconvertibilità dei metaboliti sfingoidi rende conto del fatto che il destino della cellula dipende non tanto dai livelli assoluti di tali molecole, quanto piuttosto dai loro livelli relativi. Questo modello, noto come “reostato degli sfingolipidi” (Fig. 7), prevede che la modulazione dell'attività degli enzimi coinvolti nella conversione di una molecola sfingoide in un'altra, e cioè ceramidasi, SphK, SPP, determini la sopravvivenza o la morte cellulare. Infatti, la conversione del ceramide e della Sph a S1P determina la formazione di una molecola anti-apoptotica e comporta la riduzione dei livelli relativi intracellulari di molecole ad azione pro-apoptotica, e viceversa.



**Fig. 7. Modello del reostato degli sfingolipidi.**

S1P ha un duplice effetto sulla proliferazione cellulare, stimolandola o inibendola a seconda del tipo cellulare. È stato dimostrato che nei miofibroblasti epatici umani ed epatociti di ratto, il lipide bioattivo ha un effetto anti-proliferativo (Donati et al., 2005; Davaille et al., 2000; Ikeda et al., 2003). L'azione cellula-specifica di S1P dipende probabilmente dai livelli di espressione relativi dei S1PRs nella cellula bersaglio.

S1P ha un ruolo fondamentale nella regolazione del processo apoptotico. L'effetto anti-apoptotico dello sfingolipide riguarda la modulazione dell'attività di MAPK: il lipide bioattivo può in alcuni casi inibire MAPK pro-apoptotiche, come JNK, mentre in altri può attivare MAPK anti-apoptotiche, come ERK1/2 (Xia et al., 1995). Inoltre S1P promuove la sopravvivenza cellulare stimolando l'attivazione di fattori di trascrizione, quali AP-1 e NF- $\kappa$ B (Karin et al., 1997), che regolano l'espressione di geni i cui prodotti sono coinvolti nella regolazione della crescita cellulare e nell'inibizione dell'apoptosi.

È stato anche ipotizzato che l'azione anti-apoptotica di S1P dipenda dalla capacità dello sfingolipide di inibire, direttamente o indirettamente, gli enzimi della via biosintetica del ceramide, la serina palmitoltransferasi o la ceramide sintasi (Van Echten-Decker et al.,

1997).

Inoltre in vari tipi cellulari S1P è un regolatore cruciale della migrazione cellulare, processo chiave in numerosi 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 di fibre da stress. Tali 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 essenzialmente i riarrangiamenti del citoscheletro.

Grazie all'attivazione delle vie di segnalazione a valle dei propri recettori, S1P è capace di modulare l'attività di tali molecole e di regolare la motilità cellulare. Gli effetti dello sfingolipide sulla migrazione sono differenti in base ai sottotipi recettoriali espressi dalla cellula su cui esso agisce e ai loro livelli relativi. Numerosi dati riportati in letteratura che vertono su esperimenti condotti su cellule CHO (Chinese Hamster Ovary) super-esprimenti i diversi sottotipi recettoriali, hanno permesso di dimostrare che i recettori S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> stimolano la migrazione cellulare, mentre il recettore S1P<sub>2</sub> la inibisce (Kon et al., 1999). Analoghi risultati sono stati ottenuti anche su cellule non trasfettate: ad esempio nelle cellule endoteliali, che esprimono più alti livelli di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> rispetto a S1P<sub>2</sub>, S1P ha effetto pro-migratorio (Kimura et al., 2000), mentre nelle cellule della muscolatura liscia, dove predomina l'espressione di S1P<sub>2</sub> lo sfingolipide esercita un'azione anti-migratoria (Tamama et al., 2001).

Nei mioblasti C2C12 S1P, oltre ad esercitare un effetto pro-miogenico, ha anche un'azione anti-migratoria: riduce, infatti, la motilità e abroga completamente la risposta chemiotattica all'IGF-1, un potente chemio-attrattante (Becciolini et al., 2006). Sempre nel medesimo lavoro è stato dimostrato che questa funzione di S1P si esplica tramite il suo legame con S1P<sub>2</sub> e la conseguente attivazione di RhoA. Da questi dati si evince che il rapporto tra i livelli di espressione di S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub> e la loro diversa localizzazione siano fattori critici nel determinare la risposta migratoria di una cellula a S1P.

S1P svolge un'importante funzione a livello del sistema cardiovascolare, promuovendo i processi di vasculogenesi e di angiogenesi. S1P controlla il tono vascolare, inducendo vasostrizione oppure vasodilatazione a seconda che agisca sulle cellule della muscolatura liscia dei vasi o sulle cellule endoteliali. Il lipide bioattivo infatti induce la

contrazione delle cellule muscolari (Bischoff et al., 2000), mentre nelle cellule endoteliali determina l'attivazione dell'enzima NO sintasi, con conseguente rilascio di NO, responsabile della vasodilatazione (Igarashi et al., 2000). Il trattamento con S1P nelle cellule endoteliali induce la fosforilazione PI3K-dipendente di PKB/Akt che fosforila direttamente la NO sintasi delle cellule endoteliali, con conseguente produzione di NO (Morales-Ruiz et al., 2001; Igarashi et al., 2001). Inoltre S1P modula la permeabilità dei vasi, tramite la sua capacità di regolare l'assemblaggio delle giunzioni aderenti tra cellule endoteliali (Lee et al., 1999).

Lo sfingolipide è un potente induttore della sopravvivenza delle cellule endoteliali. In condizioni di deprivazione di fattori di crescita o a seguito del trattamento con ceramide, viene indotta apoptosi caspasi-dipendente. Tutto ciò viene antagonizzato da S1P extracellulare con una via di segnalazione che richiede  $G_i$  e MAPK (Lee et al., 1999).

L'angiogenesi è un meccanismo fisiologico indotto nel wound healing, nella crescita del tessuto e nei processi rigenerativi. Nel caso della riparazione dei tessuti, l'aggregazione piastrinica rilascia fattori di crescita importanti per l'angiogenesi, quali VEGF, PDGF, FGF e S1P (Yatomi et al., 2001). Le cellule endoteliali migrano in una matrice extracellulare di fibrina provvisoria formata nel processo di coagulazione del sangue. È stato assunto che i fattori angiogenici derivati dalle piastrine regolano il processo chemiotattico. Effettivamente S1P è uno dei più potenti induttori della chemiotassi di cellule endoteliali *in vitro* (Paik et al., 2001). Questo processo coinvolge l'attivazione della via di segnalazione PI3K/Akt mediata da  $S1P_1$ , con conseguente fosforilazione dello stesso recettore da parte di Akt, causando induzione di Rac (Lee et al., 2001). S1P è un potente induttore della proliferazione delle cellule endoteliali. Questi dati evidenziano il ruolo di S1P come regolatore importante dell'angiogenesi.

Inoltre il ruolo di S1P nell'angiogenesi e nella vasculogenesi è stato messo in relazione con un altro fattore coinvolto nella regolazione di tali processi: il VEGF. Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di interazioni funzionali tra le vie di segnalazione dello sfingolipide e le vie di segnalazione di VEGF (Endo et al., 2002).

Nel sistema immunitario S1P controlla il traffico dei linfociti e la loro distribuzione nei tessuti, il differenziamento dei sottotipi di linfociti T (Wang et al., 2008). È stato anche proposto che S1P possa controllare il traffico dei linfociti tramite la sua capacità di modulare la permeabilità della barriera endoteliale, regolando l'assemblaggio delle giunzioni cellula-cellula (Garcia et al., 2001; Rosen and Goetzl, 2005). S1P regola inoltre il differenziamento dei timociti e la loro fuoriuscita dal timo (Allende et al., 2004; Rosen et



al., 2003; Rosen and Goetzl, 2005), la risposta chemiotattica dei linfociti a citochine e chemochine (Graeler and Goetzl, 2002; Graeler et al., 2002). Un altro ruolo ben definito di S1P nel sistema immunitario concerne la sua azione sui mastociti. S1P promuove la produzione da parte di linfociti delle 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, la loro degranulazione con rilascio dei mediatori responsabili della reazione allergica (Baumruker and Prieschl, 2000; Jolly et al., 2004).

S1P stimola la migrazione delle cellule T che esprimono S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>4</sub>. L'attivazione delle cellule T sopprime l'espressione di entrambi i recettori con conseguente annullamento della chemiotassi indotta da S1P (Graeler and Goetzl, 2002).

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 (Brinkmann et al., 2001; Brinkmann and Lynch, 2002) è substrato della SphK2. La forma fosforilata di FTY720 (FTY720-P) agisce come potente agonista di tutti i recettori per S1P ad eccezione di S1P<sub>2</sub> (Brinkmann et al., 2002; Mandala et al., 2002). FTY720 agisce come immunosoppressore grazie alla sua capacità di alterare il traffico dei linfociti, inducendo linfopenia ed inibendo di conseguenza la risposta immunitaria cellulo-mediata (Brinkmann et al., 2001). Questo viene realizzato tramite due meccanismi: il farmaco da un lato induce il processo di *homing* dei linfociti, cioè il loro ritorno dal sangue agli organi linfoidei secondari, dall'altro ne inibisce l'uscita dal timo e dai linfonodi verso il sangue (Yagi et al., 2000; Chiba et al., 1998). È stato dimostrato che l'alterazione del traffico di linfociti provocata dal farmaco è dovuta alla conseguente internalizzazione, seguita da degradazione, del recettore S1P<sub>1</sub> necessario per l'uscita dei linfociti dal timo e dai linfonodi (Matloubian et al., 2004).

S1P risulta coinvolta anche nell'infiammazione. Varie citochine pro-infiammatorie infatti stimolano SphK, e quindi la produzione di S1P, che a sua volta induce la produzione di numerosi mediatori della flogosi, quali le prostaglandine (Hla, 2004; Chalfant and Spiegel, 2005).

Lo sfingolipide, inoltre, riveste un ruolo importante nella regolazione dell'omeostasi del Ca<sup>2+</sup>. In maniera indipendente dall'inositolo trisfosfato, S1P, con modalità di secondo messaggero, induce la mobilitazione del calcio dalle riserve intracellulari (Mattie et al., 1994). Stimoli esterni, quali l'EGF, possono regolare l'omeostasi del calcio senza attivare

la PLC, ma stimolando la SphK (Meyer zu Heringdorf et al., 1999). Inoltre, la conversione a S1P, catalizzata dalla SphK, porta ad una diminuzione dei livelli di Sph determinando un influsso di calcio nella cellula. Questo è dovuto al fatto che la Sph blocca la corrente di calcio attivata dal rilascio di calcio dalle riserve intracellulari, che risulta importante per il riaccumulo di questo ione nel reticolo endoplasmatico (Mathes et al., 1998).

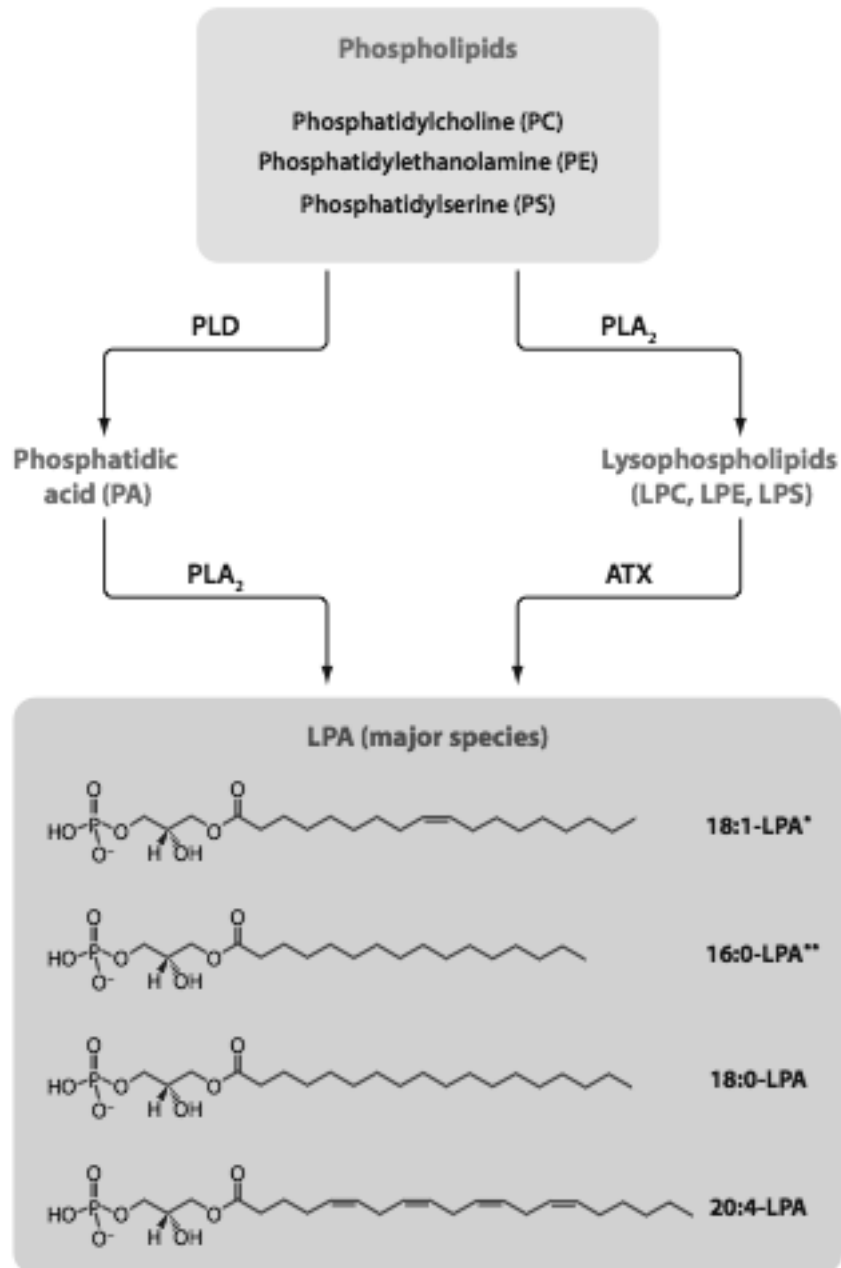
S1P può regolare l'omeostasi del calcio anche attraverso i propri recettori di membrana che attivano la PLC.

### 3. ACIDO LISOFOSFATIDICO (LPA)

L'acido lisofosfatidico (LPA) è un lisofosfolipide anfipatico noto come prodotto della sintesi dei lipidi ma recentemente riconosciuto come un'importante molecola segnalatoria. La sua struttura consiste in una molecola di glicerolo, alla quale sono legati un acido grasso e un gruppo fosfato, rispettivamente in posizione 1 e 3. La forma di LPA a cui si fa riferimento quando si parla del lipide bioattivo è la 1-acil-2-idrossi-*sn*-glicerolo-3-fosfato, sebbene ne esistano altre come ad esempio 1-alchil- o 2-acil-LPA (Aoki, 2004). La lunghezza della catena acilica e il grado di saturazione variano considerevolmente e dipendono dal fosfolipide precursore. Per esempio la 1-palmitoil-fosfatidilcolina viene metabolizzata a 1-palmitoil-LPA (16:0-LPA). Le forme di LPA più abbondanti nel plasma umano sono 16:0-, 18:2-, e 18:1-LPA (Sano et al., 2002). Il 18:1-LPA è il più utilizzato in laboratorio per studi di trasduzione del segnale.

LPA è presente in tutte le cellule e i tessuti di mammifero, incluso il sangue, dove le concentrazioni nel plasma variano da 0.1 a 1  $\mu\text{M}$ , mentre nel siero possono superare 10  $\mu\text{M}$ . Nel siero il lisofosfolipide risulta legato all'albumina, a lipoproteine a bassa densità o altre proteine, che presumibilmente proteggono il lipide dalla rapida degradazione.

Ci sono due vie principali per la produzione di LPA a partire dai fosfolipidi di membrana: (a) tramite l'attività sequenziale di PLD e fosfolipasi A2 (PLA2) e (b) tramite l'attività sequenziale di PLA2 e lisofosfolipasi D (lysoPLD) (Fig. 8). Il gene *Enpp2* codifica per la proteina atassina (ATX) la quale ha attività lysoPLD (Umezo-Goto et al., 2002; Tokumura et al., 2002). È interessante notare che inizialmente ATX è stata identificata come un fattore stimolante la motilità di cellule cancerose (Stracke et al., 1992), l'invasione e l'angiogenesi, attraverso un meccanismo sensibile alla PTx (Lee et al., 2002; Nam et al., 2001), effetti biologici originariamente attribuiti alla sua presunta attività nucleotidica fosfodiesterasica (Murata et al., 1994). Recentemente è stato dimostrato che l'effetto promigratorio di ATX sulle cellule tumorali è il risultato di un signaling autocrino di LPA prodotto dall'enzima stesso. Topi *Enpp2*<sup>-/-</sup> muoiono al 9,5 giorno di gestazione per difetti vascolari e a carico del tubo neurale. Topi eterozigoti *Enpp2*<sup>+/-</sup> sopravvivono fino all'età adulta, ma hanno livelli plasmatici di LPA pari alla metà di quelli dei topi *wild-type*, confermando che l'attività dell'ATX è la principale fonte di LPA plasmatico e che questo lisofosfolipide è essenziale per lo sviluppo.



**Fig. 8. Metabolismo di LPA**

\*18:1-LPA è il tipo più comunemente utilizzato come agonista in laboratorio per l'attivazione dei LPARs;

\*\*16:0-LPA è la specie più abbondante nel plasma umano

A livello di mitocondri e microsomi, quindi all'interno della cellula, LPA è prodotto a partire da glicerolo 3-fosfato e acil-CoA grazie all'enzima glicerofosfato acil-transferasi, dal monoacilglicerolo tramite la monoacilglicerolo chinasi (Vancura et al., 1991; Simpson et al., 1991).

L'idrolisi degli acidi grassi a livello della posizione *sn-1* da parte di PLA1 o in posizione *sn-2* da parte di PLA2 genera LPA a partire dall'acido fosfatidico (PA). Si crede che questa via sia principalmente intracellulare o avvenga sulla membrana plasmatica in quanto sede del PA.

Le piastrine e, in piccole quantità, anche le cellule rosse del sangue sono fonti di LPA (Aoki et al., 2002; Eichholtz et al., 1993). La produzione di LPA nel plasma da parte delle piastrine prevede il rilascio da questo tipo cellulare di PLA1 e PLA2 (Sano et al., 2002), che generano un pool *de novo* di lisofosfolipidi nel plasma, principalmente lisofosfatidilcolina (LPC) la quale viene ulteriormente metabolizzata dalla lysoPLD. Quindi il vero step limitante la generazione di LPA non è l'enzima costitutivamente presente nel plasma, la lysoPLD, ma il rilascio di PLA1 e PLA2 e la generazione *de novo* di un pool di lisofosfolipidi.

La PLA2 di tipo II o secretoria, è implicata nella produzione di LPA da microvescicole prodotte da cellule infiammatorie. Queste vescicole hanno un'asimmetria di membrana alterata che porta all'accumulo di PA nel lato esterno della membrana plasmatica (Fourcade et al., 1995). Sempre Fourcade e collaboratori suggeriscono che la PLA2 secretoria, rilasciata da cellule stimulate con IL-1 $\beta$  o TNF $\alpha$ , potrebbe partecipare al rilascio di acido arachidonico e LPA dal lato esterno delle microvescicole.

La degradazione di LPA coinvolge più categorie differenti di enzimi, inclusi LPA-aciltrasferasi (LPAAT), lipide fosfato fosfatasi (LPP) e lisofosfolipasi. LPA può di nuovo essere convertito a PA grazie al trasferimento di un gruppo acilico da acil-CoA su LPA formando PA, reazione catalizzata da LPAAT, idrolizzato da LPP-1, 2 e 3, o convertito a glicerolo-3-fosfato dalla lisofosfolipasi (Lin et al., 2010).

La disponibilità di LPA è regolata dall'azione delle LPP i cui siti attivi sono localizzati sulla superficie esterna delle membrane plasmatiche o verso il lato luminale delle membrane interne (Brindley et al., 2009). LPP associate alle membrane plasmatiche sono ecto-enzimi attivi anche su SIP, quindi partecipano al controllo della sua disponibilità nel mezzo extracellulare (Peest et al., 2008).

### **3.1 MODALITA' D'AZIONE DI LPA**

LPA è in grado di evocare numerose risposte biologiche mediate da recettori accoppiati a proteine G. A causa dell'eterogeneità dei sottotipi recettoriali, dei livelli di espressione e delle vie effettrici, LPA regola molti processi cellulari quali la proliferazione, la sopravvivenza, i cambiamenti citoscheletrici, il flusso di calcio.

L'azione segnalatoria di LPA è stata riconosciuta negli anni Sessanta, per la sua capacità di indurre una risposta mediata dall'incremento di calcio nelle cellule della muscolatura liscia. Questo meccanismo di trasmissione del segnale è stato messo in evidenza per la

prima volta da Jalink e collaboratori, dimostrando che LPA induce il rilascio del calcio intracellulare e riduce la quantità di cAMP. Questi effetti sono annullati in presenza della PTx, suggerendo il coinvolgimento di  $G_{\alpha i}$ . Oltre a  $G_{\alpha i}$ , è stato proposto in seguito che il rilascio di calcio intracellulare sia mediato da  $G_{\alpha q}$  e l'attivazione di Rho da  $G_{\alpha 12/13}$  (Swarthout et al., 2000).

Nei decenni successivi, numerosi studi hanno evidenziato il ruolo di LPA come molecola di segnalazione. Il primo meccanismo molecolare è stato riportato nel 1996 con la clonazione del primo recettore di LPA (Hecht et al., 1996),  $LPA_1$ . Si tratta di un recettore accoppiato a proteine G eterotrimeriche ( $G_i$ ,  $G_q$ ,  $G_{12/13}$ ) e può provocare, se attivato da LPA, numerose risposte cellulari quali proliferazione, sopravvivenza, migrazione e riarrangiamenti citoscheletrici, mobilitazione di  $Ca^{2+}$ , attivazione di SRE (elemento di risposta al siero), MAPK, PLC, Akt e Rho, inibizione dell'adenilato ciclasi (Fukushima et al., 2001; Ishii et al., 2004; Contos et al., 2000). Nel topo adulto, l'mRNA codificante questa isoforma recettoriale è maggiormente espresso a livello di cervello, utero, testicolo, polmone, intestino tenue, cuore, stomaco, reni, milza, timo, placenta e muscolo scheletrico (Contos et al., 2000; Ye, 2008).

Topi  $Lpar1^{-/-}$  mostrano il 50% di mortalità perinatale in un background genetico misto (C57BL/6J x 129) e una ridotta sopravvivenza in un background genetico puro (C57BL/6J o Balb/cByJ) (J. Chun, osservazioni non pubblicate). I sopravvissuti mostrano una dimensione del corpo ridotta, dismorfismi cranio-facciali e aumentata apoptosi delle cellule di Schwann del nervo sciatico (Contos et al., 2000; Contos et al., 2000; Weiner et al., 2001), dimostrando il ruolo pro-survival di LPA in questo tipo cellulare. Il meccanismo di segnalazione che sta alla base della sopravvivenza cellulare coinvolge il recettore  $LPA_1$  e la proteina  $G_i$  che attiva PI3K tramite la subunità  $\beta\gamma$ . PI3K fosforila Akt che inibisce l'apoptosi tramite fosforilazione di Bad, membro pro-apoptotico della famiglia Bcl-2. Li e collaboratori (2003) hanno identificato un meccanismo di trasduzione del segnale differente, dimostrando l'attivazione PI3K dipendente di ERK1/2 contemporaneamente alla debole attivazione di Akt. Tramite l'utilizzo dell'inibitore di MEK (p42/p44 MAPK-activating MAPK kinase), PD98059, la sopravvivenza cellulare mediata da LPA risulta inibita, verificando che il lisofosfolipide media questo effetto biologico nelle cellule di Schwann tramite la via  $G_i$ /PI3K/MEK/ERK1/2 (Li et al., 2003).

Una piccola percentuale di embrioni  $Lpar1^{-/-}$  hanno esencefalia (~ 5%) o emorragia frontale cefalica (~ 2,5%). La perdita delle risposte biologiche indotte da LPA nei neuroblasti e fibroblasti embrionali dimostra funzioni non ridondanti di *Lpar1* *in vivo*

(Contos et al., 2000; Contos et al., 2002).

In base all'omologia di sequenza, furono presto identificati altri due recettori del lisofosfolipide: LPA<sub>2</sub> e LPA<sub>3</sub>.

Nel topo adulto l'mRNA che codifica per LPA<sub>2</sub> è maggiormente espresso a livello di rene, utero e testicolo, moderatamente espresso nel polmone mentre stomaco, milza, timo, cervello e cuore sono caratterizzati da bassi livelli di espressione di questo recettore (Contos et al., 2000). Nelle cellule tumorali è stata rilevata un'espressione aberrante di *LPAR2*, avvalorando l'ipotesi di un coinvolgimento di LPA<sub>2</sub> nella tumorigenesi.

LPA<sub>2</sub> è accoppiato alle proteine G eterotrimeriche G<sub>ai/o</sub>, G<sub>a11/q</sub>, e G<sub>a12/13</sub> trasducendo segnali attraverso effettori quali Ras, MAPK, PI3K, Rac, PLC, diacilglicerolo e Rho (Contos et al., 2000). L'attivazione di LPA<sub>2</sub> è generalmente associata a processi cellulari quali la sopravvivenza (Goetzl et al., 1999; Deng et al., 2002) e la migrazione cellulare (Zheng et al., 2001; Zheng et al., 2000; Panchatcharam et al., 2008).

Numerosi studi hanno dimostrato l'esistenza di un'interazione tra LPA<sub>2</sub> e altre vie di segnalazione. Per esempio, LPA<sub>2</sub> promuove la migrazione cellulare attraverso interazioni con la molecola di adesione focale TRIP6 (Lai et al., 2005; Lai et al., 2007). Inoltre è stato dimostrato che varie proteine PDZ e Zinc finger interagiscono direttamente con la porzione carbossi-terminale di LPA<sub>2</sub> (Lin et al., 2008). Questo recettore può anche indurre effetti inibitori sulla migrazione EGF dipendente e sull'invasione delle cellule tumorali pancreatiche attraverso l'attivazione della via di segnalazione G<sub>a12/13</sub>/Rho (Komachi et al., 2009).

Topi *Lpar2*<sup>-/-</sup> sono vitali, normali mentre topi omozigoti mancanti di entrambi i recettori LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>2</sub> non mostrano anomalie fenotipiche aggiuntive rispetto a quelle attribuibili a *Lpar1*<sup>-/-</sup>, eccetto che una maggior incidenza di emorragie frontali cefaliche (Contos et al., 2000; Contos et al., 2002). Inoltre, fibroblasti primari e cellule embrionali corticali derivanti da topi *Lpar1*<sup>-/-</sup>/*Lpar2*<sup>-/-</sup> mostrano una notevole riduzione o addirittura assenza delle risposte biologiche indotte da LPA esogeno (Contos et al., 2002; Kingsbury et al., 2003), quali proliferazione cellulare, attivazione di PLC, mobilitazione di Ca<sup>2+</sup>, attivazione di Akt e JNK, formazione di fibre da stress. Tutti questi effetti sono parzialmente alterati nei fibroblasti murini embrionali *Lpar1*<sup>-/-</sup> o *Lpar2*<sup>-/-</sup>, indicando che LPA<sub>2</sub> contribuisce agli effetti mediate da LPA in alcuni tipi cellulari (Contos et al., 2002).

Il recettore LPA<sub>3</sub> è espresso in numerosi tessuti quali cuore, testicolo, prostata, pancreas, polmone, ovaio, cervello (Bandoh et al., 1999; Im et al., 2000) rene, intestino tenue, stomaco, milza, e timo (Contos et al., 2000). È interessante notare che, a livello dell'utero

murino l'mRNA che codifica per questo recettore è esclusivamente espresso nell'endometrio durante la finestra di impianto (Ye et al., 2005) e che la sua espressione è regolata da estrogeni e progesterone (Hama et al., 2006).

Come LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>2</sub>, anche LPA<sub>3</sub> è associato a proteine G eterotrimeriche quali G<sub>ai/o</sub> e G<sub>aq</sub>, mediando l'attivazione della PLC, la mobilizzazione di Ca<sup>2+</sup> e l'attivazione di MAPK (Ishii et al., 2000). Tuttavia, LPA<sub>3</sub> non è accoppiato con la proteina G<sub>α12/13</sub> e pertanto non regola l'arrotondamento delle cellule neuronali per il quale sono coinvolti G<sub>α12/13</sub> e Rho (Ishii et al., 2000).

Topi *Lpar3*<sup>-/-</sup> sono vitali e fenotipicamente normali ma le femmine *Lpar3*<sup>-/-</sup> mostrano alterazioni a carico del sistema riproduttivo (Ye et al., 2005). Sebbene LPA<sub>3</sub> sia espresso a livello della corteccia frontale, nell'ippocampo e nell'amigdala (Bandoh et al., 1999; Im et al., 2000), non sono stati descritti alterazioni a carico del sistema nervoso legate alla perdita di questo recettore.

Altri due GPCR (con sequenze meno simili a quelle precedenti) hanno dimostrato di rispondere in modo specifico a LPA: LPA<sub>4</sub>/P2Y9/GPR23 e LPA<sub>5</sub>/GPR92.

LPA<sub>4</sub> è maggiormente correlato ai recettori purinergici, mentre condivide solo il 20-24% dell'identità aminoacidica con LPA<sub>1-3</sub>. Questo recettore è espresso in tutti i tessuti, in particolar modo nell'ovaio (Noguchi et al., 2003).

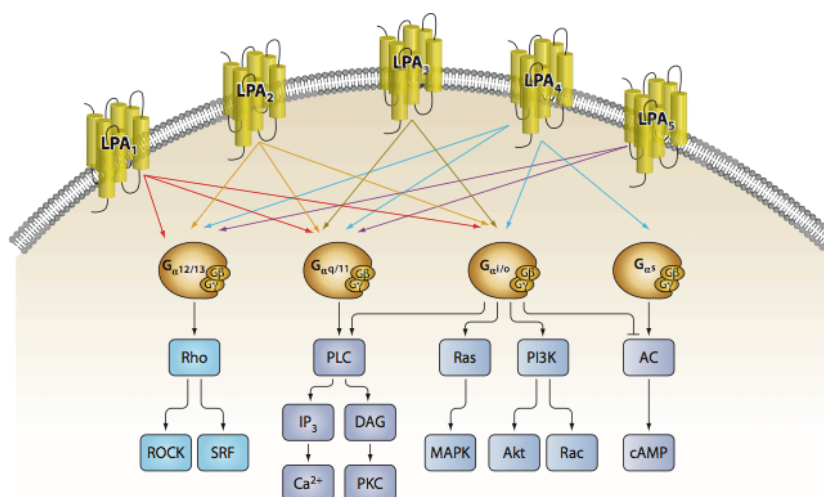
In cellule over-esprimenti LPA<sub>4</sub>, LPA induce cambiamenti morfologici quali l'arrotondamento cellulare e la formazione di fibre da stress attraverso le vie di segnalazione G<sub>α12/13</sub> e Rho/Rho-chinasi (Lee et al., 2007; Yanagida et al., 2007), come osservato anche in cellule over-esprimenti LPA<sub>1</sub>, LPA<sub>2</sub> e LPA<sub>5</sub>. Inoltre sempre in cellule over-esprimenti LPA<sub>4</sub> si osserva aggregazione cellulare mediata da Rho-chinasi e adesione cellulare N-caderina dipendente (Yanagida et al., 2007). LPA induce accumulo di cAMP intracellulare attraverso G<sub>αs</sub> e la mobilizzazione di Ca<sup>2+</sup> tramite G<sub>αq/11</sub> e G<sub>ai</sub> (Lee et al., 2007; Yanagida et al., 2007). È interessante notare che l'accoppiamento con la proteina G<sub>αs</sub> non viene riportato per i classici LPARs.

Topi *Lpar4*<sup>-/-</sup> non presentano apparentemente alcuna anormalità (Lee et al., 2008). Tuttavia, LPA<sub>4</sub> ha un effetto inibitorio sulla motilità cellulare in quanto la sua assenza aumenta la risposta migratoria dei fibroblasti a LPA; l'espressione eterologa di LPA<sub>4</sub> sopprime la migrazione LPA<sub>1</sub>-dipendente delle cellule B103 e l'invasione mediata da LPA di cellule tumorali di colon (Lee et al., 2008).

LPA<sub>5</sub> condivide invece circa il 35% d'identità con LPA<sub>4</sub>. LPA<sub>5</sub> è espresso in vari tessuti quali cervello embrionale, intestino tenue, pelle, milza, stomaco, timo, polmone, cuore,



fegato e in cellule staminali embrionali (Kotarsky et al., 2006; Lee et al., 2006). LPA induce retrazione dei neuriti e la formazione di fibre da stress in cellule over-esprimenti LPA<sub>5</sub> mediante la proteina G<sub>α12/13</sub> mentre aumenta i livelli di calcio intracellulare mediante attivazione della proteina G<sub>αq</sub> (Lee et al., 2006). Inoltre sempre in cellule over-esprimenti LPA<sub>5</sub> il lisofosfolipide aumenta i livelli di cAMP e la produzione di inositolo fosfato (Kotarsky et al., 2006; Lee et al., 2006). Recentemente, altre due molecole derivate da lipidi (farnesil pirofosfato e N-arachidonilglicina) sono state identificate come ligandi di LPA<sub>5</sub> (Oh et al., 2008). Il farnesil-pirofosfato attiva vie di segnalazione mediate da G<sub>αq/11</sub> e G<sub>αs</sub> mentre N-arachidonilglicina è in grado di attivare solo il signaling mediato da G<sub>αq/11</sub>. È stato suggerito che tali agonisti interagiscono in modo diverso con LPA<sub>5</sub> (Oh et al., 2008).



**Fig. 9. LPARs e vie di segnalazione.**

Recentemente altre tre molecole sono state proposte come recettori di LPA: GPR87, P2Y5 e P2Y10 (Murakami et al., 2008; Pasternack et al., 2008; Shimomura et al., 2008; Tabata et al., 2007). Ognuno di questi appartiene alla famiglia dei recettori purinergici e presentano omologia di sequenza con LPA<sub>4</sub> e LPA<sub>5</sub> piuttosto che con LPA<sub>1-3</sub>. Di questi, P2Y5 è stato recentemente proposto come LPA<sub>6</sub>. P2Y5 è stato identificato come un mediatore fondamentale per la crescita dei capelli umani ed è un gene che causa una rara forma familiare di perdita di capelli nell'uomo (Pasternack et al., 2008; Shimomura et al., 2008). Studi recenti hanno verificato che l'attivazione di LPA<sub>6</sub> da parte del lisofosfolipide avviene a concentrazioni insolitamente elevate [ $EC_{50}$  nell'ordine del basso micromolare (Yanagida et al., 2009)]. Per questo motivo si ritiene che P2Y5 sia un recettore a bassa affinità per LPA, distinto da LPA<sub>1-5</sub> (Yanagida et al., 2009).

GPR87 e P2Y10 sono coinvolti nella mobilizzazione intracellulare di  $Ca^{2+}$  utilizzando un

sistema di fusione di  $G_{\alpha 16}$  (Murakami et al., 2008; Tabata et al., 2007). P2Y10- $G_{\alpha 16}$  può indurre transienti aumenti di  $Ca^{2+}$  oltre che da parte di LPA anche da parte di S1P ( $EC_{50} = 130$  nM e 53 nM, rispettivamente) (Murakami et al., 2008). Tuttavia sono necessari ulteriori studi volti a confermare questi candidati come LPARs.

Recentemente è stato proposto PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$ ) come recettore intracellulare per LPA in base alla capacità del lisofosfolipide di “rimpiazzare” l’agonista di PPAR $\gamma$ , il rosiglitazone (McIntyre et al., 2003). LPA è in grado di attivare la trascrizione di geni contenenti il peroxisomal proliferator-responsive element (PPRE), compreso il recettore scavenger CD36. Molti dati in letteratura dimostrano che LPA esogeno ( $\leq 5$   $\mu$ M, concentrazione equivalente a quella del lisofosfolipide nel siero) è in grado di attivare la trascrizione di geni mediata da PPAR $\gamma$ . La specificità del legame di LPA a PPAR $\gamma$  è assente e numerosi ligandi biologici tra cui eicosanoidi, acidi grassi anionici e componenti di LDL ossidate possono legare il recettore (Rosen and Spiegelman, 2001). Allo stesso modo, LPA può agire indipendentemente da PPAR $\gamma$ . Gli effetti del lisofosfolipide si riscontrano in molti tipi di tessuto che non sono influenzati dall’assenza di PPAR $\gamma$  o che proprio non lo esprimono. Inoltre la perdita della segnalazione di LPA dovuta alla mancanza dei recettori LPA $_1$  e LPA $_2$  non viene ripristinata dall’espressione di PPAR $\gamma$  (Contos et al., 2000; Contos et al., 2002). Da quanto emerso, è evidente che sono necessari ulteriori studi volti a chiarire l’asse LPA/PPAR $\gamma$  e il suo significato fisiologico. È stato tuttavia visto che LPA è in grado di promuovere il differenziamento degli adipociti (Pages et al., 2001) e che PPAR $\gamma$  regola l’espressione di quei geni che controllano il metabolismo energetico (Auwerx, 1999). Curiosamente è stato riportato che il lisofosfolipide induce la proliferazione di cellule RH7777 che non esprimono LPARs e quindi PPAR $\gamma$  potrebbe essere un mediatore di questo effetto. In ambito fisiopatologico, LPA è implicato nell’aterogenesi poiché si accumula a livello delle placche aterosclerotiche ricche in lipidi ed è generato nelle LDL ossidate (Siess et al., 1999). Un ruolo per PPAR $\gamma$  è stato proposto nello sviluppo dell’aterogenesi tramite la regolazione dell’espressione di CD36 che media l’accumulo cellulare di lipidi (Lusis, 2000).

Rimane la possibilità che esistano altri recettori intracellulari per LPA. LPA $_1$  può apparentemente essere espresso a livello delle membrane nucleari mediando così un segnale indotto dal lisofosfolipide che porta all’espressione di geni pro-infiammatori (Gobeil et al., 2003). Questo suggerisce che i LPARs potrebbero teoricamente funzionare da recettori intracellulari. Inoltre, il doppio strato lipidico delle membrane può essere il bersaglio diretto di LPA. L’endofilina I media la formazione di vescicole sinaptiche grazie

alla sua attività acil-transferasica che produce PA da LPA (Schmidt et al., 1999). L'equilibrio locale tra le concentrazioni di PA e LPA potrebbe influenzare la curvatura della membrana, con conseguente invaginazione della membrana e distacco di vescicole sinaptiche (Kooijman et al., 2003). Poiché le endofiline sono essenziali per l'endocitosi mediata dalla clatrina e formano complessi con varie molecole di segnalazione che comprendono recettori di membrana, metalloproteasi, l'accumulo locale di LPA potrebbe provocare alterazioni delle vie di segnalazioni cellulari (Reutens and Begley, 2002).

### 3.2 FUNZIONI BIOLOGICHE DI LPA

La prima funzione biologica *in vivo* attribuita al lisofosfolipide è la regolazione della pressione sanguigna. Mentre questo effetto è dovuto al suo ruolo d'intermedio metabolico, la maggior parte delle azioni biologiche di LPA sono mediate da specifiche interazioni con i suoi cinque recettori (LPA<sub>1-5</sub>).

Molti studi di induzione e perdita di funzionalità hanno evidenziato una varietà di effetti biologici come: proliferazione, differenziamento cellulare, sopravvivenza cellulare, riorganizzazione del citoscheletro, processo di ritrazione e migrazione cellulare (Choi et al., 2008; Ishii et al., 2004; Anlinker and Chun, 2004).

Come mitogeno, LPA stimola la proliferazione attraverso l'attivazione, dipendente da SRE, di geni per la crescita. Ciò induce indirettamente la proliferazione, promuovendo la produzione e il rilascio di fattori di crescita con la funzione di mitogeni o agendo in modo sinergico con LPA per stimolare la proliferazione.

L'effetto proliferativo di LPA dipende dall'attivazione della cascata delle MAPK, che richiede p21ras e p74raf ed è mediata dalle subunità  $\beta\gamma$  di  $G_{\alpha i}$ . Inoltre, è stato dimostrato che PI3K è implicata nella segnalazione mitogenica del lisofosfolipide, mediando l'attivazione delle MAPK in maniera indipendente da Ras.

Ulteriori effettori di segnalazione di LPA includono la proteina tirosino chinasi Src, che può contribuire all'attivazione di raf-1 e PI3K. LPA è in grado di indurre l'attivazione di Src con effetto positivo sulla trans-fosforilazione del recettore di EGF in Tyr845. Questo meccanismo è responsabile dell'attivazione delle MAPK con conseguente aumento della sintesi del DNA (Swarthout et al., 2000).

LPA è in grado di attivare, attraverso la proteina  $G_{12/13}$ , la proteina G monomerica Rho determinando la formazione di fibre di stress, l'assemblaggio delle adesioni focali, la ritrazione di neuriti e la modulazione della trascrizione genica. La  $G_{\alpha 13}$  attiva lega

direttamente il fattore di scambio GDP-GTP Lsc/p115RhoGEF, che attiva Rho. A sua volta Rho attiva PLD, PI3K, p130FAK e il fattore di risposta al siero (SRF). SRE richiede un'interazione con SRF e con i fattori del complesso ternario (TCFs) per stimolare la trascrizione. Dal momento che i TCFs sono attivati dalla via di MAPK e SRF da Rho, l'induzione completa della proliferazione cellulare da LPA richiede una segnalazione coordinata della via di  $G_i$  e di  $G_{12/13}$  (Swarthout et al., 2000).

Questi processi biologici mediati da LPA coinvolgono funzioni del sistema nervoso, sviluppo vascolare, funzioni del sistema immunitario, cancro, riproduzione, fibrosi e obesità.

LPA influenza numerosi processi a livello del sistema nervoso quali lo sviluppo corticale e la sua funzione (Estivill-Torrus et al., 2008; Harrison et al., 2003), la crescita e il ripiegamento della corteccia cerebrale (Kingsbury et al., 2003), il processo di retrazione (Campbell and Holt, 2001; Fukushima et al., 2000; Yuan et al., 2003), la sopravvivenza (Kingsbury et al., 2003), la migrazione (Fukushima et al., 2002), l'adesione (Weiner et al., 2001) e la proliferazione (Contos et al., 2000; Kingsbury et al., 2003). LPA regola la proliferazione e il differenziamento di cellule neuroprogenitrici (NPCs) (Fukushima et al., 1998; Contos et al., 2000) e delle culture di neurosfere (Svetlov et al., 2004) tramite il recettore  $LPA_1$ , mentre regola il differenziamento di cellule progenitrici immortalizzate di ippocampo attraverso  $LPA_4$  (Rhee et al., 2006).

Gli astrociti sono il tipo più abbondante di cellule gliali e svolgono un ruolo importante in molti processi di sviluppo neuronale e nelle patologie neurodegenerative. Gli astrociti esprimono tutti i LPARs (Shano et al., 2008) e mostrano un ampio spettro di risposte biologiche a LPA (Keller et al., 1997; Rao et al., 2003; Sorensen et al., 2003). In particolare, la down-regolazione di  $LPA_1$  ha consentito l'identificazione di questo recettore nel mediare l'effetto mitogenico di LPA in astrociti (Shano et al., 2008). Tuttavia esistono risultati contrastanti a riguardo che riflettono probabilmente differenze nelle condizioni di coltura (Noguchi et al., 2009). LPA regola anche cambiamenti morfologici degli astrociti via Rho-cAMP e la stabilizzazione delle fibre da stress (Manning and Sontheimer, 1997; Suidan et al., 1997).

Recentemente, è stato identificato un ruolo positivo del lisofosfolipide nel differenziamento degli astrociti (de Sampaio et al., 2008), dipendente dall'attivazione dei recettori  $LPA_1$  e  $LPA_2$ .

Le cellule di Schwann (SC) sono le cellule mielinizzanti del sistema nervoso periferico (SNP). Tali cellule esprimono i recettori  $LPA_1$  e  $LPA_2$  (Weiner and Chun 1999; Weiner et

al., 2001; Allard et al., 1998) e la loro attivazione influenza quei processi associati alla mielinizzazione. LPA è stato inizialmente identificato come fattore che promuove la sopravvivenza, poiché previene la morte cellulare di colture di SCs neonatali di ratto attraverso l'attivazione, mediata da  $G_{\alpha i}$ , di PI3K/Akt e della cascata anti-apoptotica (Weiner and Chun 1999; Li et al., 2003). La sopravvivenza mediata da LPA in SCs è stata confermata anche *in vivo*, in quanto topi *Lpa1*<sup>-/-</sup> presentano un incremento dell'apoptosi di SCs del nervo sciatico (Contos et al., 2000). Oltre alla sopravvivenza, LPA regola il citoscheletro di actina e le proprietà di adesione cellulare delle colture primarie di SCs di ratto (Weiner et al., 2001), suggerendo un ruolo critico per il lisofosfolipide nella motilità delle SCs e nella mielinizzazione.

LPA svolge importanti funzioni anche nell'angiogenesi e nella maturazione vascolare. Le prime evidenze sperimentali circa il ruolo del lipide bioattivo nel sistema vascolare vertono su modelli murini *Lpar1*<sup>-/-</sup> i quali mostrano emorragie encefaliche frontali, con un aumento della frequenza nei topi *Lpar1*<sup>-/-</sup>/*Lpar2*<sup>-/-</sup> (Contos et al., 2000; Contos et al., 2002). Un altro collegamento tra LPA e sviluppo vascolare è stato dimostrato nei topi *ATX*<sup>-/-</sup>, i quali muoiono durante lo sviluppo embrionale al 9.5 giorno per gravi difetti vascolari sia a carico del sacco vitellino che dell'embrione stesso (van Meeteren et al., 2006). Sono necessari ulteriori studi volti a caratterizzare i meccanismi molecolari che mediano gli effetti del lisofosfolipide nella formazione e il mantenimento di vasi sanguigni.

LPA è in grado di indurre una varietà di risposte biologiche in cellule endoteliali quali proliferazione, migrazione e vasocostrizione. Infatti è stato dimostrato che il lipide bioattivo stimola la migrazione di cellule endoteliali attraverso l'induzione della metalloproteasi 2, enzima proteolitico coinvolto nella migrazione di questo tipo cellulare e nel rimodellamento della matrice durante l'angiogenesi (Wu et al., 2005).

Negli ultimi anni sta emergendo il ruolo di LPA nelle patologie cardiovascolari: il lisofosfolipide è implicato nello sviluppo dell'aterosclerosi durante le fasi iniziali (disfunzione della barriera e adesione dei monociti all'endotelio) e finali (attivazione piastrinica e trombosi) (Siess, 2002). È stato rivelato accumulo di LPA nel nucleo delle placche aterosclerotiche ricco di lipidi trombogenici (Siess et al., 1999; Rother et al., 2003). Questo a sua volta attiva le piastrine, causandone cambiamenti nella loro forma e mobilitazione di  $Ca^{2+}$  (Siess, 2002). Inoltre, studi farmacologici hanno identificato in  $LPA_1$  e  $LPA_3$  i mediatori primari dell'attivazione piastrinica indotta da LPA (Rother et al., 2003). Tuttavia, l'effetto di LPA sulle piastrine è specie-specifico, poiché è stato visto che LPA inibisce l'attivazione piastrinica nei topi (Pamuklar et al., 2009).

LPA è anche un potente mitogeno e fattore chemiotattico per cellule muscolari lisce vascolari (VSMC) (Kim et al., 2006). Nello specifico, i recettori LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>2</sub> hanno effetti opposti su VSMC primarie derivate da topi *knock-out* per questi recettori (Panchatcharam et al., 2008). La migrazione di SMCs è aumentata in topi *Lpar1*<sup>-/-</sup> mentre risulta attenuata nei topi *Lpar1*<sup>-/-</sup>/*Lpar2*<sup>-/-</sup>, individuando così nei recettori LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>2</sub> mediatori chemiotattici negativi e positivi, rispettivamente.

Numerosi mediatori bioattivi, tra cui fattori di crescita e citochine, sono rilasciati dalle piastrine attivate in seguito a trauma dei tessuti. Questi fattori avviano processi di riparazione dei tessuti contemporaneamente ad alterazioni funzionali quali proliferazione, migrazione e adesione cellula-matrice in cellule endoteliali, SMC e nei fibroblasti. È stato recentemente dimostrato il ruolo di LPA come mediatore di questi processi poiché rilasciato dalle piastrine attivate (Sano et al., 2002) e induce effetti mitogenici e chemiotattici in questi tipi cellulari (Ishii et al., 2004; Anliker and Chun, 2004; Lee et al., 2000; Pilquil et al., 2006). Nei fibroblasti ad esempio la proliferazione indotta da LPA coinvolge la proteina G<sub>i</sub> che media la rapida attivazione di Ras, attraverso le subunità βγ piuttosto che la subunità α. Oltre a Ras e alla sintesi del DNA, anche l'attivazione di MAPK, da parte di LPA, è inibita da PTx, implicando quindi il coinvolgimento della proteina G di tipo inibitorio nella cascata Ras/Raf/MAPK e nell'inibizione dell'attività dell'adenilato ciclasi.

Numerose evidenze sperimentali supportano il ruolo di LPA nel processo di guarigione della ferita. Ad esempio il lisofosfolipide induce la chiusura del monostrato endoteliale *in vitro* (Lee et al., 2000) e *in vivo* promuove i processi di riparazione di ferite cutanee (Balazs et al., 2001; Demoyer et al., 2000) e delle ferite intestinali (Sturm and Dignass, 2002). Inoltre, la migrazione dei fibroblasti sulla matrice di fibrina è un passo essenziale nel processo di guarigione delle ferite nei tessuti danneggiati e il recettore LPA<sub>1</sub> regola la migrazione di fibroblasti embrionali di topo (Hama et al., 2004; Tager et al., 2008). Nonostante il coinvolgimento del lisofosfolipide nel processo di riparazione delle ferite sia conclamato, i LPARs coinvolti non sono stati ancora individuati.

LPA è coinvolto anche nella regolazione del sistema immunitario, in particolare nel contesto delle malattie delle vie aeree e nella risposta infiammatoria. LPARs sono espressi nelle cellule immunitarie, compresi i linfociti (Goetzl et al., 1999; Zheng et al., 2000; Goetzl et al., 2000; Rubenferld et al., 2006), cellule dendritiche (DC) (Panther et al., 2002; Chen et al., 2006) e negli organi linfoidi come la milza e timo (Ishii et al., 2004; Kotarsky et al., 2006; Oh et al., 2008). LPA regola le risposte immunologiche modulando l'attività

delle cellule T o DCs. Nelle cellule T, il lisofosfolipide può stimolare o attenuare l'attività cellulare a seconda dello stato di attivazione delle cellule e, prevalentemente, esprimendo LPARs. Ad esempio LPA aumenta la chemiotassi e inibisce la produzione di IL-2 in cellule T non stimolate che esprimono prevalentemente LPA<sub>2</sub> (Zheng et al., 2001; Zheng et al., 2000; Goetzl et al., 2000). In cellule T attivate da mitogeni, in cui LPA<sub>2</sub> viene down-regolato mentre LPA<sub>1</sub> è up-regolato, LPA inibisce la chemiotassi, attiva la produzione di IL-2 e la proliferazione cellulare attraverso LPA<sub>1</sub> (Zheng et al., 2000), e aumenta la produzione di IL-13 (Rubenferld et al., 2006). Inoltre, LPA promuove la sopravvivenza in cellule T presumibilmente tramite entrambi i sottotipi recettoriali LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>2</sub> (Goetzl et al., 1999). È stato dimostrato che LPA influenza le funzioni di presentazione dell'antigene da parte delle DCs. Considerando che LPA<sub>1-3</sub> sono espressi in DCs sia immature che mature, LPA incrementa la maturazione e la produzione di citochine in DCs immature, ma non ha alcun effetto rilevabile sull'attività delle DCs mature (Panther et al., 2002; Chen et al., 2006). Inoltre, l'attivazione di LPA<sub>3</sub> induce la chemiotassi delle DCs immature ma non delle mature (Chan et al., 2007). Pertanto l'effetto di LPA sulle DCs sembra essere stadio-specifico, sebbene la natura di questa regolazione resti ancora da caratterizzare. Recentemente, è stata identificata ATX come un modulatore del *trafficking* di linfociti (Kanda et al., 2008). Sono tuttavia necessari ulteriori studi per comprendere i ruoli di LPA nel sistema immunitario.

Molti studi sono a supporto di una relazione tra LPA e obesità. I primi dati a riguardo di un coinvolgimento del lipide bioattivo nell'adipogenesi vertono sul rilascio del lisofosfolipide da parte degli adipociti, ma non dai pre-adipociti, sia *in vivo* che *in vitro* e sulla stimolazione della motilità e proliferazione dei pre-adipociti tramite LPA<sub>1</sub> (Valet et al., 1998; Pages et al., 2001). Il rilascio di LPA è stato poi connesso alla secrezione di ATX come ectoenzima durante il differenziamento ad adipociti, evento in grado di indurre direttamente la proliferazione dei pre-adipociti (Ferry et al., 2003). Questo processo avviene anche per gli adipociti derivati da topi obesi-diabetici *db/db* (diabete di tipo II) (Ferry et al., 2003) e nel tessuto adiposo di soggetti umani obesi intolleranti al glucosio (Boucher et al., 2005). Tuttavia, LPA<sub>1</sub> sembra essere anti-adipogenico, poiché la sua attivazione inibisce il differenziamento dei pre-adipociti (Simon et al., 2005). Questo effetto inibitorio è il risultato della down-regolazione di PPAR $\gamma$ 2 (Simon et al., 2005). Inoltre, nonostante il peso corporeo inferiore, topi *Lpar1*<sup>-/-</sup> mostrano una maggiore adiposità rispetto ai topi *wild-type* e il loro tessuto adiposo contiene più pre-adipociti che possono essere differenziati in coltura, in linea con il ruolo anti-adipogenico per LPA<sub>1</sub>

(Simon et al., 2005).

Recentemente è stato dimostrato che LPA, tramite LPA<sub>1</sub>, regola i livelli di glucosio nel sangue migliorando l'assorbimento di glucosio da parte degli adipociti (Yea et al., 2008).

Nel complesso, queste osservazioni indicano che LPA e l'attività di ATX hanno ruoli essenziali nello sviluppo del tessuto adiposo e nell'assorbimento del glucosio, rappresentando quindi potenziali bersagli farmacologici per patologie quali obesità e diabete.

#### **4. EFFETTI DI S1P E LPA SULLA CRESCITA CELLULARE, DIFFERENZIAMENTO E MOTILITA' DI MIOBLASTI**

Tra le varie linee cellulari di mioblasti a disposizione, la linea di mioblasti murini immortalizzati C2C12 è ampiamente utilizzata per studiare *in vitro* la crescita e il differenziamento del muscolo scheletrico. Infatti, a seguito della deprivazione di siero, la maggior parte delle cellule C2C12 differenzia formando miotubi mentre una piccola sottopopolazione, denominata cellule *reserve*, rimane indifferenziata e una terza sottopopolazione va incontro ad apoptosi (Yoshida et al., 1998).

Studi pilota riportano che LPA stimola la proliferazione e inibisce il differenziamento di cellule C2C12, permettendo l'espressione persistente di proteine miogeniche quali Myf5 e MyoD, ma sopprimendo quella del marcatore di differenziamento miogenico, miogenina (Yoshida et al., 1996). Dato che questi processi risultano annullati dal trattamento con la tossina della pertosse è stato ipotizzato che il lisofosfolipide agisca tramite GPCRs accoppiati a G<sub>i</sub>.

Le C2C12, in un terreno a basso contenuto di siero, si differenziano spontaneamente in miotubi, dopo aver raggiunto la confluenza. È stato visto che LPA non inibisce il differenziamento mediato dal contatto cellula-cellula; è stato inoltre dimostrato che l'azione mitogenica e d'inibizione del differenziamento miogenico è dose dipendente (Yoshida et al., 1996). I mioblasti C2C12 esprimono quattro recettori per LPA: LPA<sub>1-4</sub> (Jean-Baptiste et al., 2005). Più recentemente è stato verificato che LPA stimola la proliferazione delle C2C12 tramite un processo dipendente da PI3K. Il lisofosfolipide è importante per la biologia delle cellule di muscolo scheletrico in quanto induce un aumento transitorio della concentrazione del calcio tramite i recettori LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub>, attraverso l'attivazione di vie di segnale distinte e il coinvolgimento di uno scambiatore Na<sup>+</sup>- Ca<sup>2+</sup> (Xu et al., 2008).



In precedenza è stato dimostrato che l'aggiunta di S1P esogeno a mioblasti C2C12 causa l'attivazione di numerose vie segnalazione che coinvolgono la PLD (Meacci et al., 1999), Rho (Meacci et al., 2000) e l'aumento di calcio citosolico (Meacci et al., 2002). Esaminando il profilo di espressione dei recettori per S1P è stato osservato che nei mioblasti C2C12 sono espressi i recettori S1P<sub>1-4</sub>, con S1P<sub>1</sub> l'isoforma recettoriale più espressa. L'espressione relativa dei recettori cambia durante il differenziamento miogenico, in particolare quella di S1P<sub>2</sub> che progressivamente diminuisce durante il differenziamento fino a diventare praticamente assente nei miotubi, suggerendo un ruolo per questo recettore nel processo miogenico (Meacci et al., 2003). I livelli di S1P<sub>1</sub> rimangono invece essenzialmente comparabili, mentre S1P<sub>3</sub> risulta altamente espresso nei miotubi e significativamente meno presente nei mioblasti.

Recentemente è stato visto che S1P ha un ruolo critico nella regolazione del differenziamento miogenico dei mioblasti C2C12. Il lipide bioattivo infatti è in grado di inibire la proliferazione cellulare indotta da siero e di stimolare il differenziamento in miotubi. Tali azioni dello sfingolipide dipendono dall'interazione con il recettore S1P<sub>2</sub>: l'over-espressione di tale recettore comporta un aumento dell'espressione di marcatori miogenici (miogenina, con un picco alle 48 ore, caveolina-3, prodotto di un gene muscolo-specifico, e MHC), viceversa l'effetto pro-miogenico viene meno regolando negativamente l'espressione del recettore (Donati et al., 2005). L'induzione del differenziamento dei mioblasti passa attraverso p38 MAPK, in quanto il trattamento delle C2C12 con inibitori specifici della proteina chinasi, così come l'over-espressione del dominante negativo di p38, cioè la forma cataliticamente inattiva dell'enzima, annullano gli effetti di S1P. L'interazione di S1P con il recettore S1P<sub>2</sub> media anche effetti anti-mitogenici e coinvolge l'attivazione di ERK1/2, MAPK che in questo caso inibiscono la proliferazione cellulare.

Quindi mediante la manipolazione dell'espressione dei recettori di S1P è stato dimostrato che, mentre S1P<sub>2</sub> media un effetto anti-proliferativo e pro-differenziante nei mioblasti, S1P<sub>3</sub> inibisce il differenziamento muscolare. Questa osservazione, oltre ad evidenziare che nei mioblasti i diversi recettori per S1P mediano effetti biologici antitetici, dimostra che in queste cellule S1P<sub>2</sub> ha un ruolo dominante sugli altri sottotipi recettoriali, dato che S1P, nonostante la presenza di S1P<sub>3</sub> e la sua specifica azione anti-differenziante, stimola in maniera evidente il differenziamento.

S1P di per sé non è capace di influenzare la proliferazione cellulare, ma è comunque in grado di ridurre l'azione mitogenica esercitata da siero e favorire l'uscita dei mioblasti dal ciclo cellulare (Donati et al., 2005). In molti tipi cellulari S1P agisce come mitogeno (Pyne

et al., 2000), sebbene in altri tipi cellulari sia stato dimostrato un effetto anti-proliferativo. Recentemente è stato dimostrato che il derivato di sintesi del ceramide, il K6PC-5, noto attivatore della SphK1 nei cheratinociti (Kwon et al., 2007), promuove il differenziamento miogenico dei mioblasti C2C12 attraverso il recettore S1P<sub>2</sub> (Bernacchioni et al., 2011). L'analisi del profilo di espressione dei S1PRs nei mioblasti C2C12 e nelle cellule *reserve*, le quali sono simili alle cellule satelliti quiescenti, non mostra differenze significative a livello di mRNA (Rapizzi et al., 2008). In cellule *reserve* S1P<sub>1</sub> media la proliferazione indotta da S1P. Al contrario nei mioblasti, sebbene S1P<sub>1</sub> sia il sottotipo recettoriale maggiormente espresso, questo non risulta coinvolto nell'induzione S1P dipendente della sintesi di DNA, suggerendo che durante l'attivazione delle cellule satelliti avvengono complessi eventi molecolari a livello dei S1PRs, mediando perciò differenti azioni biologiche.

Alla luce di quanto riportato finora, cioè che S1P evoca differenti effetti biologici in cellule *reserve* e mioblasti, essendo pro-mitogenico nel primo caso e pro-differenziante nel secondo, non solo conferma il coinvolgimento dell'asse SphK1/S1P/S1PR nella biologia del muscolo scheletrico, ma rafforza il concetto che durante i processi di commissionamento e differenziamento avvengano eventi molecolari critici che reindirizzano la segnalazione mediata da S1P attraverso i suoi recettori in modo da mediare diverse azioni biologiche.

È stato in seguito dimostrato il ruolo fisiologico di SphK1 nella regolazione della crescita e del differenziamento dei mioblasti. Durante il differenziamento a miotubi, l'attività e i livelli intracellulari di SphK1 risultano aumentati. Tale aumento va di pari passo con la comparsa dei marcatori molecolari del differenziamento miogenico (Meacci et al., 2008). Infatti è stato verificato che l'espressione ectopica di SphK1 riduce la crescita cellulare mentre aumenta l'espressione dei marcatori miogenici e quindi la manifestazione del fenotipo differenziato. Al contrario, l'espressione del mutante cataliticamente inattivo di SphK1 o la down-regolazione dell'enzima incrementano la proliferazione dei mioblasti mentre ritardano il differenziamento miogenico (Meacci et al., 2008). Quindi nei mioblasti C2C12 il ruolo di SphK1 sembra essere differente rispetto a quello riportato per la maggior parte dei tipi cellulari (Maceyka et al., 2012), dove l'enzima svolge un ruolo positivo nella regolazione della crescita cellulare. Inoltre quando S1P<sub>2</sub> è down-regolato tramite la tecnica dell'interferenza a RNA, l'aumento della miogenesi indotto dall'over-espressione di SphK1 nei mioblasti è annullato, confermando il ruolo di questa isoforma recettoriale nel mediare l'effetto biologico appena descritto.

Il ruolo di S1P<sub>2</sub> è stato recentemente studiato *in vivo* durante la rigenerazione del muscolo soleo dopo danno miotossico indotto dalla notessina. La rigenerazione muscolare risulta attenuata nei topi *knock-out* per S1P<sub>2</sub> o negli animali trattati con l'antagonista farmacologico di S1P<sub>2</sub>, JTE-013 (Danieli et al, unpublished results), constatando perciò il ruolo chiave di questo recettore, in accordo con studi *in vitro* (Donati et al., 2005; Bernacchioni et al., 2011; Meacci et al., 2008).

Tra i vari processi biologici regolati da S1P nei mioblasti C2C12, lo sfingolipide bioattivo esercita un'azione anti-migratoria in questo tipo cellulare, riducendo la motilità cellulare e inibendo la chemiotassi indotta dall'IGF-1 (Becciolini et al., 2006), uno dei maggiori induttori della motilità di cellule satelliti (Suzuki et al., 2000). In accordo con quanto osservato in altri tipi cellulari (Lepley et al., 2005), S1P<sub>2</sub> è il recettore coinvolto nell'azione anti-migratoria di S1P, con conseguente attivazione di RhoA necessario per la risposta biologica.

L'aggiunta di S1P esogena esercita un potente effetto trofico durante la rigenerazione muscolare a seguito di danno *in vivo* indotto con la bupivacaina in modelli murini e ratti (Zanin et al., 2008). Sassoli e collaboratori (Sassoli et al., 2011) hanno recentemente dimostrato un ulteriore ruolo di S1P nella rigenerazione del muscolo scheletrico in quanto l'aggiunta del lipide bioattivo protegge le fibre dell'EDL, danneggiate dall'eccitazione-contrazione, dall'apoptosi e preserva la sopravvivenza delle cellule satelliti.

## **5. CROSS-TALK FUNZIONALE DI S1P E LPA CON FATTORI DI CRESCITA, CITOCHINE E ORMONI**

E' ormai noto che S1P prodotto da numerosi tipi cellulari è in grado di indurre azioni biologiche grazie al suo legame a specifici S1PRs. La via biosintetica responsabile della produzione di S1P è sotto il controllo di un'ampia varietà di fattori di crescita, ormoni, citochine e neurotrasmettitori, molecole in grado di stimolare l'attivazione di SphK e quindi la produzione intracellulare di S1P che verrà rilasciata nello spazio extracellulare dove può interagire con i recettori con modalità autocrina o paracrina ("inside-out signaling"). Quindi l'asse SphK/S1P risulta necessario nel mediare alcune delle risposte cellulari a tali agonisti.

Dopo la scoperta del ruolo chiave di SphK1 nella miogenesi *in vitro* (Meacci et al., 2008), molti studi si sono concentrati sul cross-talk tra fattori di crescita e citochine e asse SphK/S1P in modo da stabilire l'importanza biologica di questa via di segnalazione nel

muscolo scheletrico. Infatti nei mioblasti murini l'asse SphK/S1P sembra essere coinvolto nella trasmissione di importanti risposte biologiche indotte da numerosi fattori di crescita e citochine, e coinvolte nel processo della rigenerazione del muscolo scheletrico.

La citochina infiammatoria TNF $\alpha$  svolge un ruolo importante nella rigenerazione del muscolo scheletrico (Li and Schwartz, 2001), incluso il differenziamento dei mioblasti. È stato dimostrato che la traslocazione di SphK1 alla membrana e la successiva attivazione dell'enzima seguita del coinvolgimento di S1P<sub>2</sub> sono necessari per l'inizio dell'effetto pro-differenziante esercitato da basse dosi di TNF $\alpha$ , in linea con l'azione pro-miogenica esercitata da S1P esogena o endogena (Li and Schwartz, 2001). L'attivazione di SphK1 da parte del TNF $\alpha$  si realizza tramite fosforilazione del residuo di Ser225 da parte di ERK1/2 MAPK attivata da TRAF2, una volta che il TNF $\alpha$  si è legato al suo recettore (Pitson et al., 2003). Questo evento è sufficiente per aumentare l'attività dell'enzima di ben 14 volte. Inoltre, come già precedentemente menzionato, la fosforilazione sul residuo di serina della SphK1, favorendo l'interazione con fosfolipidi acidi di membrana, ne permette la sua ri-localizzazione in prossimità di quest'ultima dov'è disponibile il substrato Sph.

Anche IGF-1 attiva SphK1 in modo analogo al TNF $\alpha$ , cioè in maniera ERK dipendente. L'attivazione della MAPK risulta però sia SphK1-dipendente che S1P-dipendente, indicando che il cross-talk tra IGF e SphK1/S1P coinvolge il modello "inside-out" di azione, ovvero S1P agisce sia come secondo messaggero che come molecola di segnalazione extracellulare. Inoltre, molto probabilmente, 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 dei SphK1 (El-Shewy et al., 2006).

Inoltre, è stato recentemente dimostrato che la transattivazione di S1P<sub>2</sub> da parte dell'IGF-1 attraverso l'attivazione di entrambe le isoforme di SphK, SphK1 e SphK2, è implicata nell'effetto miogenico esercitato dal fattore di crescita (Bernacchioni et al., 2012), confermando il ruolo positivo di S1P<sub>2</sub> nell'attivazione del programma miogenico. Inoltre l'asse SphK/S1P sembra essere necessario nella trasmissione di segnali negativi per la proliferazione dei mioblasti. Infatti, IGF-1 è anche responsabile della transattivazione SphK-dipendente di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> che a loro volta attenuano l'effetto mitogenico evocato dal fattore di crescita, in quanto il silenziamento di SphK1 e SphK2 o dei sottotipi recettoriali S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>3</sub> determina un incremento della proliferazione indotta da IGF-1 (Bernacchioni et al., 2012). Quindi la transattivazione dei S1PRs da parte di IGF-1 è un evento cruciale che determina il successo del differenziamento dei mioblasti indotto dal

fattore di crescita, che è il risultato concomitante dell'inibizione della sua azione mitogenica e della stimolazione del programma miogenico.

L'effetto dell'IGF-1 sull'asse SphK/S1P nei mioblasti è schematicamente riassunto in figura 10.

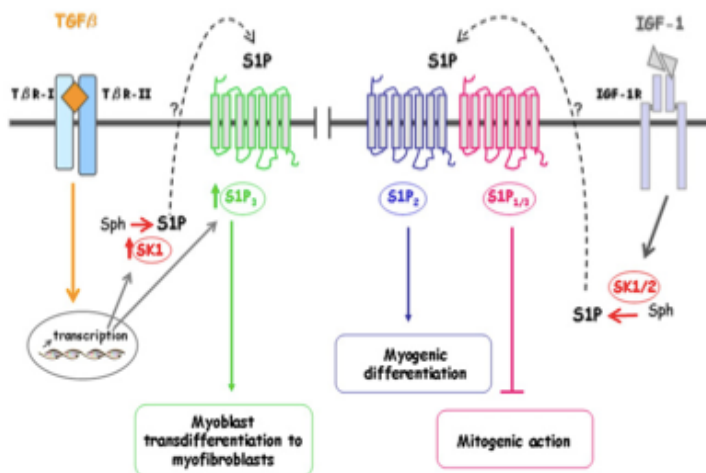


Fig. 10. Effetti di TGF- $\beta$  e IGF-1 sull'asse SphK/S1P in mioblasti C2C12.

Anche il PDGF, fattore di crescita derivato dalle piastrine, partecipa alla rigenerazione muscolare (Yablonka-Reuveni et al., 1990), cross-comunica con l'asse SphK/S1P nei mioblasti in maniera simile all'IGF-1, mediando effetti negativi sulla proliferazione cellulare. E' stato dimostrato, utilizzando inibitori di SphK1 e antagonisti di S1P<sub>1</sub>, che PDGF transattiva S1P<sub>1</sub> mediante l'attivazione di SphK1 e conseguentemente regola negativamente l'effetto mitogenico del fattore di crescita stesso nei mioblasti (Nincheri et al., 2010). Inoltre è stato verificato che S1P<sub>1</sub> modula positivamente la migrazione cellulare indotta da PDGF, aumentando notevolmente la motilità dei mioblasti in risposta a questo fattore di crescita. Quindi la contemporanea diminuzione della proliferazione e l'aumento della migrazione cellulare mediate dall'asse SphK1/ S1P<sub>1</sub> è a favore di un duplice ruolo fisiologico di questa via di segnalazione, ruolo critico nel garantire un preciso controllo della risposta biologica indotta da PDGF al fine di attuare un'efficiente ripopolazione cellulare del sito lesionato, dove è necessario un equilibrio stretto tra proliferazione e migrazione dei progenitori cellulari. S1P<sub>1</sub> è un recettore capace di riprogrammare lo stimolo dato da PDGF trasformandolo da mitogenico a migratorio (Nincheri et al., 2010). Per quanto riguarda il meccanismo molecolare attraverso il quale S1P endogena si lega a S1P<sub>1</sub> in risposta a PDGF o all'IGF-1, è interessante notare che la down-regolazione di S1P<sub>1</sub> non altera l'effetto biologico evocato da S1P esogena nei mioblasti (Nincheri et al., 2010), suggerendo quindi che questo sottotipo recettoriale non è liberamente accessibile al suo

ligando. Tuttavia ogni sforzo fatto per misurare S1P rilasciato a livello extracellulare in risposta a fattori di crescita è fallito. Inoltre l'inibitore farmacologico dei trasportatori ABC, MK571, è inefficace nell'attenuare l'azione biologica del PDGF.

La transattivazione di S1P<sub>1</sub> dipendente da PDGF trasduce un segnale pro-migratorio, mentre è stato inizialmente riportato nello stesso tipo cellulare che S1P esogena agisce come segnale anti-migratorio grazie al suo legame con il recettore S1P<sub>2</sub> (Nincheri et al., 2010).

Queste osservazioni dimostrano che la regolazione spaziale della biosintesi di S1P all'interno della cellula, insieme al preciso controllo della sua partizione nei microdomini della membrana plasmatica, sono eventi critici nel determinare il subset dei S1PRs attivati dai quali dipenderà l'effetto biologico finale dello sfingolipide nei mioblasti.

Come già accennato, la rigenerazione del muscolo scheletrico coinvolge l'attività di vari tipi cellulari in risposta a numerosi segnali generati sia localmente sia nel circolo sanguigno. Tuttavia durante il danno cronico del muscolo, come quello caratteristico delle distrofie muscolari, la risposta flogistica persiste mentre l'abilità delle cellule satelliti di riparare il tessuto risulta ridotta (Matsumura and Campbell, 1993). Questo processo anormale di rigenerazione è seguito dal trans-differenziamento dei mioblasti e dei fibroblasti residenti del muscolo in un nuovo tipo cellulare, fenotipicamente definito, i miofibroblasti (Mann et al., 2011). Queste cellule, insieme ai fibroblasti, sono coinvolti nella produzione di proteine della matrice extracellulare che rimpiazzeranno il tessuto normale dando origine a fibrosi muscolare, una grave degenerazione del muscolo scheletrico comune a tutte le distrofie muscolari e che altera le proprietà contrattili del tessuto. Recentemente è stato descritto un signaling aberrante della citochina TGF- $\beta$  nella distrofia muscolare di Duchenne e in altre miopatie meno gravi (Burks et al., 2011) e l'inibizione della via di segnalazione del TGF- $\beta$  è stata implicata nel miglioramento della malattia, rivelando nuove vie terapeutiche per un ampio gruppo di malattie neuromuscolari (Cohn et al., 2007).

È interessante notare che l'asse SphK/S1P, identificato nei mioblasti come componente molecolare critica di quei processi biologici coinvolti nella rigenerazione del muscolo scheletrico, è implicato nello stesso tipo cellulare nella trasmissione del segnale pro-fibrotico e anti-differenziante del TGF- $\beta$  (Cencetti et al., 2010). Il TGF- $\beta$ 1 è implicato quindi nella fibrosi muscolare; induce il transdifferenziamento dei mioblasti in miofibroblasti portando così alla fibrosi che si oppone alla rigenerazione del tessuto muscolare. Nella linea cellulare C2C12, TGF- $\beta$ 1 up-regola in maniera smad-dipendente la

SphK1, determinando quindi un aumento di S1P endogena, e inoltre determina un'alterazione del profilo d'espressione dei S1PRs. In seguito a stimolazione con TGF- $\beta$ 1, S1P<sub>3</sub> risulta essere il recettore maggiormente espresso a livello di membrana e media, tramite la via di segnalazione Rho/Rho chinasi, il transdifferenziamento dei mioblasti. È stato dimostrato che l'inibizione di S1P<sub>3</sub> porta ad una diminuzione della risposta pro-fibrotica indotta da TGF- $\beta$ 1 (Cencetti et al., 2010). Tale azione concertata del TGF- $\beta$  è sufficiente quindi per il re-indirizzamento del signaling sia di S1P endogeno sia di quello esogeno, da un'azione pro-miogenica mediata da S1P<sub>2</sub> verso un effetto pro-fibrotico e anti-differenziante trasmessi da S1P<sub>3</sub>. Gli effetti del TGF- $\beta$  sull'asse SphK/S1P nei mioblasti sono schematicamente illustrati in figura 10.

Questi risultati rafforzano il concetto secondo il quale un approccio farmacologico che ha come target la formazione di S1P e/o la via di segnalazione mediata da S1P<sub>3</sub> rappresenterebbero interventi terapeutici originali volti a ridurre la progressione della fibrosi del muscolo scheletrico.

È stato dimostrato che anche i lisofosfolipidi sono capaci di transattivare recettori tirosin chinasi di fattori di crescita e stimolare così le vie di trasduzione del segnale a valle di fattori di crescita, ormoni e citochine. In uno studio recente è stato riportato un cross-talk funzionale tra LPA e TGF- $\beta$ . Questo lisofosfolipide agisce come segnale pro-fibrotico nei mioblasti murini, essendo capace di regolare positivamente l'espressione del fattore di crescita del tessuto connettivo (CTGF) (Vial et al., 2008). È stato scoperto che l'induzione dell'espressione di CTGF da parte di LPA dipende dalla transattivazione del recettore di TGF- $\beta$  di tipo II e dall'induzione della sua attività serina-treonin chinasi (Cabello-Verrugio et al., 2011). Alla luce del ruolo chiave di S1P<sub>3</sub> e dell'attivazione down-stream di Rho chinasi nella trasmissione della risposta pro-fibrotica del TGF- $\beta$  (Cencetti et al., 2010), è concepibile ipotizzare l'esistenza di un possibile cross-link tra il signaling di LPA e S1P nell'inizio della fibrosi nei mioblasti.

## **6. EFFETTI DI S1P E LPA NEL METABOLISMO DEL MUSCOLO SCHELETRICO**

Come già accennato, oltre al ruolo principale del muscolo scheletrico di produrre movimento, questo tessuto svolge una funzione critica nella regolazione del metabolismo corporeo. Le richieste metaboliche del muscolo scheletrico sono variabili e dipendono strettamente dalle condizioni di lavoro. Inoltre il metabolismo del muscolo scheletrico è

regolato anche da un punto di vista ormonale, essendo l'insulina il principale "interruttore" molecolare che consente un cambiamento del metabolismo, dall'ossidazione degli acidi grassi in condizioni di digiuno al metabolismo glicolitico dopo i pasti. In risposta all'insulina, aumenta l'internalizzazione del glucosio da parte del muscolo scheletrico. Questo effetto è mediato dall'attivazione, dipendente dal recettore insulinico, della via di segnalazione PI3K/Akt cruciale per la traslocazione massiccia del trasportatore del glucosio GLUT4 alla membrana. Il muscolo scheletrico utilizza più dei tre quarti del glucosio del corpo e, conseguentemente, il ridotto smaltimento del glucosio in risposta all'insulina nel muscolo scheletrico è una caratteristica della sindrome metabolica. È interessante notare che l'asse SphK1/S1P è coinvolta nella regolazione del metabolismo del glucosio nelle miofibre del tessuto scheletrico (Bruni and Donati, 2008). Infatti, nei mioblasti C2C12 l'inibizione, farmacologica o mediante interferenza a RNA, di SphK1 diminuisce l'up-take di glucosio basale o in seguito a stimolazione con insulina. Viceversa, l'over-espressione di SphK1 o il trattamento con S1P esogena aumentano l'up-take di glucosio basale e stimolato dall'insulina (Ma et al., 2007).

Inoltre è stato recentemente riportato che nei mioblasti C2C12 S1P cross-comunica con la via di trasduzione dell'insulina attraverso un meccanismo molecolare che coinvolge il recettore S1P<sub>2</sub>, la produzione di specie reattive dell'ossigeno e la conseguente inibizione della proteina tirosina fosfatasi-1B e la finale transattivazione indipendente dal ligando del recettore insulinico, con un esito positivo sull'up-take di glucosio (Rapizzi et al., 2009). Questo fornisce una spiegazione meccanicistica dell'effetto, simile a quello dell'insulina, esercitato da SphK1 sull'up-take di glucosio. Questi risultati suggeriscono che aumentando la via di segnalazione di S1P via S1P<sub>2</sub> si potrebbe avere un effetto benefico sullo smaltimento del glucosio da parte del muscolo scheletrico; sono necessari ulteriori studi volti a capire se un'alterata produzione di S1P partecipa all'insulino-resistenza. Inoltre recentemente è stato visto che nel plasma di pazienti allenati all'esercizio, la concentrazione di S1P è basalmente più alta mentre il contenuto di Sph, S1P, sfinganina 1-fosfato e ceramide è ridotto negli eritrociti (Baranowski et al., 2011), presumendo quindi che l'aumento, indotto dall'esercizio, della concentrazione di S1P nel plasma potrebbe essere uno dei meccanismi che sono alla base degli effetti benefici dell'esercizio fisico sulla sensibilità dell'insulina e sul sistema cardiovascolare.

È interessante notare che anche LPA è capace di modulare il trasporto in glucosio in cellule muscolari L6 di ratto differenziate. L'up-take di glucosio è invece significativamente aumentato da parte di LPA attraverso un meccanismo che coinvolge



recettori accoppiati a proteine  $G_i$ , l'attivazione di Akt e la traslocazione alla membrana plasmatica di GLUT4 (Yea et al., 2008). In accordo, LPA è stato visto essere capace di ridurre i livelli ematici di glucosio in topi diabetici, a favore di un ruolo di LPA nel controllo dell'omeostasi del glucosio nel muscolo scheletrico, in maniera simile a quello proposto per S1P.

## **7. EFFETTI DI S1P E LPA NELLA FISIOLOGIA E BIOLOGIA DEL MUSCOLO SCHELETRICO**

Come detto in precedenza, il muscolo scheletrico è capace di adattarsi a differenti bisogni metabolici e fisiologici in quanto è caratterizzato da un alto grado di plasticità. L'esercizio e la nutrizione favoriscono l'aumento della dimensione muscolare a seguito dell'ingrossamento delle fibre risultante nell'ipertrofia che aumenta il tasso di sintesi delle proteine contrattili (Schiaffino et al., 2007; Hilber et al., 2008; Westerblad et al., 2010; Sandri, 2008). La denutrizione, l'invecchiamento, la micro-gravità, l'immobilizzazione prolungata, malattie sistemiche e alte dosi di glucocorticoidi favoriscono atrofia, caratterizzata dalla progressiva degradazione delle proteine contrattili (Schiaffino et al., 2007; Chopard et al., 2009; Narici et al., 2011; Hilber et al., 2008; Westerblad et al., 2010; Sandri, 2008).

Recentemente è stato dimostrato che LPA a seguito dell'attivazione di  $G_{i2}$  stimola l'ipertrofia del muscolo scheletrico e la rigenerazione causando uno switch a fibre ossidative. Invece l'over-espressione del mutante costitutivamente attivo di  $G_{i2}$  stimola il differenziamento dei miotubi tramite attivazione di NFAT e PKC. Inoltre l'attivazione della  $G_{i2}$  determina l'inibizione dell'atrofia indotta dalla citochina cachettica  $TNF\alpha$ , attraverso una riduzione dei livelli di mRNA di MuRF1, E3 ubiquitina ligasi responsabile della degradazione proteica attraverso il sistema ubiquitina-proteasoma (Minetti et al., 2011).

È stato inoltre dimostrato che S1P a livello delle cellule muscolari scheletriche agisce come fattore trofico contrastando l'atrofia muscolare indotta da denervazione e regolando l'espressione di MHC, attenua anche la trasformazione delle fibre slow-to-fast legata al disuso. L'atrofia invece risulta incrementata quando lo sfingolipide viene neutralizzato da uno specifico anticorpo anti-S1P (Zanin et al., 2008). Nei miotubi L6 S1P riduce l'atrofia indotta dal  $TNF\alpha$  mediata dall'aumento di ceramide ed esercita un effetto positivo sull'attività della ceramide chinasi. L'inibizione dell'attività di SphK con il DMS conferma

l'azione trofica di S1P, mentre FTY720 non amplifica l'effetto negativo del TNF $\alpha$  (De Larichaudy et al., 2012). Sebbene questo risultato sollevi interesse da parte di quegli autori che considerano FTY720 un antagonista dei S1PRs, è in linea con il fatto che questo farmaco agisce da agonista di tutti i S1PRs eccetto S1P<sub>2</sub> (Chun et al., 2011) e con il ruolo fondamentale di questo sottotipo recettoriale nella rigenerazione del muscolo scheletrico (Germinario et al., 2012).

Il declino della capacità del muscolo di generare forza dopo esercizi faticosi, è detto affaticamento muscolare. Molti fattori partecipano all'inizio dell'affaticamento che dipende anche dalla durata e dall'intensità dell'attività contrattile e dalla composizione delle miofibre. È stato verificato che Sph e S1P riducono il declino della tensione durante l'affaticamento dell'EDL. L'effetto di Sph è inibito dal pre-trattamento con DMS e in assenza di calcio extracellulare, implicando quindi la formazione di S1P nel meccanismo molecolare di azione (Danieli-Betto et al., 2005).

Esistono molti studi che evidenziano il coinvolgimento dei metaboliti degli sfingolipidi nella regolazione dell'accoppiamento eccitazione-contrazione. In particolare, la Sph, ma non il ceramide, inibisce il rilascio di Ca<sup>2+</sup> dal reticolo sarcoplasmatico agendo direttamente sui recettori rianodinici (Bruni and Donati, 2008). È stato proposto un modello secondo il quale la Sph mantiene i canali rianodinici nella conformazione chiusa fino all'arrivo dello stimolo contrattile. Anche S1P prende parte attiva nella regolazione dell'accoppiamento eccitazione-contrazione, modulando i movimenti di carica a livello della membrana, modificando la soglia di voltaggio e la corrente di Ca<sup>2+</sup> attraverso il recettore diidropiridinico, presumibilmente attraverso il recettore S1P<sub>3</sub> poiché il trattamento con la suramina ne altera l'effetto (Bencini et al., 2003).

Quindi da questi dati si evince il ruolo cruciale di LPA e S1P nella biologia delle cellule del muscolo scheletrico. Sono necessari ulteriori studi volti a delineare i meccanismi attraverso i quali questi lipidi bioattivi determinano le loro azioni biologiche e a svelare la relazione, a livello molecolare, tra alterazioni delle vie di segnalazione di S1P e LPA e malattie del muscolo scheletrico, consentendo quindi di attenuare i processi degenerativi e di reindirizzare il metabolismo del muscolo scheletrico.

## MATERIALI E METODI

### MATERIALI

Il DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's medium), il siero di cavallo (HS), l'albumina di siero bovino (BSA), la tripsina, gli antibiotici penicillina/streptomicina, la glutammina, la kanamicina, il fungizone, il mix di inibitori di proteasi, la collagenasi I, il TriReagent, la calceina-AM sono stati acquistati dalla Sigma (Milano, Italia). Il siero fetale di vitello (FCS) è stato acquistato dalla EuroClone (Milano, Italia). L'estratto embrionale di pollo (CEE) è stato ottenuto dalla Sera Laboratories International Ltd. (Bonley, WS, UK). La *D-erythro*-sfingosina 1-fosfato, l'agonista recettoriale per S1P<sub>1</sub> (SEW2871), l'inibitore della sfingosina chinasi (SKI-2) e di MEK (U0126) sono stati acquistati dalla Calbiochem (San Diego, CA, USA). (S)-FTY720-fosfato è stato preso dalla Echelon (Salt Lake City, USA). La [<sup>3</sup>H]timidina dalla Perkin Elmer (Waltham, MA, USA), l'acido lisofosfatidico (Oleoyl-L- $\alpha$ -lysophosphatidic acid sodium salt) da Enzo life Sciences (Vinci-Biochem s.r.l., Vinci, Italia). L'antagonista specifico per LPA<sub>1/3</sub>, Ki16425, e l'antagonista specifico per S1P<sub>3</sub>, CAY10444, sono stati presi dalla Cayman Chemical (Michigan, USA). L'EGF e l'IGF-1 sono stati acquistati dalla PeproTech EC Ltd (London, UK); HGF dalla R&D System Inc. (Minneapolis, MN, USA). Il reattivo chemiluminescente (ECL) è stato ottenuto dalla GE Healthcare Europe GmbH (Milano, Italy). Lipofectamine RNAiMAX™ (Invitrogen), i kit per la retrotrascrizione e per la real time PCR, i primers per S1P<sub>1-4</sub> e per le due isoforme di SphK (Applied Biosystem) provengono dalla Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). Lo stripping buffer è stato acquistato dalla Thermo Scientific (Rockford, IL, USA). L'anticorpo monoclonale contro Pax7 è stato gentilmente fornito da Giulio Cossu. L'inibitore della sfingosina chinasi (VPC96047) e specifico per l'isoforma 1 della sfingosina chinasi (VPC96091) sono stati gentilmente forniti da Lynch. Gli anticorpi monoclonali contro SphK1 e SphK2 sono stati gentilmente forniti da Dr. Y Banno (Gifu University School of Medicine, Gifu, Giappone) e Dr. S Nakamura (Department of Molecular and Cellular Biology, Kobe University Graduate School of Medicine, Kobe, Giappone). L'anticorpo monoclonale contro la  $\beta$ -actina è stato acquistato dalla Cytoskeleton, Inc. (Denver, CO, USA), le immunoglobuline anti-mouse, anti-rabbit e anti-goat coniugate con la perossidasi di rafano, anti-Akt1/2/3 (H-136) e anti-fosfo-Akt 1/2/3

(Ser473) dalla Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). Gli anticorpi monoclonali contro p38 e la forma fosforilata di p38 (Thr180/Tyr182), anti-ERK1/2 e anti-fosfo-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) sono stati acquistati dalla Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA). L'antagonista specifico per S1P<sub>1</sub>, W146, e per S1P<sub>1/3</sub>, VPC23019, sono stati ottenuti dall'Avanti Polar Lipids (Alabaster, AL, USA). Il reattivo di Bradford (Blue Coomassie G250) è stato acquistato dalla Bio-Rad (Hercules, CA, USA). L'inibitore di p38 MAPK SB239063, l'inibitore di PI3K LY 294002, l'antagonista specifico per S1P<sub>2/4</sub>, JTE-013, sono stati ottenuti dalla Tocris Bioscience (Ellisville, MO, USA). Il Matrigel è stato acquistato dalla BD Biosciences (Bedford, MA, USA); il collagene di tipo I dalla Millipore (Billerica, MA, USA). I topi wild-type sono stati acquistati dalla Charles River Laboratories Italia S.r.l. (Calco, Lecco, Italy). La soluzione colorante Diffquick da Dade-Behring Holding GmbH (Liederbach, Germany), mentre il CHEMOTX system, i filtri in polycarbonato (8 µm) e le camere di Boyden da Neuroprobe (Gaithersburg, MD, USA). I siRNA (short interfering RNA) a doppia elica corrispondenti a due sequenze bersaglio murine per S1P<sub>1</sub> (5'-UCACCUACUACUGUUAGAdTdT-3'; 5'-CUUGCUAACUAUUUGGAAAdTdT-3'), S1P<sub>2</sub> (5'-CUCUGUACGUCCGAAUGUAAdTdT-3'; 5' GACUAAUCAGAUUGUAGUAAdTdT-3'), S1P<sub>3</sub>(5'-CCAUUAUGAUGCCAACAAGAdTdT-3'; 5' GUAAGUCAAGCUCCAGUAAAdTdT-3'), S1P<sub>4</sub> (5'-CUGCUGAACAUCACACUGAdTdT-3'; 5'-CUGACAUCUUUGGUUCUAAAdTdT-3') SphK1 (5'-UAGGAACUGUGGCCUCUAAAdTdT-3'; 5'-GUGUUAUGCAUCUGUUCUAdTdT-3'), SphK2 (5'-GCCUACUUCUGCAUCUACAdTdT-3'; 5'-CCUCAUACAGACAGAACGAdTdT-3') e il siRNA di controllo (scrambled) (5'-UUCUCCGAACGUGUCACGUdTdT-3') provengono dalla Sigma-Proligo (The Woodlands, TX, USA).

## ISOLAMENTO E COLTURA DI CELLULE SATELLITI MURINE

Le cellule satelliti venivano isolate dai muscoli tibiale anteriore, *extensor digitorum longus* (EDL), gastrocnemio e soleo di topi adulti *wild-type* (1-7 mesi), prelevati mediante microdissezione, e coltivate secondo la metodica descritta da Rosenblatt et al. (Rosenblatt et al., 1995).

I muscoli prelevati, dopo essere stati lavati con PBS addizionato con penicillina e

streptomicina, venivano incubati a 37°C per 1-2 h in piastre da 12 pozzetti contenenti DMEM addizionato con 2 mg/ml di Collagenasi I, al fine di favorire la digestione enzimatica del tessuto connettivo che riveste le miofibre. La disgregazione totale del muscolo veniva completata mediante triturazione, attraverso punte Pasteur. Successivamente le fibre venivano trasferite in multiwell da 24 contenenti plating medium, cioè DMEM addizionato col 10% di HS, 0.5% di CEE, glutammina (20 mM), penicillina (72 µg/ml), streptomicina (100 µg/ml), kanamicina (0.1 mg/ml) e fungizone (2.5 µg/ml). Poiché le cellule che si ottengono dalla disgregazione, enzimatica e meccanica, del tessuto muscolare possono contenere una popolazione eterogenea di precursori, si effettuava un pre-plating di 1 h a 37°C della sospensione di fibre muscolari in piastre da 100 mm in modo tale da consentire l'adesione precoce dei fibroblasti alla plastica, che invece non avviene per le cellule satelliti che richiedono un rivestimento di collagene per poter aderire alle piastre. Questo passaggio è estremamente importante perchè i fibroblasti crescono molto velocemente in coltura e possono predominare sugli altri tipi cellulari. Dopo aver effettuato il pre-plating, le singole fibre venivano quindi trasferite in multiwell da 24 precedentemente rivestite con 1 mg/ml di Matrigel diluito in plating medium. Il Matrigel è un preparato di membrana basale in soluzione estratta dal sarcoma di topo di Engelbreth-Holm-Swarm, i cui componenti principali sono laminina, collagene IV, entactina, eparansolfato, fattori di crescita. A temperatura ambiente il Matrigel polimerizza formando una matrice con caratteristiche simili a quelle della membrana basale delle cellule dei mammiferi. Dopo 24 h veniva sostituito il plating medium con del mezzo fresco. Nel giro di 3-4 giorni dalla piastratura le cellule satelliti attivate uscivano dalla loro nicchia, fino ad arrivare ad un massimo di circa 300 cellule intorno a ciascuna fibra. Se mantenute in plating medium le cellule satelliti iniziano a fondersi formando miotubi. Quindi, per favorire la proliferazione cellulare delle satelliti a scapito del differenziamento, il plating medium veniva sostituito con terreno di proliferazione, costituito da DMEM addizionato col 20% di FCS, 10% di HS, 1% di CEE, glutammina (20 mM), penicillina (72 µg/ml), streptomicina (100 µg/ml), kanamicina (0.1 mg/ml) e fungizone (2.5 µg/ml). Raggiunta una confluenza del 70-80%, le cellule venivano staccate. Quindi, si aspirava il terreno, si eseguivano due lavaggi con PBS. Le cellule venivano tripsinizzate per 5 minuti a 37°C in atmosfera umidificata al 5% di CO<sub>2</sub>. Veniva poi aggiunto il terreno di proliferazione e la sospensione cellulare ottenuta veniva raccolta e diluita opportunatamente per la piastratura, dopo aver contato le cellule nella camera di Bürker. Prima di procedere alla piastratura, le piastre venivano rivestite con collagene (0,05 mg/ml) e incubate a 37°C per almeno 2 h. La

soluzione di collagene veniva preparata impiegando PBS freddo, al fine di impedirne una precoce e disomogenea polimerizzazione. Al termine della polimerizzazione, si aspirava il collagene in eccesso e si procedeva alla piastratura delle cellule in terreno di proliferazione.

## **TRASFEZIONE CELLULARE**

Cellule in crescita in piastre da 12 pozzetti venivano trasfettate con siRNA a doppia elica corrispondenti a 2 sequenze murine bersaglio per S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub>, S1P<sub>4</sub>, SphK1, SphK2 utilizzando Lipofectamina RNAiMAX, seguendo il protocollo della ditta produttrice. Brevemente, Lipofectamina RNAiMAX veniva incubata con i siRNA in DMEM senza fattori di crescita o antibiotici, a temperatura ambiente per 20 minuti. Successivamente i complessi lipide/RNA formati venivano aggiunti delicatamente alle cellule raggiungendo una concentrazione finale di 85 nM in DMEM contenente siero.

Dopo 30 h le cellule venivano poste in DMEM privo di fattori di crescita, contenente 1 mg/ml BSA e poi utilizzate per gli esperimenti 72 h dopo l'inizio della trasfezione. Il silenziamento genico specifico veniva poi valutato tramite real-time RT-PCR.

## **RETROTRASCRIZIONE**

L'RNA totale veniva estratto dalle cellule satelliti utilizzando TriReagent secondo il protocollo della ditta produttrice e veniva dosato utilizzando il Nanodrop Spectrophotometer ND-1000. 2 µg di RNA totale, opportunamente diluiti in un volume di 10 µl, venivano utilizzati per la reazione di trascrizione inversa, aggiungendoli a 10 µl di RT master mix 2X, contenente deossiribonucleotidi (dNTP) e random primers alle opportune concentrazioni. La reazione, catalizzata dalla trascrittasi inversa MultiScribe, prevedeva i seguenti passaggi: una prima fase di 10 minuti a 25°C, successivamente la temperatura veniva portata a 37°C per 120 minuti, ulteriormente incrementata a 85°C per 5 minuti e infine il campione mantenuto a 4°C, per poi essere conservato a -20°C fino al suo utilizzo nella Real Time PCR.

## REAL TIME PCR

Al fine di valutare quantitativamente i livelli di espressione dell'mRNA specifico per i recettori S1P<sub>1-5</sub> e per entrambe le isoforme di SphK 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 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. Il cDNA, ottenuto mediante retrotrascrizione come precedentemente descritto, e diluito 30 volte, veniva sottoposto al processo di amplificazione in soluzione con TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem) e con i primer per S1P<sub>1</sub> (codice d'identificazione Mn00514644\_m1), S1P<sub>2</sub> (codice d'identificazione Mn01177794\_m1), S1P<sub>3</sub> (codice d'identificazione Mn00515669\_m1), S1P<sub>4</sub> (codice d'identificazione Mm00468695\_s1), S1P<sub>5</sub> (Prime Time qPCR assay N053190.1pt.S1PR5, Integrated DNA Technologies, Leuven, Belgium), SphK1 (codice d'identificazione Mm00448841\_g1) e SphK2 (codice d'identificazione Mm00445021\_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. Il processo di amplificazione prevedeva una fase iniziale di denaturazione a 95°C per 10 minuti, seguita da 40 cicli composti da un primo step di 15 secondi a 95°C e da una seconda fase di *annealing* ed estensione a 60°C per 1 minuto. 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 del  $\Delta\Delta Ct$  (Livak et al., 2001): dalle medie dei Ct dei triplicati è stato prima calcolato il valore  $\Delta Ct$ , 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:

$$\Delta Ct = Ct_x - Ct_n$$

con x = target e n = normalizzatore.

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

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{s} - \Delta Ct_{c}$$

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.

## **PREPARAZIONE DEI CAMPIONI PER WESTERN BLOTTING**

Al termine della stimolazione delle cellule satelliti, si procedeva alla loro lisi. Dopo aver aspirato il terreno dalla piastra, le cellule venivano lavate due volte con PBS freddo e raccolte in tampone di lisi contenente Tris-HCl pH 7.5 50 mM, EDTA 1 mM, EGTA 6 mM, NaCl 120 mM,  $\text{NaP}_2\text{O}_7$  15 mM, NaF 20 mM, Nonidet 1% ed inibitori di proteasi. I campioni venivano quindi incubati in ghiaccio per 30 minuti e poi centrifugati a 10000 g per 15 minuti a 4°C. Il sovrantante, contenente il lisato cellulare totale, veniva recuperato ed utilizzato per la determinazione del contenuto proteico.

## **DOSAGGIO DELLE PROTEINE**

La concentrazione di proteine dei campioni veniva determinata utilizzando il reattivo di Bradford (Blue Coomassie G250), che forma complessi non covalenti con le proteine, che assorbono ad una lunghezza d'onda di 595 nm. La lettura allo spettrofotometro dell'assorbimento a tale lunghezza d'onda permette di risalire al contenuto proteico dei campioni per confronto con una curva standard, allestita utilizzando concentrazioni note di BSA e misurando i rispettivi valori di assorbanza.

I campioni, preparati utilizzando 2  $\mu\text{l}$  di lisato cellulare, 798  $\mu\text{l}$  di acqua bidistillata e 200  $\mu\text{l}$  di Coomassie, venivano dosati in doppio. Dalla media di ogni coppia di valori ottenuti per ciascun campione si risaliva alla concentrazione proteica in  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  per interpolazione



sulla curva standard. Dai valori ottenuti dal dosaggio proteico era possibile calcolare il volume di campione necessario per sottoporre a separazione elettroforetica la quantità desiderata di lisato proteico, generalmente compresa tra 15 e 30 µg.

## ELETTROFORESI SU GEL DI POLIACRILAMMIDE E WESTERN BLOTTING

In seguito al dosaggio, il volume di campione necessario per correre la quantità desiderata di lisato proteico veniva risospeso in Sample Buffer, che denatura le proteine e riduce i ponti disolfuro. Prima di essere sottoposti a separazione elettroforetica, i campioni così preparati venivano bolliti per 5 minuti per aumentare la denaturazione delle proteine già indotta dal Sample Buffer e poi centrifugati a 14000 g per un minuto a temperatura ambiente.

Le proteine venivano separate mediante elettroforesi in condizioni denaturanti SDS-PAGE (Sodio Dodecil Solfato-PoliAcrilammide Gel Elettroforesi) secondo la metodica di Laemmli, che prevede la preparazione di due diversi gel di poliacrilammide: il *separating gel*, in cui, durante la corsa elettroforetica, avviene la separazione delle proteine in base al loro peso molecolare, e lo *stacking gel*, che permette la compattazione e l'allineamento delle proteine, in modo che esse entrino tutte contemporaneamente nel gel di separazione.

Le soluzioni necessarie per la preparazione del *separating gel* erano: soluzione di acrilammide/metilenbisacrilammide, Tris/HCl 1.875 M a pH 8.8 e SDS 10%. Queste soluzioni venivano miscelate nelle opportune proporzioni con acqua bidistillata in modo da ottenere la concentrazione finale desiderata, variabile tra il 5% ed il 15%, a seconda del peso molecolare delle proteine di interesse. Venivano poi aggiunti i catalizzatori (soluzione di ammonio persolfato al 1% e TEMED), che consentono la polimerizzazione del gel.

Le soluzioni necessarie per la preparazione dello *stacking gel* erano le stesse, ad eccezione del Tris/HCl, che in questo caso era 0.625 M e a pH 6.8, e della concentrazione finale di acrilammide/metilenbisacrilammide, che era fissa, pari al 4%. Entrambe le soluzioni venivano lasciate polimerizzare all'interno di lastre di vetro.

Oltre ai campioni, nel gel venivano caricati anche standard di peso molecolare noto *pre-stained*, che successivamente permettevano di identificare la banda corrispondente alla proteina di interesse.

La corsa elettroforetica avveniva in un opportuno tampone per elettrodi (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3) per circa 90 minuti, applicando un voltaggio costante

di 120 V.

Le proteine, essendo state denaturate e trattate con SDS, un detergente anionico che conferisce loro una carica negativa, migrano nel gel con una velocità che è proporzionale al loro peso molecolare.

Al termine della corsa, le proteine venivano trasferite elettroforeticamente dal gel ad una membrana PVDF (fluoruro di polivinidene, con pori di 0,45 micrometri). Il trasferimento avveniva in un apposito tampone (Tris-HCl 25 mM, glicina 192 mM, pH 8.3, metanolo 20%) per 90 minuti, applicando un voltaggio costante di 25 V.

Prima dell'incubazione con l'anticorpo specifico per la proteina da individuare, la membrana veniva incubata per un'ora in agitazione in TBS (Tris-HCl 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.5) contenente lo 0.1% di Tween-20 (TTBS 0.1%), addizionato con l'1% di albumina di siero bovino. Questo processo permette di ridurre il legame dell'anticorpo a siti aspecifici.

La membrana veniva quindi incubata per tutta la notte a 4°C con l'anticorpo primario specifico, diluito alla opportuna concentrazione in TTBS 0.1%. Seguivano 3 lavaggi in TTBS 0.1% da 5 minuti ciascuno per eliminare l'anticorpo non legato, ed una incubazione di un'ora a temperatura ambiente con l'anticorpo secondario opportuno, coniugato a perossidasi, diluito 1:5000 in TTBS 0.1%, in grado di riconoscere e legarsi all'anticorpo primario. Si effettuavano poi 3 lavaggi da 5 minuti ciascuno in TTBS 0.1% e un ulteriore lavaggio da 15 minuti in TBS.

A questo punto la membrana veniva incubata per circa 1 minuto con il reattivo ECL, che fornisce il substrato alla perossidasi, con conseguente sviluppo di chemiluminescenza, ed esposta, per un tempo variabile a seconda dell'intensità del segnale luminoso, ad una pellicola fotografica, che veniva poi sottoposta a sviluppo e fissaggio.

Le bande di interesse venivano sottoposte ad analisi densitometrica quantitativa mediante il programma ImageJ software, che permette di determinarne l'intensità. Per verificare l'applicazione di uguali quantità di proteine veniva effettuata l'analisi dell'espressione della  $\beta$ -actina, mediante l'uso dello specifico anticorpo primario. L'intensità delle bande corrispondenti alla proteina di interesse veniva normalizzata su quella della  $\beta$ -actina e riportata come valore relativo all'intensità della banda corrispondente al controllo posta uguale a 1.

## **STRIPPING DELLE MEMBRANE DI PVDF**

Le membrane di PVDF potevano essere utilizzate più volte per individuare proteine diverse impiegando specifici anticorpi. Quindi si procedeva inducendo il distacco dalla membrana degli anticorpi precedentemente legati mediante l'impiego di stripping buffer, un tampone contenente quantità definite di agente denaturante e riducente. La membrana veniva incubata in agitazione nel tampone di stripping per 40 minuti a 37°C ed in seguito lavata con TTBS 0.1% per 5 volte per 5 minuti, al fine di eliminare il residuo del tampone di stripping. La membrana veniva nuovamente bloccata con una soluzione di TTBS 0.1% addizionato con BSA 1% ed infine si procedeva con incubazioni successive con l'anticorpo primario e secondario fino all'immuno-rivelazione.

## **VALUTAZIONE DELLA PROLIFERAZIONE DELLE CELLULE SATELLITI MEDIANTE INCORPORAZIONE DI TIMIDINA TRIZIATA**

Le cellule venivano piastrate in multiwell da 12 pozzetti in terreno di proliferazione. Quando raggiungevano una confluenza del 60%, venivano starvate, cioè private dei fattori di crescita, per 24 h: il mezzo di proliferazione veniva sostituito con DMEM addizionato con BSA 0.1%. La starvazione consente di sincronizzare le cellule ed ottenere la massima risposta alla stimolazione. Le cellule venivano successivamente stimulate con S1P 1 µM o LPA 5 µM per 20 h. Quando previsto le cellule satelliti venivano sottoposte a pre-trattamento con inibitori di SphK o antagonisti specifici per S1PRs o LPARs per 30 minuti prima dell'aggiunta dell'agonista. Nelle ultime 4 h di stimolazione, veniva somministrata timidina triziata, 0.5 µCi/pozzetto. Al termine della marcatura, venivano eseguiti due lavaggi con PBS freddo e ad ogni pozzetto venivano aggiunti 500 µl di acido tricloroacetico (TCA) al 10%, al fine di favorire la precipitazione delle proteine e degli acidi nucleici. Dopo 5 minuti di incubazione in ghiaccio, si aspirava il TCA e si aggiungevano 250 µl/pozzetto di una miscela Etanolo:Etere 3:1 e si lasciava sotto cappa aspirante fino a completa evaporazione. Quindi si aggiungevano 500 µl/pozzetto di NaOH 0.25 M e si procedeva con l'incubazione per un'ora a 37°C. Per ogni campione veniva prelevata un'aliquota di 400 µl che veniva addizionata con 3.5 ml di liquido di scintillazione per la misura della radioattività, e quindi dell'incorporazione di [<sup>3</sup>H]-timidina, tramite scintillatore in fase liquida.

## SAGGI DI MIGRAZIONE DI CELLULE SATELLITI

Per il saggio ChemoTx, le cellule satelliti venivano tenute in coltura con il mezzo di proliferazione fino al raggiungimento di un 60-70% di confluenza, dopodichè venivano private di nutrienti per una notte in DMEM contenente 0.1% BSA. Le cellule venivano lavate due volte con PBS e poi incubate per 30 minuti a 37°C in presenza di 1 µM calceina-AM (calcein acetoxymethyl ester). La Calceina AM è un composto ad alta permeabilità e non fluorescente molto usato per determinare la vitalità cellulare, per saggi di invasione, adesione e migrazione cellulare. La calceina viene idrolizzata dalle esterasi intracellulari e si ottiene l'anione calceina che presenta una fluorescenza verde molto marcata. L'intensità di fluorescenza risulta proporzionale alla quantità di cellule vitali presenti. Una volta colorate le cellule, si effettuavano 3 lavaggi con PBS e poi si staccavano mediante tripsinizzazione. Il saggio ChemoTx avveniva su piastre da 96 pozzetti (ChemoTx® Disposable Chemotaxis System). Venivano poste all'incirca 8000 cellule sopra i filtri mentre i pozzetti venivano riempiti con DMEM contenente agonisti o meno. Si proseguiva poi con una incubazione per 8 h a 37°C dopo la quale si rimuovevano delicatamente le cellule non migrate dalla superficie del filtro usando un cotton fioc.

La fluorescenza delle cellule migrate in fondo alla cameretta, veniva misurata tramite un lettore di fluorescenza per micropiastre (Fluoroskan Ascent FL, ThermoElectron Corporation, Eccitazione, 485 nm; Emissione, 538 nm). La fluorescenza veniva convertita in numero di cellule in base ad una curva standard generata dalla fluorescenza emessa da quantità note di cellule satelliti presenti in alcuni pozzetti.

Saggi di wound healing (rigenerazione della lesione) venivano effettuati piastrandolo cellule satelliti in piastre da 12 pozzetti fino a raggiungere una densità cellulare di  $1 \times 10^5$  cell/pozzetto e mantenute a 37°C e 5% CO<sub>2</sub> per 24 h fino a confluenza, prima di privarle di nutrienti per una notte. Successivamente veniva effettuata una lesione al monostrato cellulare con una punta sterile da 200 µl. Il monostrato veniva poi lavato due volte con DMEM contenente 0.1% di BSA per rimuovere residui cellulari ed incubato con o senza S1P (20 nM) o HGF (10 ng/ml).

Venivano fotografati almeno sei campi per ogni campione, tramite una fotocamera Nikon digitale collegata ad un microscopio a contrasto di fase Nikon ELWD 0.3, al tempo 0 e dopo 8 h di incubazione. La migrazione delle cellule satelliti veniva poi quantificata calcolando il numero di cellule migrate nella zona lesionata dopo 8 h.

Un metodo alternativo di valutazione della capacità migratoria delle cellule satelliti è il

saggio con camere di Boyden. Venivano utilizzati dei filtri in policarbonato con pori di 8  $\mu\text{m}$ , rivestiti con matrigel (250  $\mu\text{g/ml}$ ) per 60 minuti a 37°C.

Le cellule satelliti venivano tripsinizzate e risospese in DMEM con 250  $\mu\text{g/ml}$  BSA e poi poste ( $2 \times 10^4$  cellule) nella camera sovrastante, mentre nella camera sottostante si aggiungeva S1P 20 nM o LPA 1  $\mu\text{M}$ . Il tutto veniva poi messo ad incubare a 37°C in atmosfera umidificata contenente un 5%  $\text{CO}_2$  per 7 h. I filtri venivano poi fissati una notte con metanolo a 4°C e dopo aver rimosso le cellule non migrate, colorati con soluzione Diff-Quick. La migrazione cellulare è stata valutata contando il numero di cellule migrate in sei campi di ciascun filtro, scelti arbitrariamente. Ogni condizione è stata effettuata in triplicato.

### **ANALISI STATISTICA**

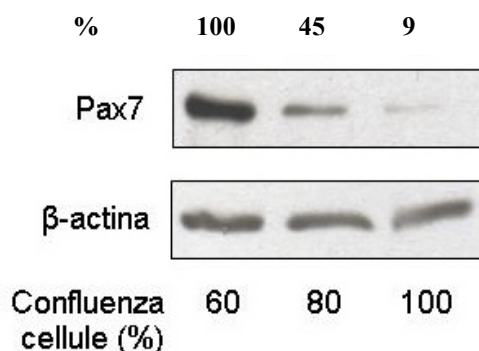
I dati sono stati analizzati mediante il Test t di Student ed un  $p < 0.05$  è stato considerato significativo.

## **RISULTATI I PARTE**

### **SFINGOSINA 1-FOSFATO MEDIA LA PROLIFERAZIONE E LA MIGRAZIONE DI CELLULE SATELLITI MURINE**

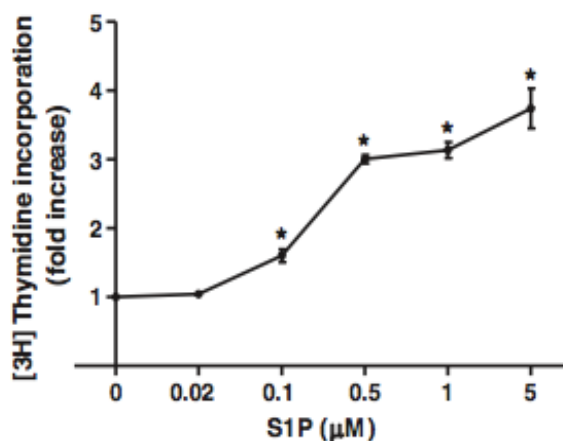
Le cellule satelliti, sebbene mitoticamente quiescenti, in seguito a danno si attivano, proliferano, migrano verso il sito lesionato, dove continuano a dividersi, differenziano e infine si fondono alle fibre danneggiate o a quelle già esistenti. Tuttavia i meccanismi molecolari che regolano la proliferazione e la migrazione delle cellule satelliti in risposta a danno sono stati solo in parte chiariti.

Inizialmente sono stati condotti degli esperimenti al fine di accertare la staminalità delle cellule satelliti impiegate come modello sperimentale. Studi presenti in letteratura hanno identificato alcuni dei marcatori molecolari espressi dalle cellule satelliti murine, quali Pax7, MyoD e Myf5. L'attivazione delle cellule satelliti è associata all'induzione dell'espressione di MyoD e Myf5 dipendente dal fattore di trascrizione Pax7 che è coinvolto nel mantenimento del compartimento staminale e nella repressione dei geni necessari per il differenziamento (Shi and Garry, 2006). Pax7 è stato impiegato in questo studio come marcatore di staminalità della popolazione di cellule satelliti isolata. Come mostrato in figura 11, mediante analisi Western Blotting è stata valutata la variazione dell'espressione della proteina in funzione della confluenza cellulare: l'espressione di Pax7 è diminuita all'aumentare della confluenza cellulare e, di conseguenza, all'aumentare del grado di commissionamento delle cellule. Questi risultati hanno confermato quindi la staminalità della popolazione di cellule satelliti isolata.



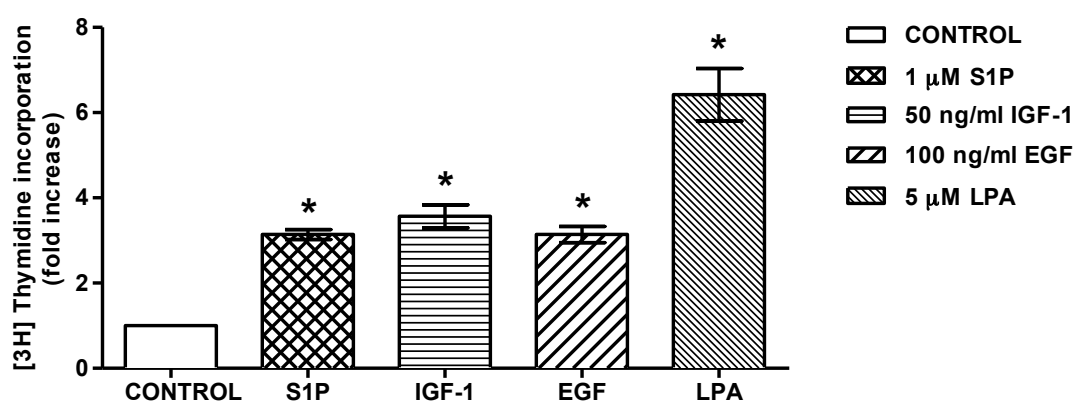
**Fig. 11. Espressione di Pax7 in cellule satelliti murine.** Analisi Western Blotting per valutare l'espressione di Pax7 in cellule satelliti coltivate in terreno di proliferazione alla confluenza pari al 60- 80- 100% per valutarne le caratteristiche di staminalità. I lisati totali (20  $\mu$ g) sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivamente ad analisi Western Blotting. L'intensità delle bande è riportata come percentuale dell'intensità della banda rispetto al campione al 60% di confluenza, preso uguale a 100. L'analisi dell'espressione della  $\beta$ -actina è stata effettuata per verificare l'applicazione di uguali quantità di proteine. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi.

Per identificare il ruolo biologico di S1P in cellule satelliti, è stato per prima cosa valutato l'effetto dello sfingolipide sull'incorporazione di timidina triziata in cellule satelliti isolate dai muscoli tibiale anteriore, soleus, gastrocnemio e EDL di topi C57BL/6, mantenute per 24 h in DMEM contenente BSA 0.1% e incubate per 20 h con diverse concentrazioni del lipide bioattivo. L'effetto di S1P sulla proliferazione di cellule satelliti era dose dipendente, con  $EC_{50}$  di 150 nM (Fig. 12).



**Fig. 12. Dose dipendenza di S1P sulla proliferazione di cellule satelliti.** Cellule al 60% di confluenza e private di nutrienti per 24 h sono state stimulate con le concentrazioni indicate di S1P per 20 h. [ $^3$ H]-timidina (0.5  $\mu$ Ci/well) è stata aggiunta durante le ultime 4 h di incubazione. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo preso uguale a 1. L'effetto di S1P è ritenuto statisticamente significativo (\* $p < 0,05$ , Test t di Student).

Successivamente è stata esaminata l'azione di S1P sulla proliferazione cellulare in confronto all'effetto evocato da altri segnali extracellulari quali IGF-1 (50 ng/ml), EGF (100 ng/ml) e LPA (5  $\mu$ M). I risultati illustrati in figura 13 mostrano che S1P ha stimolato significativamente la duplicazione di DNA in cellule satelliti, confermando quanto emerso dagli esperimenti di dose dipendenza e in pieno accordo con uno studio precedente (Nagata et al., 2006). È interessante notare che la capacità di S1P nell'indurre la risposta mitogenica è comparabile a quella evocata da IGF-1 e EGF, mentre è leggermente inferiore rispetto a quella indotta da LPA, lisofosfolipide il cui ruolo mitogenico nelle cellule satelliti non è mai stato descritto in letteratura.

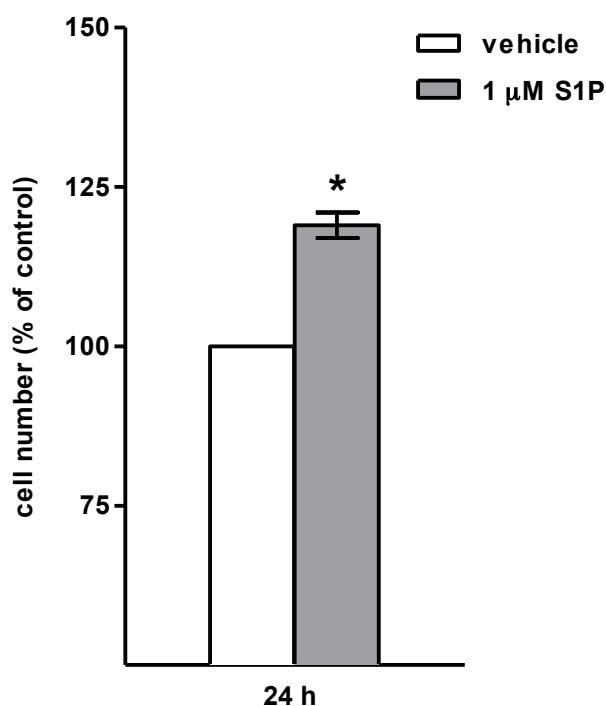


**Fig. 13: Valutazione della proliferazione di cellule satelliti.** L'incorporazione di [ $^3$ H]-timidina è stata misurata in cellule satelliti, private di nutrienti per 24 h, al 60% di confluenza e trattate con le concentrazioni di S1P, IGF-1, EGF o LPA indicate per 20 h. [ $^3$ H]-timidina (0.5  $\mu$ Ci/well) è stata aggiunta nelle ultime 4 h di incubazione. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo preso uguale a 1. L'effetto di tutti gli agonisti usati è statisticamente significativo (\* $p < 0,05$ , Test t di Student).



Inoltre l'azione stimolatoria di S1P sulla proliferazione cellulare è stata confermata anche da esperimenti di conta cellulare dove il lipide bioattivo era capace di incrementare il numero di cellule dopo 24 h di trattamento con lo sfingolipide alla concentrazione 1  $\mu$ M (Fig. 14).

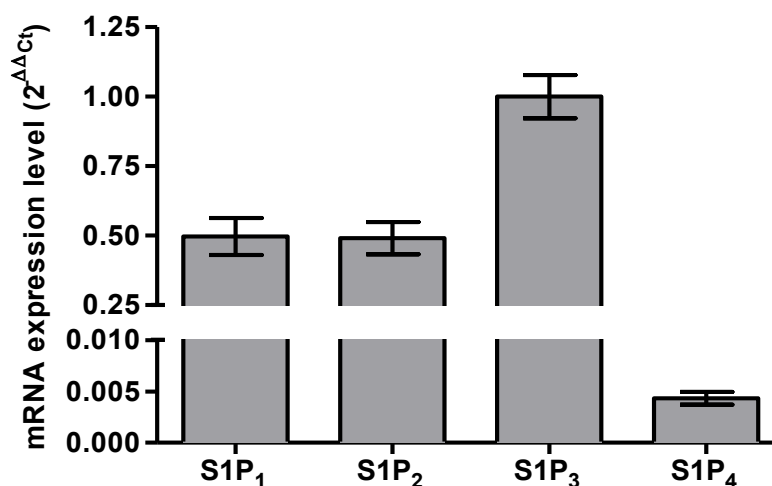
Questi risultati dimostrano quindi che S1P, in queste cellule, si comporta da mitogeno, inducendone la proliferazione.



**Fig. 14. Effetto di S1P sulla proliferazione di cellule satelliti determinata mediante conteggio.** Cellule satelliti private di nutrienti per 24 h, sono state stimulate con S1P 1  $\mu$ M per 24 h prima di essere contate con la camera di Bürker. L'effetto di S1P è statisticamente significativo (\* $p < 0,05$ , Test t di Student).

Il meccanismo molecolare attraverso il quale S1P svolge effetti biologici distinti è piuttosto complesso e coinvolge sia il legame a target intracellulari sia il legame a specifici recettori di membrana detti S1PRs. Poiché nelle cellule *reserve*, che sono simili alle cellule satelliti, è stato dimostrato che l'azione mitogenica di S1P dipende dai S1PRs (Rapizzi et al., 2008), è stato stabilito il ruolo di S1PRs nell'azione mitogenica dello sfingolipide nelle cellule satelliti. A questo scopo è stato per prima cosa valutato il profilo di espressione a livello di RNA messaggero delle diverse isoforme recettoriali mediante analisi Real-Time PCR, utilizzando sonde Taq-Man Gene Expression Assay. Attraverso tale tecnica è stato verificato che in cellule satelliti murine erano espressi quattro dei cinque recettori per S1P,

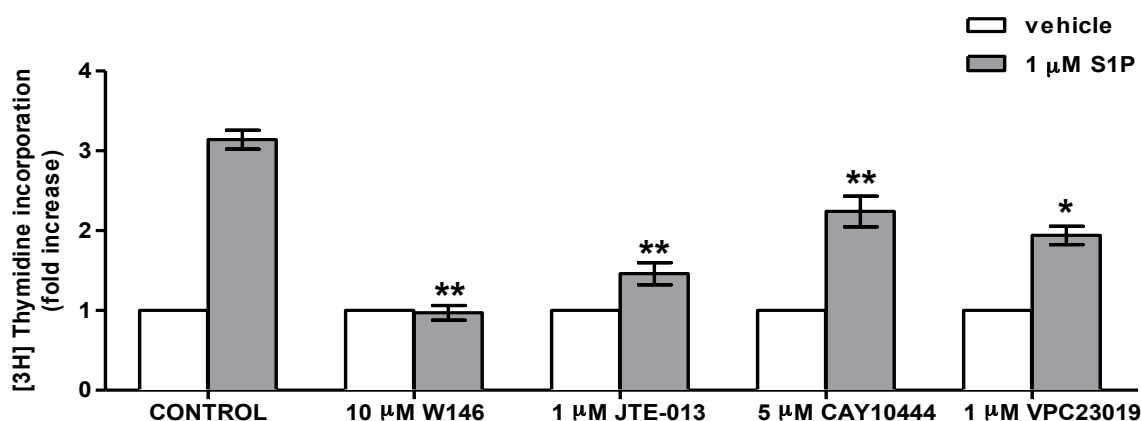
con il seguente profilo di espressione  $S1P_3 > S1P_1 = S1P_2 \gg S1P_4$ , mentre  $S1P_5$  non era rilevabile (Fig. 15).



**Fig. 15. Espressione di mRNA delle isoforme S1PR in cellule satelliti murine.** Analisi RT-PCR Real-Time è stata effettuata, utilizzando sonde murine specifiche per le varie isoforme recettoriali, a partire da cDNA ottenuti con RT-PCR di 2  $\mu$ g di RNA totale purificato da cellule satelliti. I risultati riportati sono espressi come media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti con risultati analoghi. Il gene normalizzatore è il 18S, mentre il calibratore di ciascun campione è  $S1P_3$ .

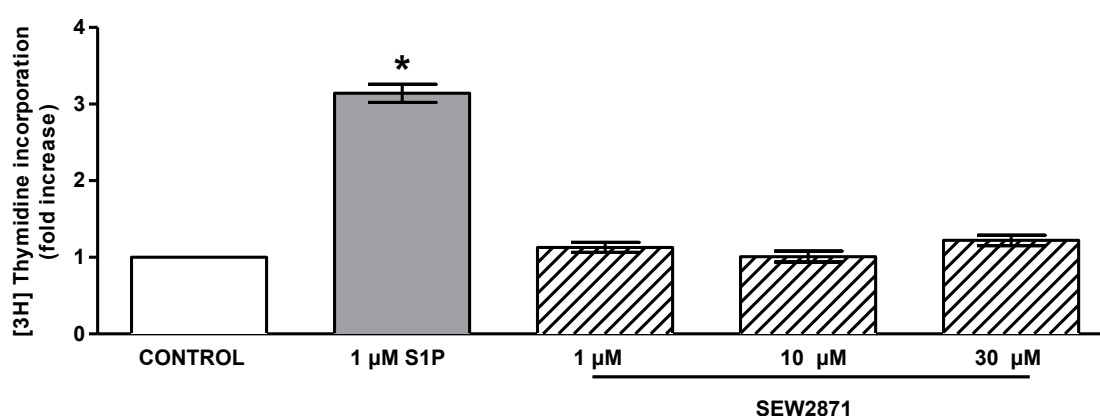
Per indagare il ruolo dei S1PRs nel meccanismo attraverso il quale lo sfingolipide stimola la mitogenesi di cellule satelliti sono stati impiegati approcci farmacologici e genetici.

È stata quindi valutata la proliferazione cellulare, sempre mediante saggio di incorporazione di timidina triziata, in campioni pre-trattati per 30 minuti con antagonisti selettivi per ciascun recettore e stimolati o meno con S1P 1  $\mu$ M per 20 h. I risultati ottenuti hanno confermato che in cellule satelliti S1P ha indotto un aumento significativo della sintesi di DNA (\* $p < 0.05$ ) (fig. 16). Inoltre nella figura 16 è mostrato che tutti gli antagonisti utilizzati hanno alterato la risposta mitogenica evocata da S1P: infatti l'impiego dell'antagonista specifico per  $S1P_1$ , W146, e per  $S1P_{2/4}$ , JTE-013, ha annullato la proliferazione delle cellule satelliti indotta dal lipide bioattivo. Inoltre il trattamento con l'antagonista specifico per  $S1P_3$ , CAY10444, così come quello per  $S1P_{1/3}$ , VPC23019, ha ridotto fortemente l'incorporazione di timidina triziata stimolata da S1P in cellule satelliti, suggerendo quindi che tutte le isoforme recettoriali  $S1P_1$ ,  $S1P_2$ ,  $S1P_3$  e  $S1P_4$  erano coinvolte nell'azione mitogenica dello sfingolipide.



**Fig. 16. Effetto degli antagonisti dei S1PRs sull'azione proliferativa di S1P.** Cellule al 60% di confluenza sono state private di nutrienti per 24 h e pre-trattate con W146 10μM, JTE-013 1μM, CAY10444 5μM o VPC23019 1μM 30 min prima di essere stimulate con S1P 1μM per 20 h. [<sup>3</sup>H]-timidina (0.5 μCi/well) è stata aggiunta nelle ultime 4 h di incubazione. I dati sono la media ± SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo posto uguale a 1. L'effetto di tutti gli antagonisti usati è statisticamente significativo (\*p<0.05; \*\*p<0.01, Student t Test).

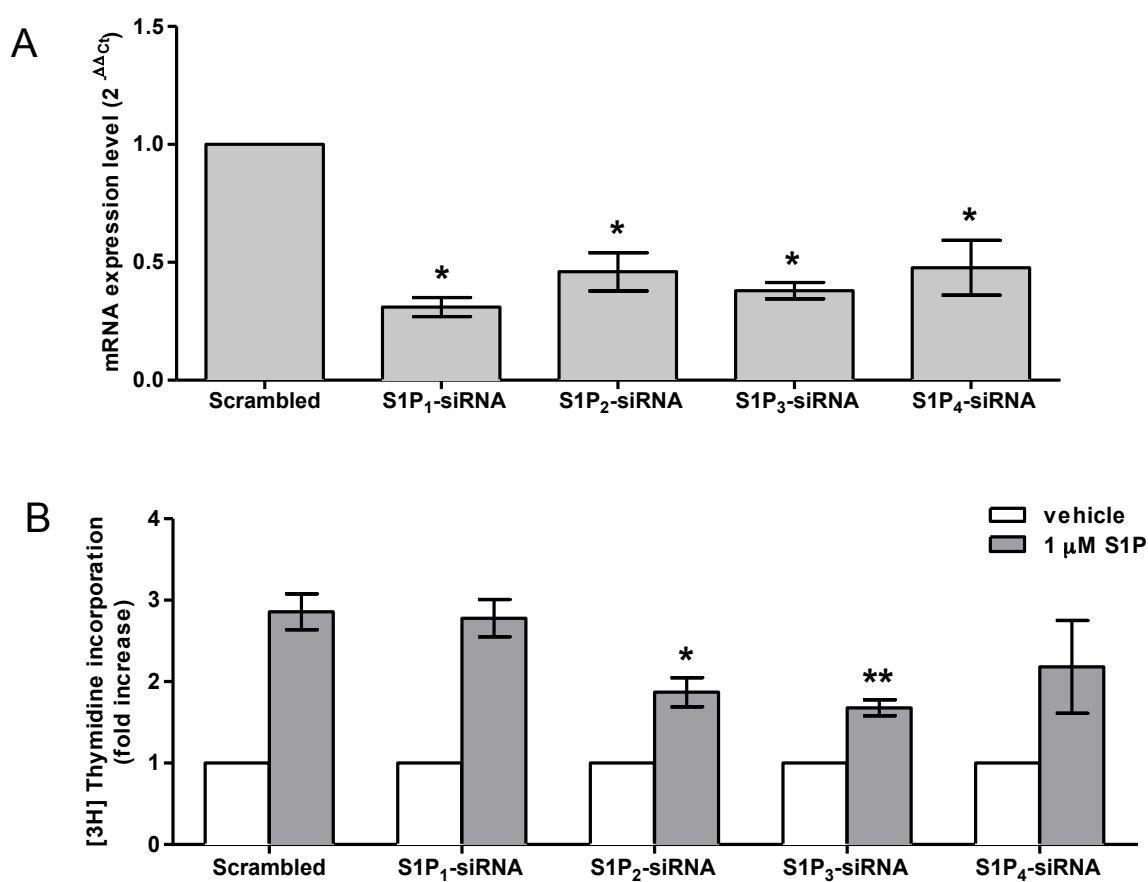
Contrariamente a quanto emerso dall'utilizzo degli antagonisti dei S1PRs, il trattamento per 20 h con l'agonista selettivo di S1P<sub>1</sub>, SEW2871, non ha causato alcun incremento della duplicazione del DNA rispetto al controllo, nonostante sia stato impiegato anche ad alte concentrazioni (30 μM) (Fig. 17), suggerendo che almeno alcuni tra questi composti farmacologici alle concentrazioni utilizzate possano esercitare effetti aspecifici in questo contesto cellulare (Salomone et al., 2011; Pyne et al., 2011).



**Fig. 17. Effetto dell'agonista specifico per S1P<sub>1</sub>, SEW2871, sulla proliferazione indotta da S1P.** Cellule al 60% di confluenza sono state private di nutrienti per 24 h e trattate con le concentrazioni indicate di SEW2871 o con S1P 1μM per 20 h. [<sup>3</sup>H]-Timidina (0.5μCi/well) è stata aggiunta durante le ultime 4 h di incubazione. I risultati sono la media ± SEM di almeno 3 esperimenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo preso uguale a 1. L'effetto di SEW2871 non è statisticamente significativo (\*p<0.05, Student t Test).

Per studiare il ruolo di ogni sottotipo recettoriale nell'azione pro-mitogenica di S1P in cellule satelliti, i singoli S1PRs sono stati silenziati tramite l'impiego di specifici siRNA. Come illustrato in figura 18A, in questa condizione sperimentale adottata, l'interferenza a RNA ha ridotto l'espressione di ciascun S1PR di almeno il 50%.

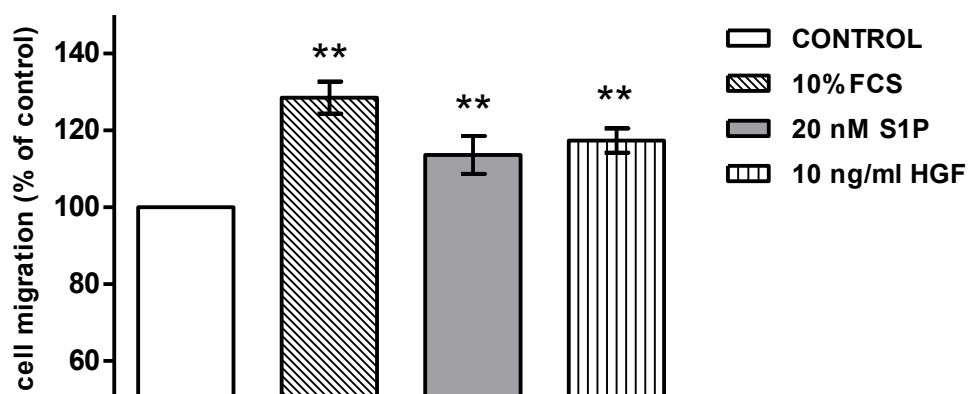
La valutazione dell'attività proliferativa di S1P in cellule satelliti trasfettate con i siRNA specifici per S1P<sub>1</sub> o S1P<sub>4</sub> non ha evidenziato alcuna alterazione dell'effetto indotto dallo sfingolipide. Al contrario, quando S1P<sub>2</sub> o S1P<sub>3</sub> erano down-regolati, l'efficacia di S1P è stata ridotta di circa il 40%, dimostrando chiaramente che entrambi i recettori sono coinvolti nella trasmissione dell'azione mitogenica di S1P in queste cellule (Fig. 18B).



**Fig. 18. Effetto del silenziamento dei S1P<sub>1-4</sub> sulla proliferazione cellulare S1P dipendente.** (A) Analisi RT-PCR Real-Time è stata effettuata in cellule satelliti trasfettate con scrambled siRNA o siRNA specifici per S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub> e S1P<sub>4</sub>. I dati sono la media ± SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. L'effetto della trasfezione dei siRNA sui livelli di mRNA dei S1PR è statisticamente significativo. (B) Effetto del silenziamento dei S1PRs sull'effetto pro-mitogenico di S1P. Cellule satelliti sono state trasfettate con scrambled siRNA o siRNA specifici per S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub> e S1P<sub>4</sub> prima di essere stimolate con S1P 1 μM per 20 h. [<sup>3</sup>H]-timidina (0.5 μCi/well) è stata aggiunta nelle ultime 4 h di incubazione. I dati sono la media ± SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. L'effetto del silenziamento di S1P<sub>2</sub> e S1P<sub>3</sub> sulla proliferazione indotta da S1P è statisticamente significativo (\*p<0.05; \*\*p<0.01, Student t Test).

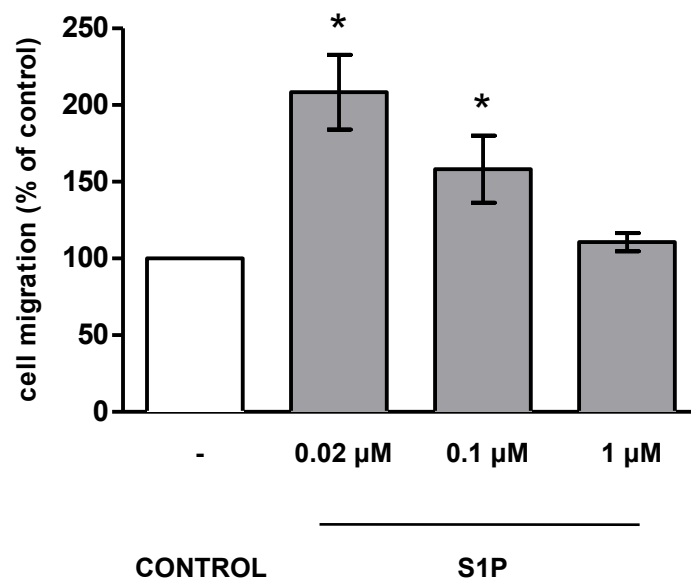
Successivamente è stato esaminato se S1P fosse in grado di influenzare la migrazione di cellule satelliti murine, effetto biologico che risulta cruciale per il loro corretto reclutamento al sito di danno muscolare. Considerando la distribuzione diffusa di questo tipo cellulare nel muscolo non danneggiato, si può ipotizzare che l'accumulo di un'ampia popolazione di mioblasti attivati al sito di danno possa richiedere una motilità direzionata. Dati preliminari ottenuti *in vivo* sono coerenti con questa ipotesi, suggerendo che le satelliti attivate oltre ad attraversare l'intera lunghezza di una miofibra possono anche migrare attraverso le fibre muscolari (Siegel et al., 2009). Tuttavia sono ancora scarse le conoscenze a tale riguardo.

Attraverso il ChemoTx® Disposable Chemotaxis System è emerso che S1P alla concentrazione 20 nM ha capacità chemo-attrattante paragonabile all'azione promigratoria di HGF, riportato in letteratura come potente chemo-attrattante per molte linee cellulari primarie (Le Grand et al., 2007; Allen et al., 1995), incluse le cellule satelliti, e leggermente inferiore a quella del siero utilizzato in questo caso come controllo positivo (Fig. 19).



**Fig. 19. Effetto di S1P sulla migrazione di cellule satelliti.** La migrazione delle cellule satelliti è stata misurata con il 96-well ChemoTx® Disposable Chemotaxis System in risposta a FCS 10%, S1P 20 nM e HGF 10 ng/ml per 8 h. I risultati riportati sono la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. L'effetto di S1P, HGF e FCS sulla migrazione è statisticamente significativo (\* $p < 0.05$ , Student t Test)

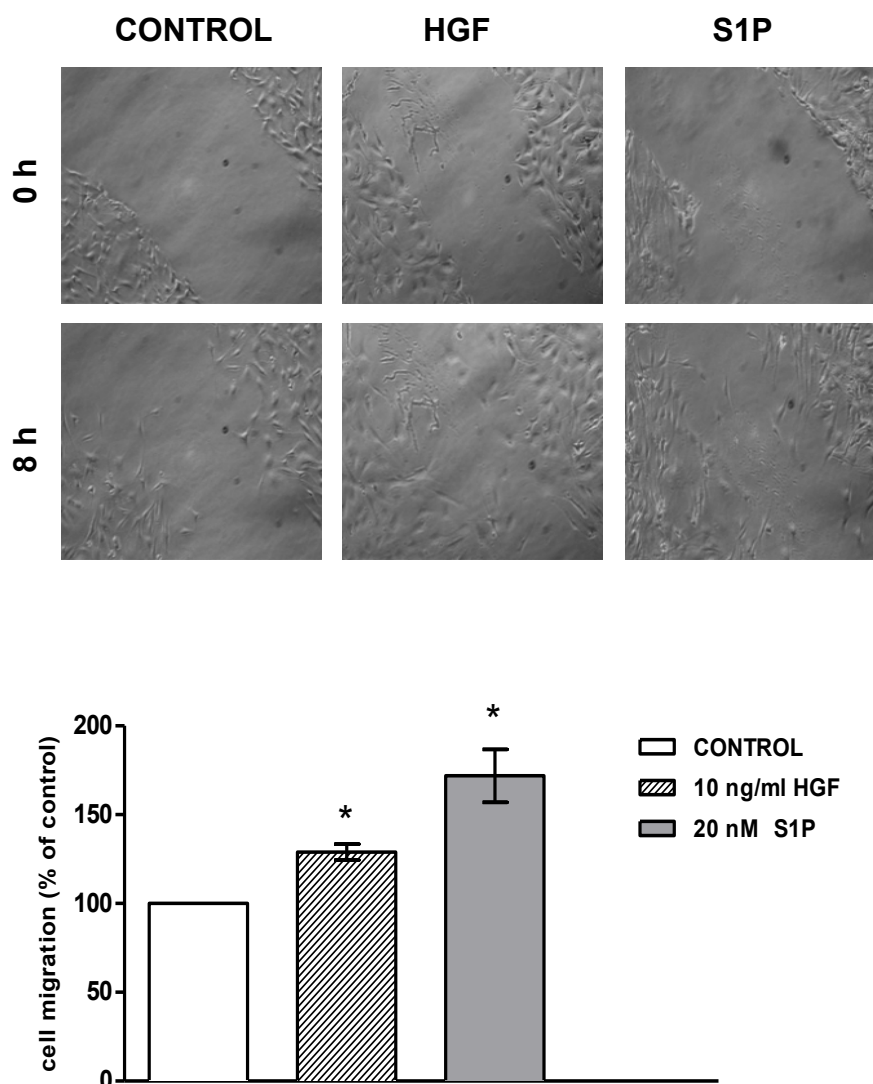
La motilità cellulare è stata valutata anche mediante utilizzo delle camere di Boyden in risposta a differenti concentrazioni di S1P dopo 7 h di incubazione. Come si può osservare in figura 20, l'effetto biologico massimo di S1P era dato dalla concentrazione di 20 nM, mentre la potenza del lipide diminuiva progressivamente via via che le concentrazioni diventavano più elevate.



**Fig. 20.** La motilità delle cellule satelliti è stata valutata con camere di Boyden in risposta alle concentrazioni indicate di S1P per 7 h. Il numero di cellule migrate nel controllo era  $413 \pm 55$ . I risultati riportati sono la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. L'effetto di S1P sulla migrazione è statisticamente significativo ( $*p < 0.05$ , Student t Test).

L'alta efficienza di S1P come induttore della motilità di cellule satelliti è stata confermata anche da esperimenti di *wound healing*, metodica sviluppata per studiare la migrazione direzionale delle cellule *in vitro*, mimando la migrazione cellulare durante la riparazione della ferita *in vivo*.

I risultati illustrati in figura 21 confermano che S1P 20 nM è stato in grado di stimolare la migrazione cellulare in misura maggiore rispetto a HGF.



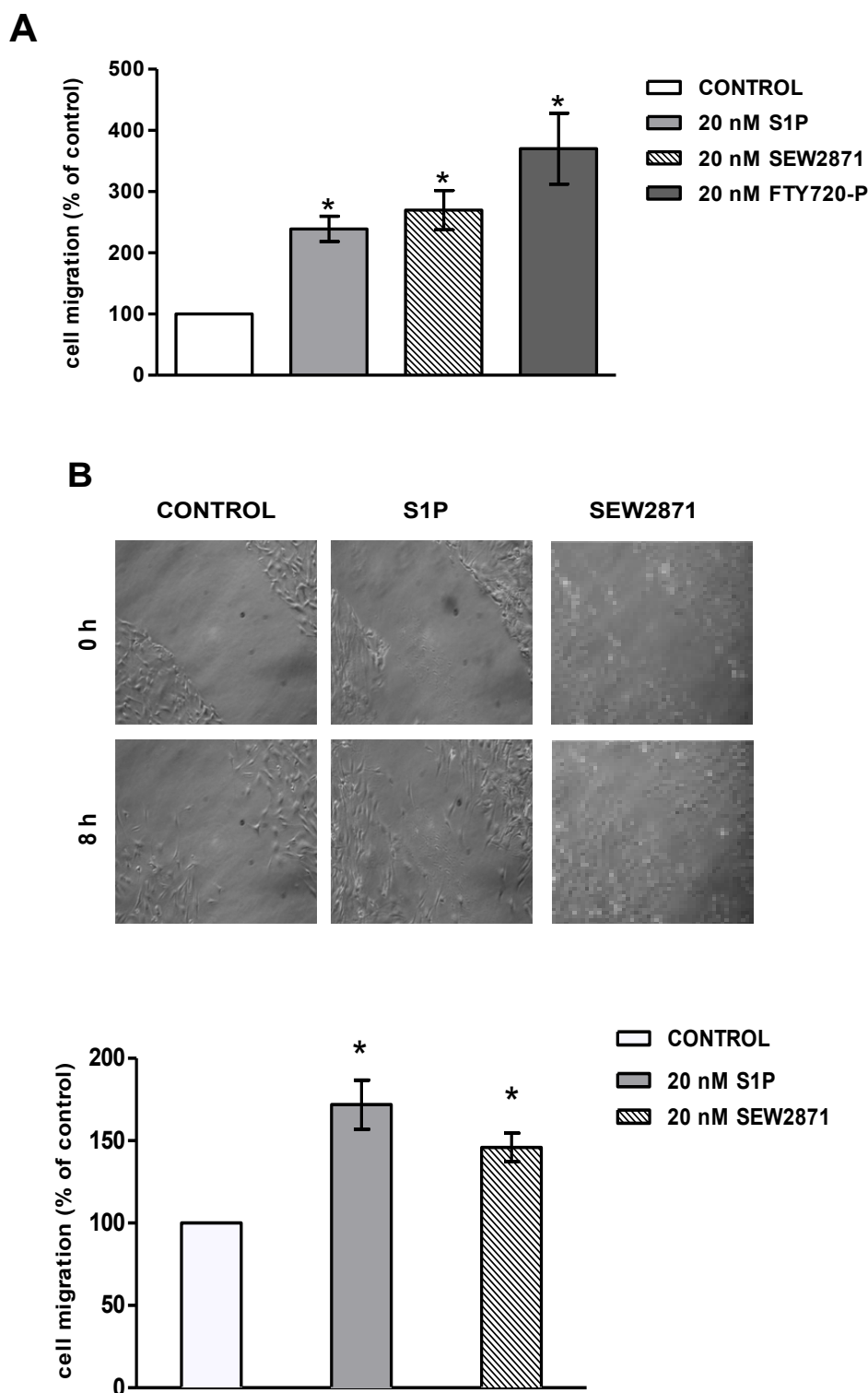
**Fig. 21. Saggio di wound healing** effettuato in cellule satelliti stimulate con HGF 10 ng/ml e S1P 20 nM per 8 h. Pannello superiore: immagini microscopiche rappresentative a 0 h e 8 h. Pannello inferiore: analisi quantitativa della migrazione cellulare dopo 8 h. I risultati riportati sono la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come percentuale rispetto al controllo, posto uguale a 100. L'effetto degli agonisti è statisticamente significativo (\* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , Student t Test).

Al fine di esaminare il ruolo dei recettori S1PRs nell'azione pro-migratoria di S1P sono stati condotti esperimenti utilizzando approcci farmacologici e genetici.

L'agonista specifico per il recettore S1P<sub>1</sub>, SEW2871, ha stimolato notevolmente la migrazione di cellule satelliti, come si evince dai risultati emersi mediante utilizzo di camere di Boyden (Fig. 22A) e *wound healing* (Fig. 22B).

Inoltre la forma fosforilata dell'immunomodulatore FTY720 (FTY720-P), che lega tutti i recettori per S1P ad eccezione dell'isoforma S1P<sub>2</sub>, ha stimolato la migrazione cellulare in misura simile (Fig. 22A).

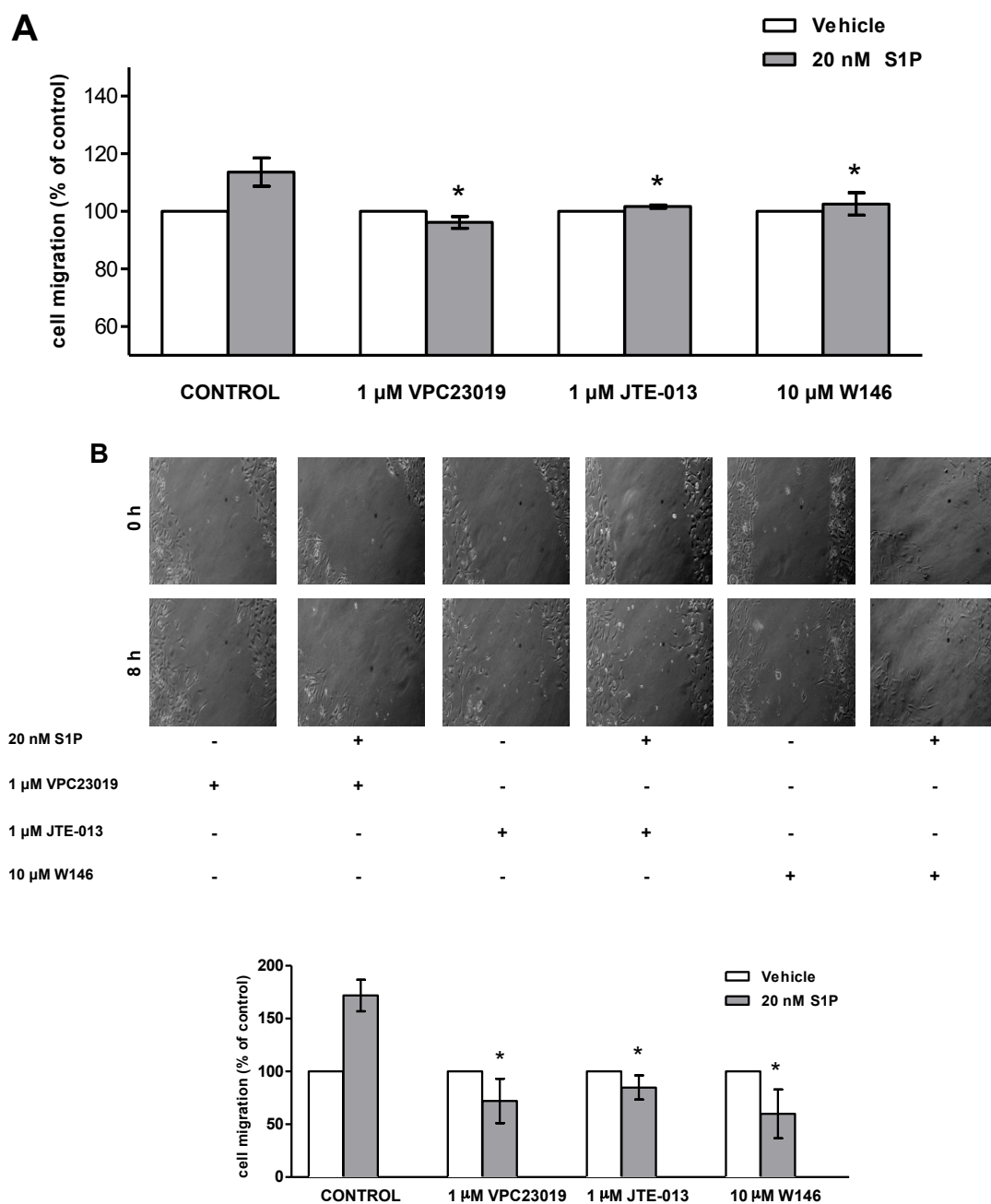




**Fig. 22. Ruolo degli agonisti dei S1PRs nell'azione pro-migratoria indotta da S1P in cellule satelliti.** (A) La migrazione cellulare è stata misurata tramite camere di Boyden in risposta a S1P 20 nM, SEW2871 20 nM e FTY720-P 20 nM per 7 h. I risultati sono riportati come percentuali rispetto al controllo, preso uguale a 100. I dati sono la media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato (B) Saggio wound healing eseguito in cellule satelliti stimolate con S1P 20 nM o SEW2871 20 nM per 8 h. Pannello superiore: immagini microscopiche rappresentative a 0 e 8 h. Pannello inferiore: analisi quantitativa della migrazione cellulare dopo 8 h. L'effetto di SEW2871 e FTY720-P è statisticamente significativo (\* $p < 0.05$ , Student t Test).

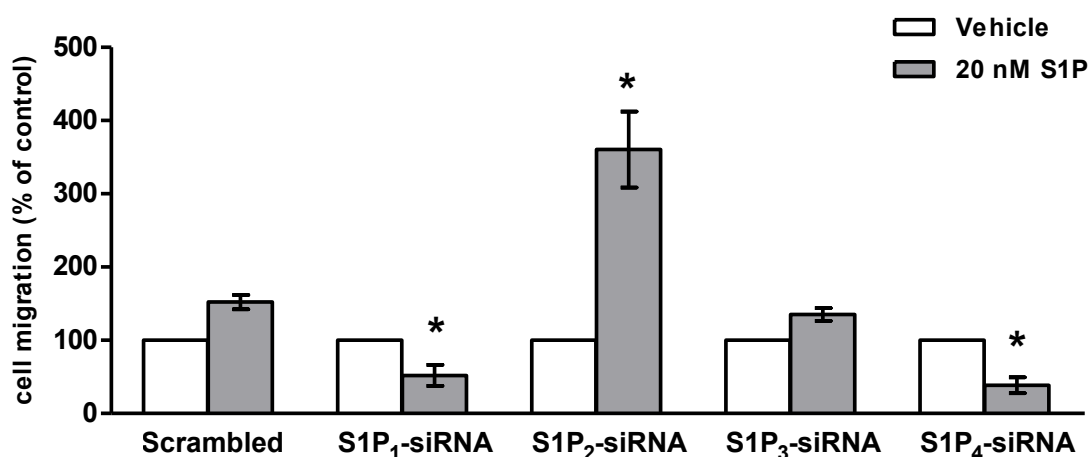
Sono stati utilizzati in seguito antagonisti selettivi per ciascun recettore per S1P, 30 minuti prima dell'incubazione con lo sfingolipide.

Il trattamento delle cellule satelliti con l'antagonista specifico per S1P<sub>1/3</sub>, VPC23019, ha abolito la migrazione cellulare in risposta a S1P. Anche JTE-013, antagonista dei recettori S1P<sub>2/4</sub>, ha determinato una riduzione della motilità delle cellule satelliti, seppur in minor misura rispetto all'inibizione indotta dall'antagonista dei recettori S1P<sub>1/3</sub> (Fig. 23). Da questi risultati emerge un possibile coinvolgimento dei recettori S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub> e S1P<sub>4</sub> nel mediare l'azione biologica del lipide.



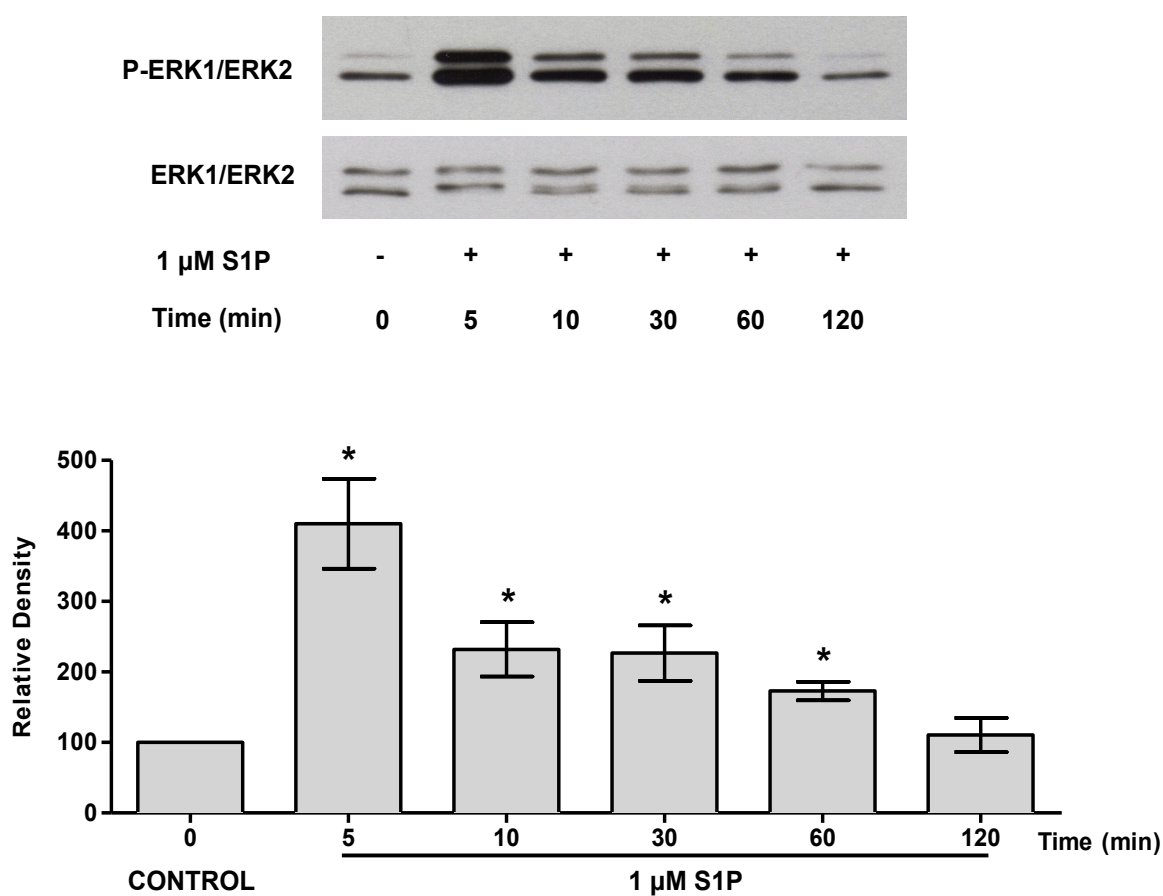
**Fig. 23. Effetto degli antagonisti dei S1PRs sulla migrazione indotta da S1P.** La migrazione di cellule satelliti è stata misurata dopo 30 min di pre-trattamento con VPC23019 1  $\mu$ M, JTE-013 1  $\mu$ M e W146 10  $\mu$ M, in risposta a S1P 20 nM 8 h mediante il 96-well ChemoTx disposable chemotaxis system (A) e *wound healing* (B). Pannello superiore: immagini microscopiche rappresentative a 0 e 8 h. Pannello inferiore: analisi quantitativa della migrazione cellulare dopo 8 h. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e sono riportati come percentuale rispetto al controllo, posto uguale a 100. L'effetto degli antagonisti è statisticamente significativo (\* $p < 0.05$ , Student t Test)

Per studiare il ruolo di ogni sottotipo recettoriale nell'azione pro-migratoria di S1P in cellule satelliti, i singoli S1PRs sono stati silenziati tramite l'impiego di specifici siRNA. Il silenziamento specifico di ogni sottotipo recettoriale per S1P ha contrariamente dimostrato il ruolo cruciale dei recettori S1P<sub>1/4</sub> nel mediare l'effetto chemiotattico di S1P in cellule satelliti. Infatti il silenziamento di queste due isoforme recettoriali ha determinato l'inibizione della migrazione indotta da S1P dopo 7 h di incubazione. Inoltre, l'interferenza a RNA oltre a escludere il ruolo dei recettori S1P<sub>2/3</sub> in questo effetto biologico, mette in risalto un ruolo anti-migratorio di S1P<sub>2</sub> in quanto la sua specifica down-regolazione ha causato un incremento circa di due volte della motilità cellulare indotta da S1P (Fig. 24).



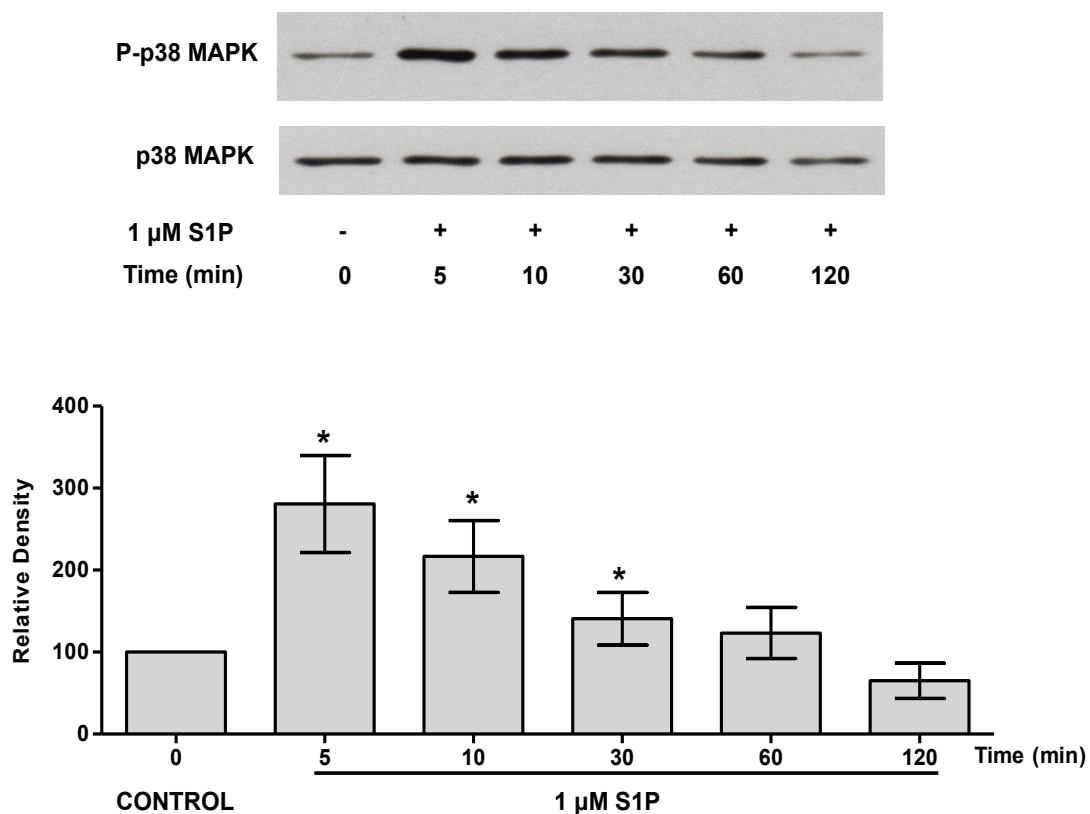
**Fig. 24. Effetto del silenziamento dei S1P<sub>1-4</sub> sulla migrazione cellulare S1P dipendente.** Cellule satelliti sono state trasfettate con scrambled siRNA o siRNA specifici per S1P<sub>1</sub>, S1P<sub>2</sub>, S1P<sub>3</sub> e S1P<sub>4</sub>. La migrazione delle cellule satelliti trasfettate è stata misurata con camere di Boyden in risposta a S1P 20 nM dopo 7 h. La down-regolazione di S1P<sub>1</sub> e S1P<sub>4</sub> ha ridotto significativamente la migrazione stimolata da S1P mentre la down-regolazione di S1P<sub>2</sub> ha aumentato in maniera significativa la chemotassi indotta dallo sfingolipide (\*p<0.05, Student t Test).

Al fine di chiarire il meccanismo molecolare alla base della proliferazione e della migrazione indotte da S1P, abbiamo caratterizzato inizialmente le vie di segnalazione attivate dal trattamento con lo sfingolipide in cellule satelliti, focalizzando l'attenzione su proteine chinasi note per essere coinvolte nella regolazione della proliferazione e della migrazione cellulare, tra cui p38 MAPK, ERK1/2 e la PI3K/Akt. Mediante analisi Western Blotting condotte usando un anticorpo specifico per la forma fosforilata di ERK1/2 è stato dimostrato che S1P provocava un rapido e transitorio aumento della forma fosforilata di tale chinasi in cellule satelliti: la fosforilazione era massima a 5 minuti di stimolazione, diminuendo ad intervalli di tempo successivi, anche se ancora apprezzabile a 60 minuti (Fig. 25).



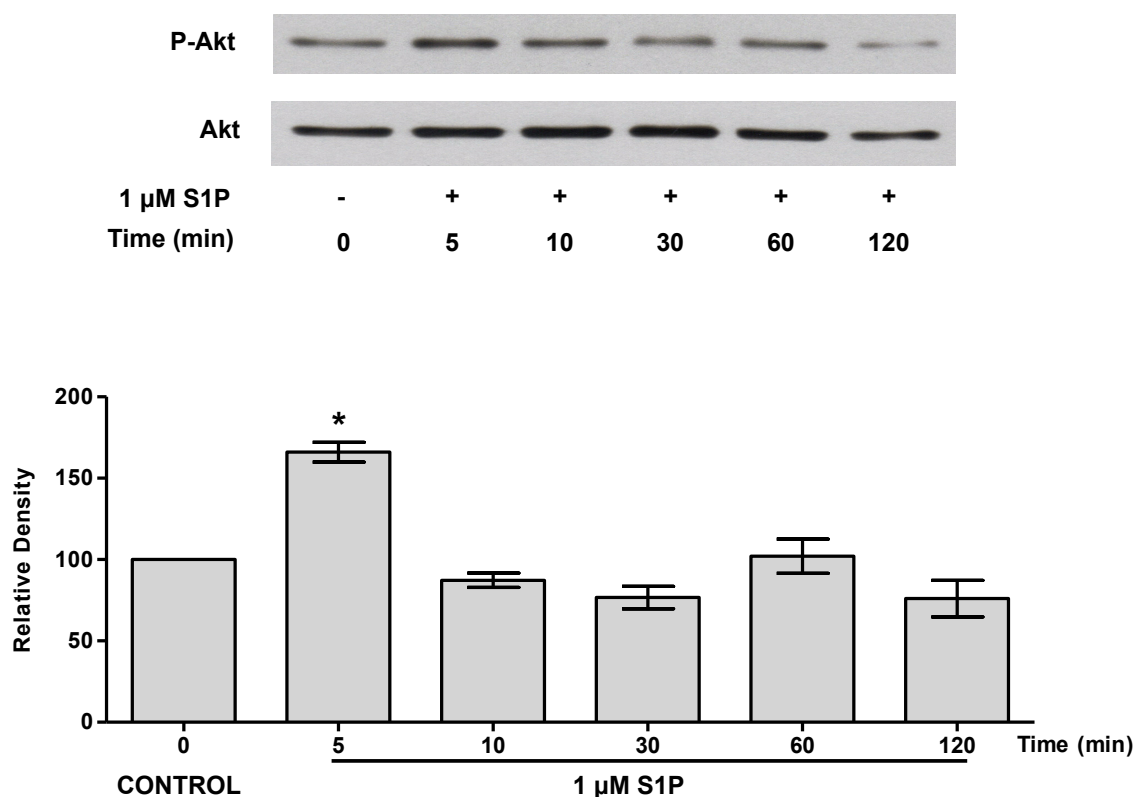
**Fig. 25. Effetto di S1P sulla fosforilazione di ERK1/2.** Analisi Western Blotting per valutare lo stato di fosforilazione di ERK1/2 in seguito a stimolazione con S1P utilizzando anticorpi specifici contro la forma fosforilata di ERK1/2 (P-ERK1/2) e anti-ERK1/2 totale. Cellule satelliti al 70% di confluenza sono state private di nutrienti e trattate (+) o meno (-) con S1P 1  $\mu$ M per i tempi indicati. I lisati totali (20  $\mu$ g) sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivamente ad analisi mediante Western Blotting. L'intensità delle bande corrispondenti a P-ERK1/2 è stata normalizzata sulla forma totale e riportata come percentuale rispetto al controllo, posto uguale a 100. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi (\* $p$ <0.05, Test t di Student).

Sempre tramite Western Blotting è stato dimostrato che S1P stimolava la fosforilazione di p38 MAPK, con una tempistica simile a quella osservata per ERK1/2: infatti la fosforilazione indotta dal lipide bioattivo risultava massima dopo 5 minuti dalla sua somministrazione e si riscontrava anche successivamente, dopo 60 minuti d'incubazione (Fig. 26).



**Fig. 26. Effetto di S1P sulla fosforilazione di p38 MAPK.** Analisi Western Blotting per valutare la fosforilazione di p38 MAPK in seguito a stimolazione con S1P per i tempi indicati utilizzando anticorpi specifici contro la forma fosforilata di p38 MAPK (P-p38 MAPK) e anti-p38 MAPK totale. Cellule satelliti al 70% di confluenza sono state private di nutrienti e trattate (+) o meno (-) con S1P 1  $\mu$ M per i tempi indicati. I lisati totali (20  $\mu$ g) sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivamente ad analisi mediante Western Blotting. L'intensità delle bande corrispondenti alla P-p38 MAPK è stata normalizzata sulla forma totale e riportata come rapporto rispetto al controllo, posto uguale a 100. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi (\* $p$ <0.05, Test t di Student)

Anche Akt è stata identificata come bersaglio di S1P, essendo la sua fosforilazione moderatamente aumentata a 5 minuti di trattamento con lo sfingolipide (Fig. 27).

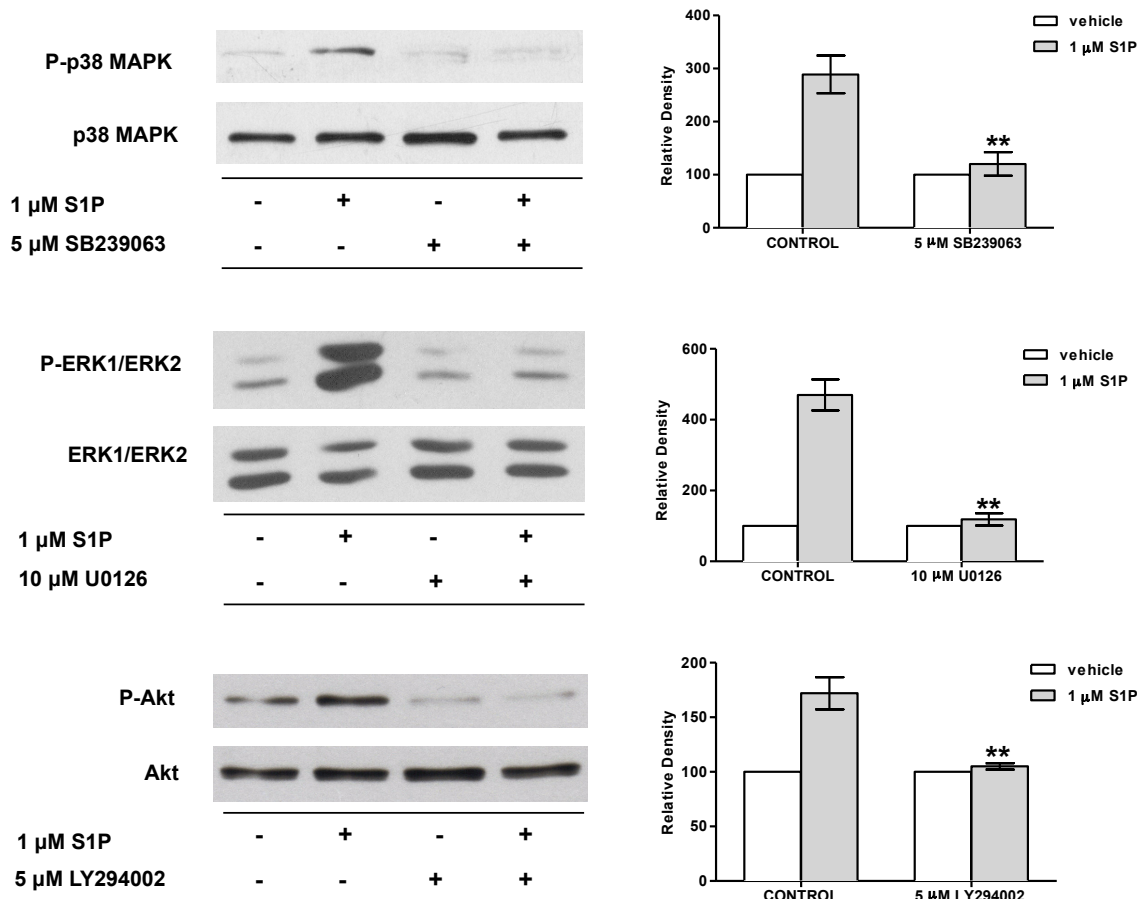


**Fig. 27. Effetto di S1P sulla fosforilazione di Akt.** Analisi Western Blotting per valutare la fosforilazione di Akt in seguito a stimolazione con S1P per i tempi indicati utilizzando anticorpi specifici contro la forma fosforilata di Akt (P-Akt) e anti-Akt totale. Cellule satelliti al 70% di confluenza sono state private di nutrienti e trattate (+) o meno (-) con S1P 1  $\mu$ M per i tempi indicati. I lisati totali (20  $\mu$ g) sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivamente ad analisi mediante Western Blotting. L'intensità delle bande corrispondenti alla P-Akt è stata normalizzata sulla forma totale e riportata come rapporto rispetto al controllo, posto uguale a 100. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. (\* $p < 0.05$ , Test t di Student).

Per valutare il coinvolgimento di queste vie di segnalazione nel meccanismo attraverso il quale S1P promuove la proliferazione e la migrazione cellulare, sono stati impiegati specifici inibitori farmacologici delle vie di segnalazione di p38 MAPK, SB239063, di ERK1/2, U0126, o della PI3K, LY294002.

Tutti gli inibitori sono stati somministrati 30 minuti prima del trattamento con S1P 1  $\mu$ M in cellule precedentemente private di nutrienti per 24 h in terreno privo di siero.

Come rappresentato in figura 28, i trattamenti con SB239063 (5 $\mu$ M), con U0126 (10  $\mu$ M) e con LY294002 (5 $\mu$ M) sono risultati efficaci in quanto prevenivano completamente la fosforilazione stimolata dallo sfingolipide di p38 MAPK, ERK1/2 e Akt.

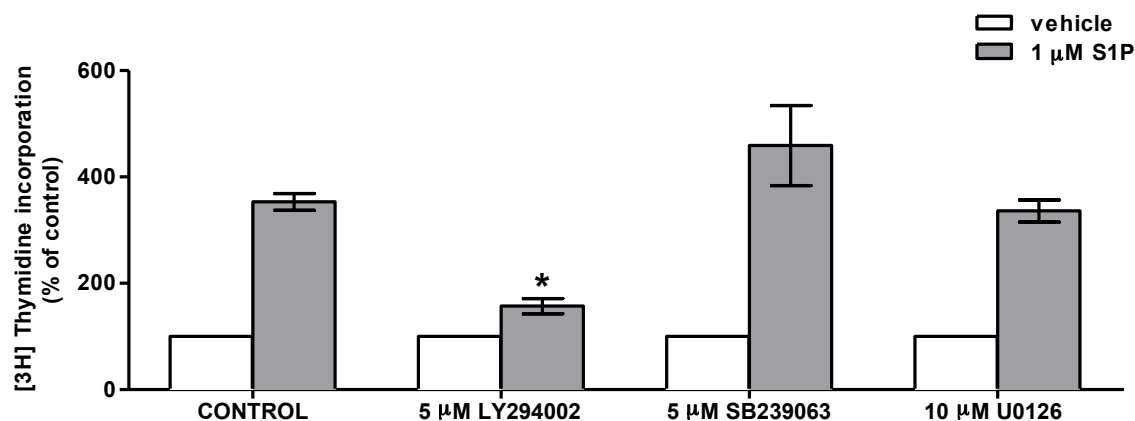


**Fig. 28. Effetto degli inibitori SB239063, U0126 e LY294002 sulla fosforilazione di p38 MAPK, ERK1/2 e Akt dopo trattamento con S1P.** Cellule satelliti al 70% di confluenza sono state private di nutrienti per 24 h e pre-trattate (+) o meno (-) per 30 min con SB239063 5 $\mu$ M, U0126 10 $\mu$ M e LY294002 5 $\mu$ M prima di essere stimulate con S1P 1  $\mu$ M per 5 min. I lisati totali (20  $\mu$ g) sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivamente ad analisi mediante Western Blotting utilizzando anticorpi specifici anti-fosfo-p38 MAPK e anti-p38 MAPK (pannello in alto), anti-fosfo-ERK1/2 e anti-ERK1/2 (pannello centrale) o anti-fosfo-Akt e anti-Akt (pannello in basso). Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. Le analisi densitometriche sono mostrate nei pannelli a destra. L'intensità delle bande corrispondenti alle forme fosforilate delle proteine chinasi sono state valutate tramite analisi densitometrica, normalizzate sulle forme totali e riportate come percentuale rispetto al controllo, posto uguale a 100. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di 3 esperimenti indipendenti (\*\* $p$ <0.01, Test t di Student).

Per testare il coinvolgimento di tali effettori nella proliferazione indotta da S1P sono stati impiegati gli inibitori SB239063 (5  $\mu$ M), U0126 (10  $\mu$ M) e LY294002 (5  $\mu$ M) in esperimenti di incorporazione di timidina triziata.

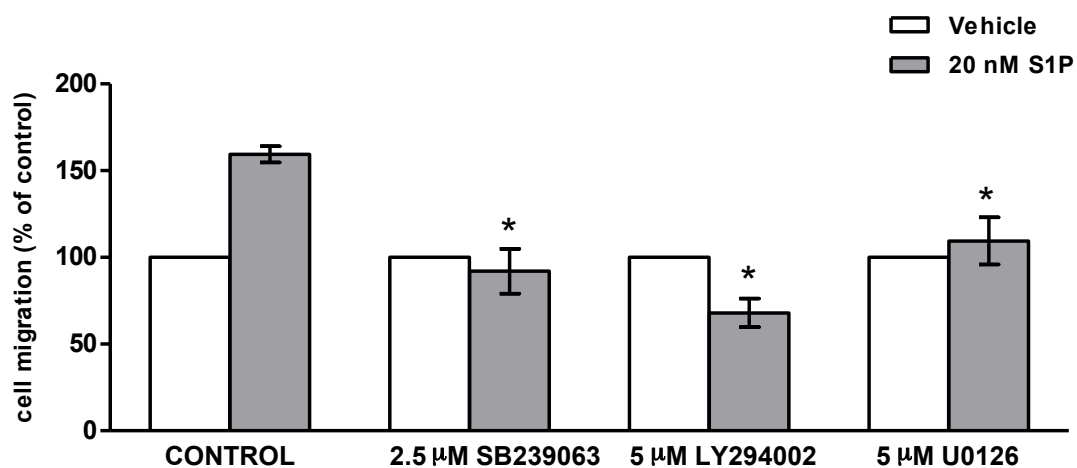
La proliferazione indotta da S1P è risultata fortemente attenuata solo dopo il trattamento, 30 minuti prima della stimolazione con lo sfingolipide, delle cellule satelliti con LY294002 5 $\mu$ M, mettendo quindi in risalto il ruolo chiave della via di segnalazione PI3K/Akt nella risposta mitogenica evocata dal lipide bioattivo (Fig. 29). Contrariamente SB239063 e LY294002 non hanno avuto alcun effetto sull'azione proliferativa di S1P (Fig. 29).





**Fig. 29. Ruolo di ERK1/2, p38 MAPK e Akt nell'effetto mitogenico di S1P in cellule satelliti.** Cellule satelliti al 60% di confluenza sono state starvate e pre-trattate per 30 min con SB239063 5μM, U0126 10μM e LY294002 5μM prima di essere stimulate con S1P 1 μM per 20 h. [<sup>3</sup>H]-timidina (0.5 μCi/well) è stata aggiunta nelle ultime 4 h di incubazione. I risultati sono la media ± SEM di 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come percentuale rispetto al controllo posto pari a 100. L'effetto dell'inibitore LY294002 sulla proliferazione indotta da S1P è statisticamente significativo (\*p<0.05, Test t di Student).

Infine per comprendere il meccanismo molecolare con il quale S1P induce la migrazione di cellule satelliti, sono stati eseguiti esperimenti di migrazione con camere di Boyden in presenza di U0126 5 μM o di LY294002 5μM o di SB239063 2.5 μM. Come risulta evidente dalla figura 30, l'abilità di S1P di incrementare la chemiotassi di cellule satelliti è stata completamente inibita quando le cellule sono state pre-trattate con SB239063, LY294002 e U0126, indicando il possibile coinvolgimento di ERK1/2, PI3K/Akt e p38 MAPK nella motogenesi indotta dallo sfingolipide.



**Fig. 30. Ruolo di ERK1/2, p38 MAPK e Akt nell'effetto pro-migratorio di S1P in cellule satelliti.** La migrazione di cellule satelliti in risposta a S1P 20 nM è stata valutata con camere di Boyden dopo pre-trattamento con LY294002 5μM, SB239063 2.5μM o U0126 5μM. I risultati sono la media ± SEM di 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come percentuale rispetto al controllo, posto uguale a 100. L'effetto degli inibitori farmacologici risulta statisticamente significativo (\* $p < 0.05$ , Test t di Student).

## RISULTATI II PARTE

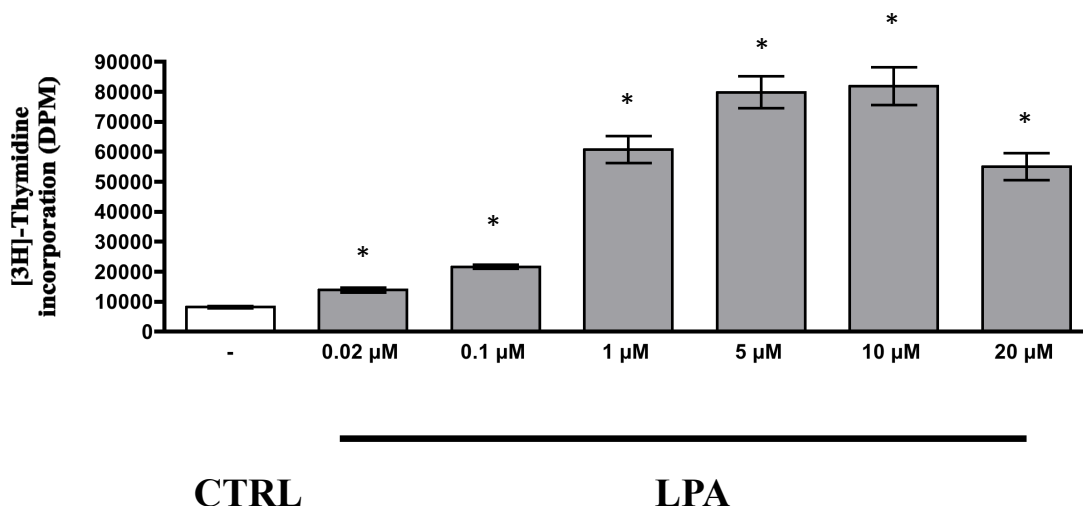
### CROSS-TALK FUNZIONALE TRA LPA E ASSE SPHK/S1P

Un crescente numero di evidenze sperimentali dimostra che S1P e LPA svolgono ruoli cruciali nella regolazione delle funzioni di cellule staminali quali la proliferazione, la migrazione e il differenziamento (Pebay et al., 2007).

Le cellule satelliti, residenti nel muscolo scheletrico, sono cellule staminali che risultano assai importanti e critiche nel processo di miogenesi durante lo sviluppo così come nel processo di riparazione nel muscolo adulto (Hawke and Garry, 2001).

È stato da noi dimostrato per la prima volta che LPA media un effetto pro-mitogenico in cellule satelliti murine (Fig. 13). Per caratterizzare ulteriormente il ruolo del lisofosfolipide nella proliferazione di questo tipo cellulare, è stato valutato l'effetto del lipide bioattivo sull'incorporazione di timidina triziata in cellule satelliti isolate dai muscoli tibiale anteriore, soleus, gastrocnemio, EDL di topi C57BL/6 private dei nutrienti per circa 24 h e incubate per 20 h con diverse concentrazioni di LPA.

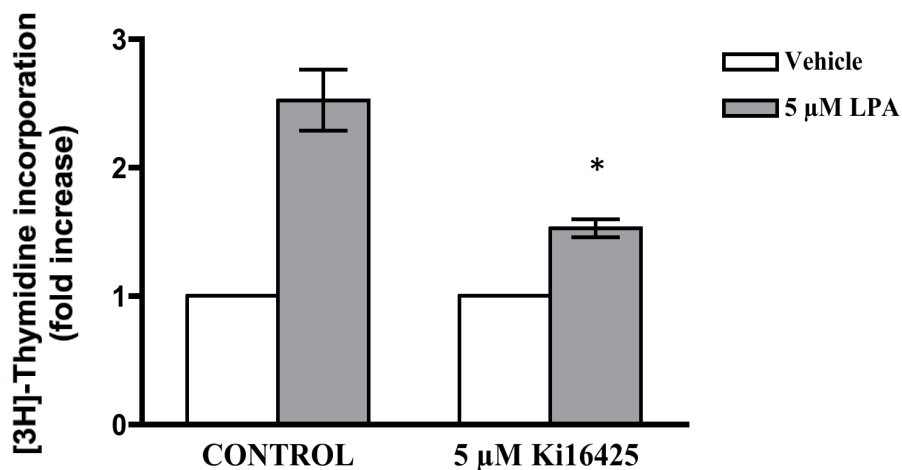
Come riportato in figura 31, l'azione di LPA era dose dipendente con effetto massimo alla concentrazione di 5  $\mu$ M.



**Fig. 31. Dose dipendenza di LPA sulla proliferazione di cellule satelliti valutata mediante incorporazione di  $^3\text{H}$ -timidina.** I dati riportati sono le medie  $\pm$  SEM dei triplicati di un esperimento significativo ripetuto tre volte con risultati analoghi. L'effetto di LPA è ritenuto statisticamente significativo (\* $p < 0,05$ , Test t di Student).

Poiché le azioni biologiche di LPA sono ampiamente attribuite al suo legame a specifici recettori di membrana associati a proteine G, detti LPARs, è stato valutato il ruolo di tali recettori nel mediare la risposta proliferativa indotta da LPA mediante l'impiego di antagonisti selettivi per i recettori del lisofosfolipide.

A questo scopo è stato utilizzato Ki16425, l'antagonista selettivo per LPA<sub>1/3</sub>, 40 minuti prima del trattamento con LPA e successiva incubazione per 20 h. La somministrazione di Ki16425 5  $\mu$ M ha ridotto in maniera significativa l'effetto proliferativo di LPA (Fig. 32), valutato mediante saggio d'incorporazione di timidina triziata, suggerendo il coinvolgimento dei recettori LPA<sub>1/3</sub> nell'azione mitogenica indotta dal lisofosfolipide.



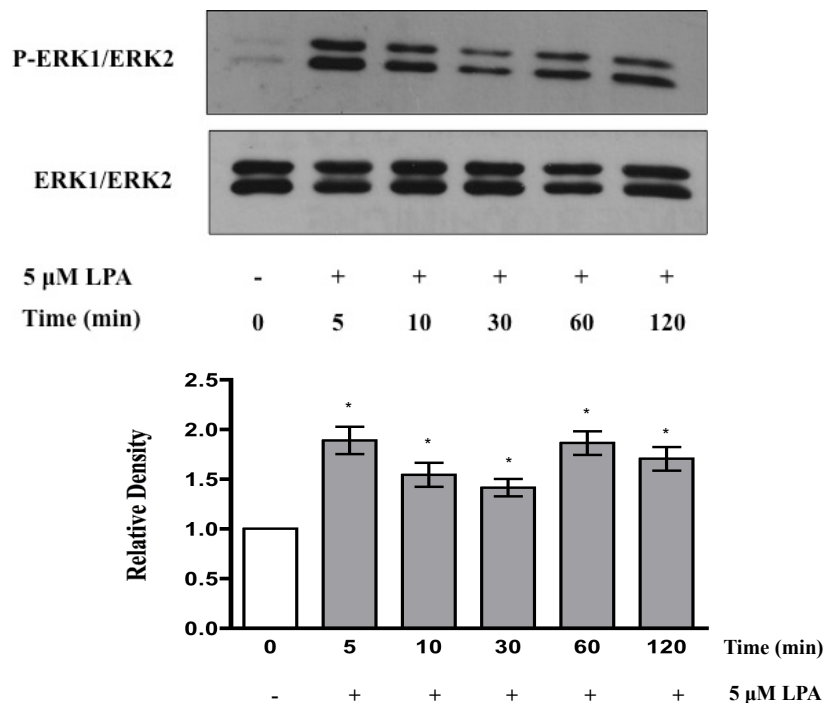
**Fig. 32. Effetto di Ki16425, antagonista specifico dei recettori LPA<sub>1/3</sub>, sulla proliferazione indotta da LPA in cellule satelliti.** Le cellule satelliti private di siero per 24 h sono state pre-incubate per 40 min con Ki16425 5  $\mu$ M, prima di essere stimulate con LPA 5  $\mu$ M per 20 h. La [<sup>3</sup>H]-timidina (0.5  $\mu$ Ci/well) è stata aggiunta durante le ultime 4 h di incubazione. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come variazione rispetto al controllo, posto uguale a 1. L'effetto di Ki16425 sull'azione mitogenica di LPA in cellule trattate rispetto al controllo è statisticamente significativo (\* $p$ <0.05, Test t di Student).

Questi dati dimostrano pertanto che LPA ha un'azione mitogenica in cellule satelliti e che tale azione è mediata dal legame del lipide ai recettori LPA<sub>1/3</sub>.

Per comprendere il meccanismo molecolare alla base dell'effetto proliferativo esercitato dal lisofosfolipide in cellule satelliti, inizialmente sono state caratterizzate le vie di segnalazione attivate dal trattamento con LPA in cellule satelliti focalizzando l'attenzione su proteine chinasi note per essere coinvolte nella regolazione della proliferazione, tra cui ERK1/2 e PI3K/Akt.

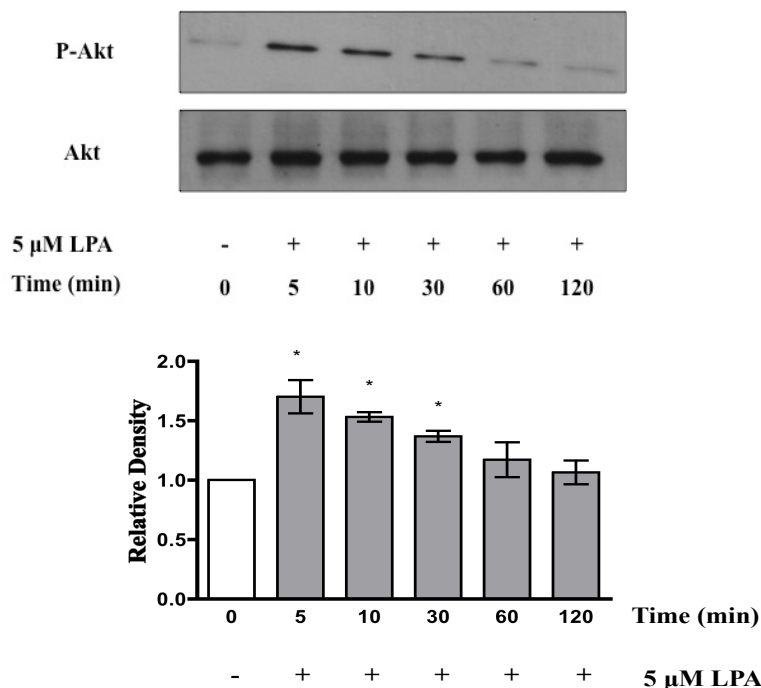
Mediante analisi Western Blotting condotte usando un anticorpo specifico per la forma fosforilata di ERK1/2 è stato dimostrato che LPA provocava un rapido e transitorio

aumento della forma fosforilata di tale chinasi in cellule satelliti: la fosforilazione era massima a 5 minuti di stimolazione, diminuendo ad intervalli di tempo successivi, anche se ancora apprezzabile a 60 minuti (Fig. 33).



**Fig. 33. Effetto di LPA sulla fosforilazione di ERK1/2.** Analisi Western Blotting per valutare lo stato di fosforilazione di ERK1/2 in seguito a stimolazione con LPA utilizzando anticorpi specifici contro la forma fosforilata di ERK1/2 (P- ERK1/2) e anti-ERK1/2 totale. Cellule satelliti al 70% di confluenza sono state private di nutrienti e trattate (+) o meno (-) con LPA 5  $\mu$ M per i tempi indicati. I lisati totali (20  $\mu$ g) sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivamente ad analisi mediante Western Blotting. L'intensità delle bande corrispondenti a P-ERK1/2 è stata normalizzata sulla forma totale e riportata come variazione rispetto al controllo posto uguale a 1. L'analisi densitometrica è mostrata nel pannello inferiore. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno 3 esperimenti con risultati analoghi (\* $p$ <0.05, Test t di Student).

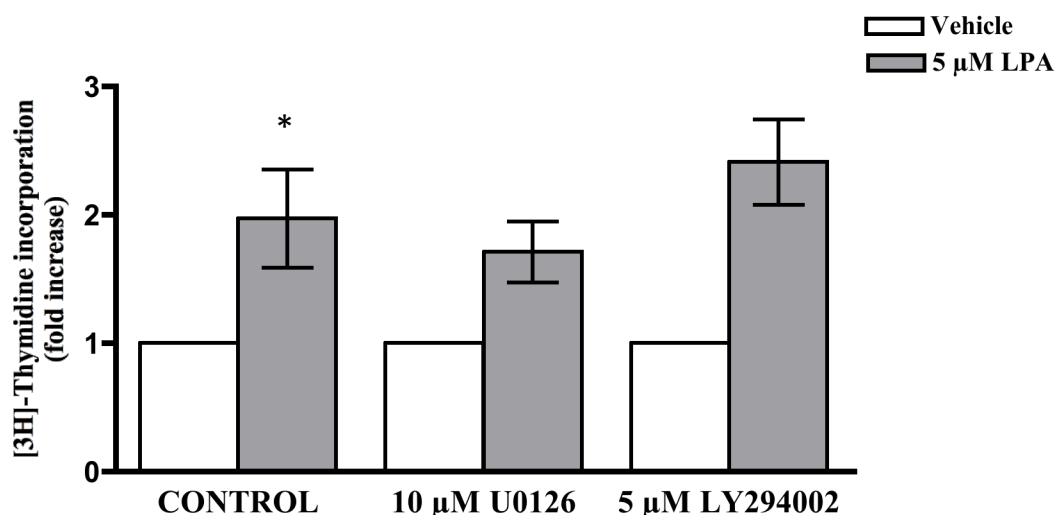
Anche Akt è stata identificata come bersaglio di LPA, essendo la sua fosforilazione aumentata a 5 minuti di trattamento con il lisofosfolipide e permanente fino a 30 minuti di stimolazione. (Fig. 34).



**Fig. 34. Effetto di LPA sulla fosforilazione di Akt.** Analisi Western Blotting per valutare la fosforilazione di Akt in seguito a stimolazione con LPA per i tempi indicati utilizzando anticorpi specifici contro la forma fosforilata di Akt (P-Akt) e anti-Akt totale. Cellule satelliti al 70% di confluenza sono state private di nutrienti e trattate (+) o meno (-) con LPA 5  $\mu$ M per i tempi indicati. I lisati totali (20  $\mu$ g) sono stati sottoposti a SDS-PAGE e successivamente ad analisi mediante Western Blotting. L'intensità delle bande corrispondenti alla P-Akt è stata normalizzata sulla forma totale e riportata come variazione rispetto al controllo posto uguale a 1. L'analisi densitometrica è mostrata nel pannello inferiore. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno 3 esperimenti con risultati analoghi (\* $p$ <0.05, Test t di Student).

Per valutare il coinvolgimento di queste vie di segnalazione nel meccanismo attraverso il quale LPA promuove la proliferazione cellulare, sono stati impiegati specifici inibitori farmacologici delle vie di segnalazione di ERK1/2, U0126, o della PI3K/Akt, LY294002. Entrambi gli inibitori sono stati somministrati 30 minuti prima del trattamento con LPA 5  $\mu$ M, in cellule private dei nutrienti per circa 24 h in terreno privo di siero.

Come risulta evidente dalla figura 35, nessuno dei due inibitori aveva effetto sulla stimolazione della sintesi di DNA, indotta da LPA, valutata mediante saggio di incorporazione di timidina triziata.

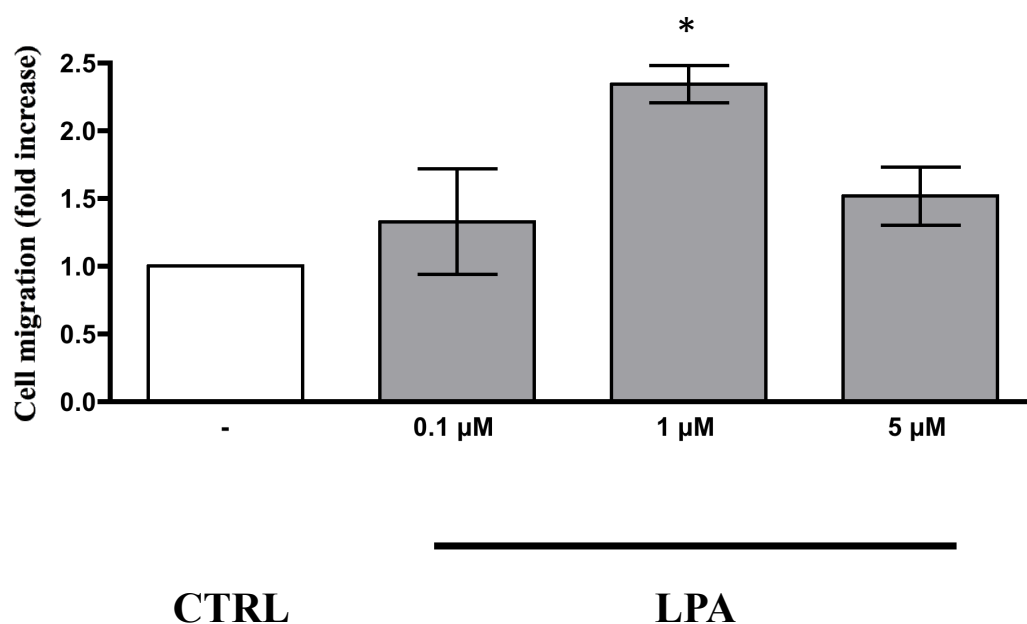


**Fig. 35. Ruolo di ERK1/2 e Akt nell'effetto mitogenico di LPA in cellule satelliti.** Cellule satelliti al 60% di confluenza sono state private di nutrienti per 24 h e pre-trattate per 30 min con U0126 10μM e LY294002 5μM prima di essere stimulate con LPA 1 μM per 20 h. [<sup>3</sup>H]-timidina (0.5 μCi/well) è stata aggiunta nelle ultime 4 h di incubazione. I risultati sono la media ± SEM di 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come variazione rispetto al controllo posto uguale a 1. L'effetto degli inibitori LY294002 e U0126 sulla proliferazione indotta da LPA non è statisticamente significativo (\*p<0.05, Test t di Student).

Oltre alla proliferazione cellulare, vari sono gli effetti biologici regolati da LPA riportati in letteratura tra cui i riarrangiamenti citoscheletrici che giustificano la sua capacità di stimolare la migrazione in vari tipi cellulari. Sono stati eseguiti a questo proposito esperimenti volti a identificare l'effetto del lisofosfolipide sulla motilità di cellule satelliti e quale fosse il possibile meccanismo di azione.

Per misurare la migrazione cellulare in risposta a LPA è stata utilizzata la procedura che impiega camere di Boyden. 10000 cellule satelliti, mantenute per 24 h in DMEM contenente BSA 0.1%, sono state utilizzate e incubate per 7 h con diverse concentrazioni di LPA.

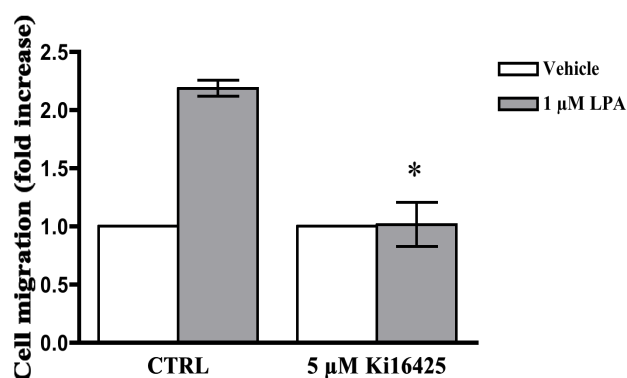
La valutazione della motilità cellulare in risposta a differenti concentrazioni di LPA ha dimostrato che l'effetto biologico massimo è dato dalla concentrazione del lisofosfolipide pari a 1 μM (Fig. 36).



**Fig. 36. Effetto di LPA sulla migrazione di cellule satelliti.** La migrazione delle cellule satelliti è stata determinata con camere di Boyden in risposta alle concentrazioni indicate di LPA per 7 h. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo, posto uguale a 1. L'effetto di LPA 1  $\mu$ M è statisticamente significativo (\* $p < 0,05$ , Test t di Student).

Al fine di esaminare il ruolo dei recettori LPARs nell'azione pro-migratoria del lisofosfolipide sono stati condotti esperimenti utilizzando un approccio di natura farmacologica.

Il trattamento con Ki16425 5  $\mu$ M, antagonista specifico per LPA<sub>1/3</sub>, ha annullato la chemiotassi indotta dal lisofosfolipide dopo 7 h di incubazione, suggerendo il coinvolgimento di tali recettori nel mediare tale azione biologica indotta dal lipide bioattivo (Fig. 37).

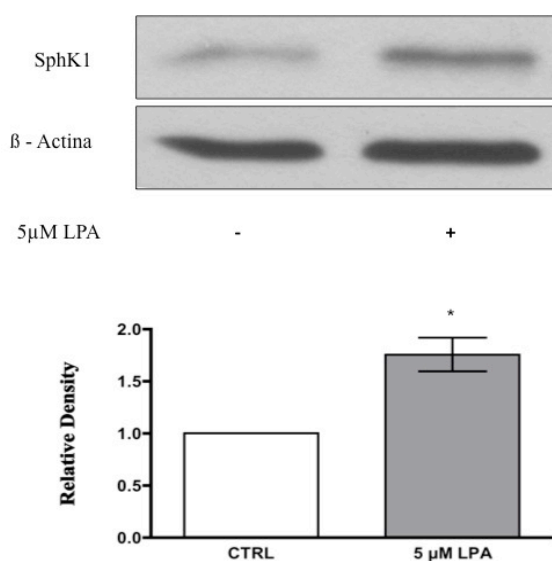


**Fig. 37. Effetto di Ki16425, antagonista specifico dei recettori LPA<sub>1/3</sub>, sulla migrazione indotta da LPA di cellule satelliti.** La migrazione di cellule satelliti è stata misurata dopo 40 min di pre-trattamento con Ki16425 5  $\mu$ M in risposta a LPA 1  $\mu$ M per 7 h mediante camere di Boyden. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo, posto uguale a 1. L'effetto di Ki16425 5  $\mu$ M è statisticamente significativo (\* $p < 0,05$ , Test t di Student).



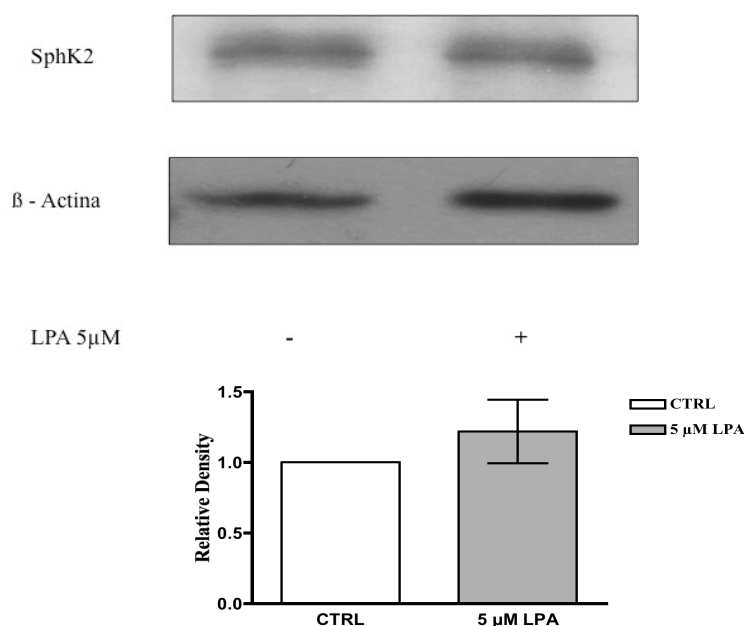
Poiché S1P stimola la proliferazione e la migrazione di cellule satelliti murine è stato valutato il possibile coinvolgimento dell'asse SphK/S1P in tali effetti biologici mediati da LPA in questo tipo cellulare.

Mediante analisi Western Blotting condotte utilizzando anticorpi specifici anti-SphK1 e anti-SphK2 è stato dimostrato che il trattamento per 24 h delle cellule satelliti, opportunamente private di nutrienti, con LPA 5  $\mu$ M era in grado di aumentare i livelli di espressione dell'isoforma 1 di SphK (Fig. 38).



**Fig. 38. Effetto di LPA sull'espressione di SphK1 in cellule satelliti.** Analisi Western Blotting per valutare l'effetto di LPA 5  $\mu$ M sui livelli di espressione di SphK1 dopo 24 h di stimolazione utilizzando un anticorpo specifico anti-SphK1. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. L'analisi densitometrica è mostrata nel pannello inferiore. L'intensità delle bande corrispondenti alla SphK1 è stata valutata tramite analisi densitometrica, normalizzata sulla  $\beta$ -actina e riportata come variazione rispetto al controllo preso uguale a 1. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di 3 esperimenti indipendenti (\* $p$ <0.05, Test t di Student).

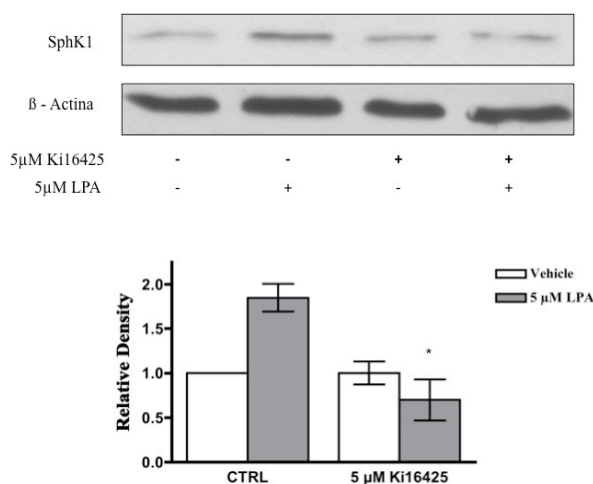
Invece nel caso di SphK2 la stimolazione con LPA non ha indotto variazione significativa del contenuto della proteina (Fig. 39).



**Fig. 39. Effetto di LPA sull'espressione di SphK2 in cellule satelliti.** Analisi Western Blotting per valutare l'effetto di LPA 5 μM sui livelli di espressione di SphK2 dopo 24 h di stimolazione utilizzando un anticorpo specifico anti-SphK2. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. L'analisi densitometrica è mostrata nel pannello inferiore. L'intensità delle bande corrispondenti alla SphK2 è stata valutata tramite analisi densitometrica, normalizzata sulla β-actina e riportata come variazione rispetto al controllo preso uguale a 1. I risultati sono la media ± SEM di 3 esperimenti indipendenti.

È stato quindi studiato il meccanismo molecolare alla base dell'effetto di LPA sull'espressione di SphK1. Per prima cosa è stato esaminato il ruolo dei LPARs nell'up-regolazione di SphK1 a seguito del trattamento con il lisofosfolipide.

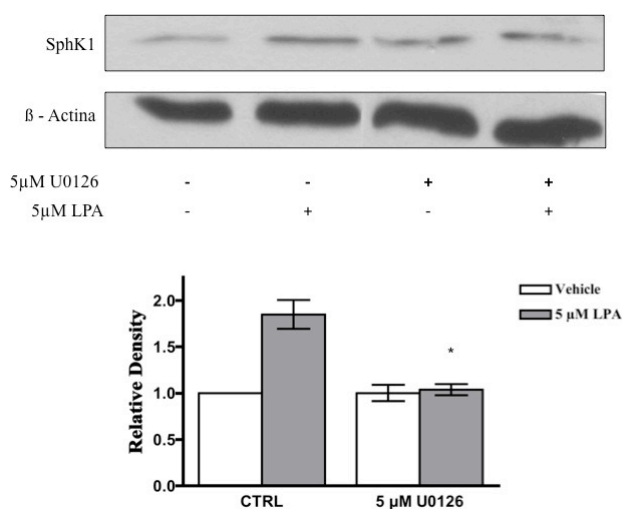
Mediante analisi Western Blotting è stata valutata l'espressione di SphK1 in cellule satelliti, private dei nutrienti per sostituzione del terreno di coltura con BSA 0.1% in DMEM, e contemporaneamente stimulate o meno con LPA 5 μM per 24 h, in seguito a pre-trattamento con Ki16425 5 μM per 40 minuti. In figura 40 è mostrato che, come atteso, la stimolazione con LPA per 24 h ha determinato un aumento dell'espressione di SphK1 mentre il pre-trattamento delle cellule con l'inibitore dei recettori LPA<sub>1/3</sub> ha annullato l'effetto del lisofosfolipide.



**Fig. 40. Effetto di Ki16425, antagonista di LPA<sub>1/3</sub>, sull'espressione di SphK1 in cellule satelliti.** Analisi Western Blotting dell'espressione di SphK1 indotta da LPA in presenza (+) o assenza (-) dell'antagonista di LPA<sub>1/3</sub>, Ki16425 5 μM. Cellule satelliti sono state private di nutrienti e trattate o meno con Ki16425 e dopo 40 min stimulate con LPA 5 μM per 24 h. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. L'analisi densitometrica è mostrata nel pannello inferiore. L'intensità delle bande corrispondenti alla SphK1 è stata valutata tramite analisi densitometrica, normalizzata sulla β-actina e riportata come variazione rispetto al controllo preso uguale a 1. I risultati sono la media ± SEM di 3 esperimenti indipendenti (\*p<0.05, Test t di Student).

In seguito è stato verificato se l'attivazione di ERK1/2, nota via di segnalazione attivata da LPA, fosse a monte dell'aumentata espressione di SphK1 in cellule satelliti murine, come già riportato in letteratura per altri tipi cellulari (Ramachandran et al., 2010).

A questo scopo, cellule satelliti sono state private di nutrienti per 24 h, pre-trattate per 40 minuti con l'inibitore farmacologico della via di segnalazione di ERK1/2, U0126 5 μM, e in seguito stimulate con LPA 5 μM. Come mostrato in figura 41, l'inibizione di ERK1/2 ha annullato l'aumento di SphK1 indotto dal lisofosfolipide.

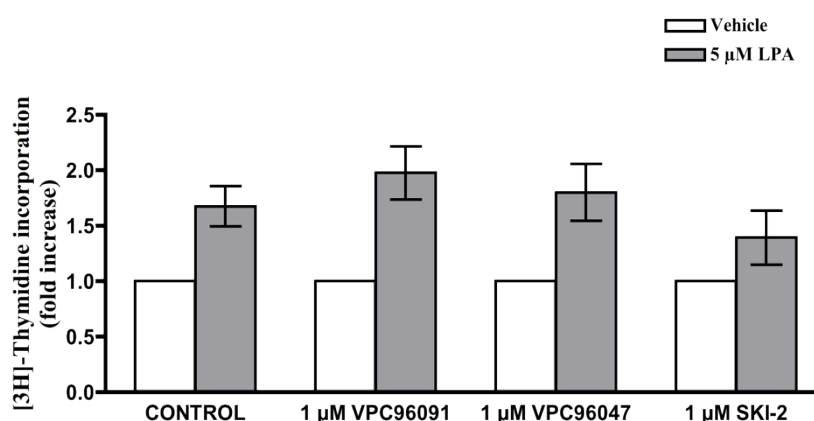


**Fig. 41. Effetto dell'inibizione di ERK1/2 sull'espressione di SphK1.** Analisi Western Blotting dell'espressione di SphK1 indotta da LPA in presenza (+) o assenza (-) dell'inibitore di ERK1/2, U0126 5  $\mu$ M. Cellule satelliti sono state private dei nutrienti e trattate o meno con U0126 e dopo 40 min stimolate con LPA 5  $\mu$ M per 24 h. Il blot mostrato è rappresentativo di almeno tre esperimenti indipendenti con risultati analoghi. L'analisi densitometrica è mostrata nel pannello inferiore. L'intensità delle bande corrispondenti alla SphK1 è stata valutata tramite analisi densitometrica, normalizzata sulla  $\beta$ -actina e riportate come variazione rispetto al controllo preso uguale a 1. I risultati sono la media  $\pm$  SEM di 3 esperimenti indipendenti (\* $p$ <0.05, Test t di Student).

Dai dati ottenuti emerge che il legame di LPA ai suoi recettori  $LPA_{1/3}$  e l'attivazione della via di segnalazione ERK1/2 sono necessarie per l'induzione dell'espressione di SphK1 da parte del lisofosfolipide.

È stato quindi studiato il possibile coinvolgimento di SphK nell'effetto mitogenico del lisofosfolipide, valutando l'incorporazione di timidina triziata in cellule trattate per 20 h con LPA e pre-incubate con i vari inibitori di SphK quali: VPC96091 (inibitore specifico per SphK1), VPC96047 e SKI-2 (inibitori specifici per entrambe le isoforme della SphK).

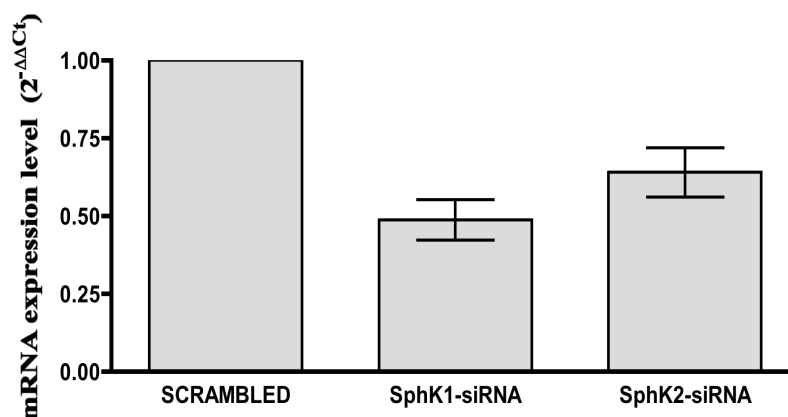
I risultati ottenuti confermano che in cellule satelliti LPA induceva un aumento significativo della sintesi di DNA (\* $p$ <0.05) mentre nessuno degli inibitori utilizzati aveva alcun effetto sull'azione mitogenica del lisofosfolipide (Fig. 42), escludendo quindi il coinvolgimento della SphK nell'effetto mitogenico indotto da LPA in questo tipo cellulare.



**Fig. 42. Ruolo di SphK nell'effetto mitogenico indotto da LPA in cellule satelliti.** Le cellule satelliti, private di nutrienti, sono state pre-incubate per 30 min in presenza o assenza di VPC96091 1 μM, inibitore di SphK1, VPC96047 1 μM e SKI-2 1 μM, inibitori di entrambe le isoforme della SphK prima di essere stimolate con LPA 5 μM per 20 h. La [<sup>3</sup>H]-timidina (0.5μCi/well) è stata aggiunta durante le ultime 4 h di incubazione. I risultati sono riportati come numero di volte rispetto al controllo preso uguale a 1. I dati sono la media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato. L'effetto mitogenico di LPA in cellule trattate rispetto a cellule non trattate è statisticamente significativo (\*p<0.05, Test t di Student), mentre l'effetto degli inibitori sull'azione mitogenica del lisofosfolipide in cellule trattate rispetto al controllo non è statisticamente significativo.

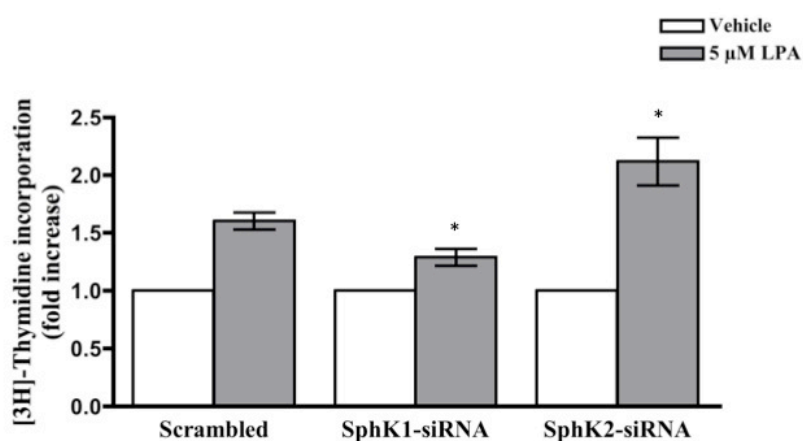
Al fine di valutare il contributo specifico delle due isoforme di SphK nell'azione mitogenica di LPA nelle cellule satelliti, sono stati eseguiti esperimenti di incorporazione di timidina triziata in cellule in cui veniva regolata negativamente l'espressione di SphK1 o SphK2, mediante l'impiego di siRNA specifici.

Innanzitutto è stata verificata l'efficacia dei siRNA specifici nel silenziare le due isoforme dell'enzima mediante analisi Real-Time PCR, utilizzando sonde Taq-Man Gene Expression Assay. Come illustrato in figura 43, in questa condizione sperimentale adottata, l'interferenza a RNA ha ridotto l'espressione di SphK1 di circa il 50% e di SphK2 del 40%.



**Fig. 43. Effetto del silenziamento di SphK1 e SphK2.** Analisi RT-PCR Real-Time è stata effettuata in cellule satelliti trasfettate con scrambled siRNA o siRNA specifici per SphK1 e SphK2. I dati sono la media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato.

La valutazione dell'azione proliferativa di LPA, in cellule satelliti trasfettate con i siRNA specifici per le due isoforme dell'enzima SphK, ha evidenziato un aumento significativo dell'effetto biologico quando i livelli di espressione di SphK2 venivano regolati negativamente. Al contrario il silenziamento della SphK1 causava una riduzione della proliferazione indotta da LPA del 50% (Fig. 44). Questi risultati mettono in luce quindi un ruolo negativo della SphK2 e un ruolo positivo di SphK1 nel mediare l'effetto mitogenico di LPA.



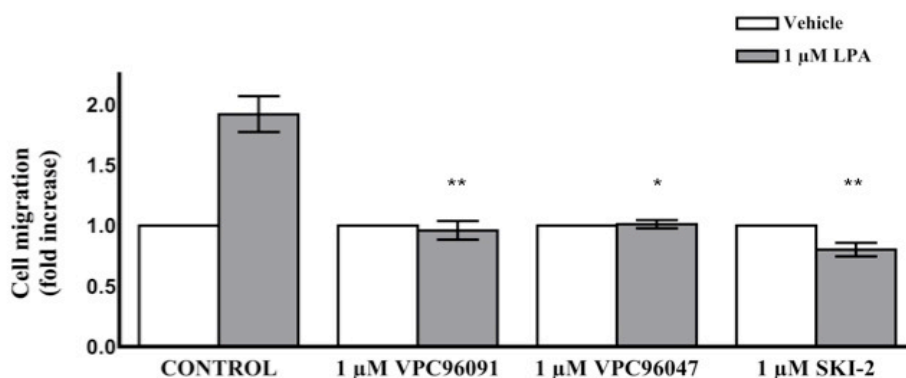
**Fig. 44. Effetto del silenziamento di SphK1 e SphK2 sulla proliferazione cellulare LPA dipendente.** Cellule satelliti sono state trasfettate con scrambled siRNA o siRNA specifici per entrambe le isoforme di SphK prima di essere stimulate con LPA 5  $\mu$ M per 20 h. [ $^3$ H]-timidina (0.5  $\mu$ Ci/well) è stata aggiunta nelle ultime 4 h di incubazione. I dati sono la media  $\pm$  SEM di almeno 3 esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo, posto uguale a 1. L'effetto del silenziamento di SphK1 e SphK2 sulla proliferazione indotta da LPA è statisticamente significativo (\* $p$ <0.05, Test t di Student).

La discordanza dei risultati tra inibitori farmacologici e interferenza a RNA è presumibilmente legata ai ruoli opposti di SphK1 e SphK2 nella proliferazione indotta da LPA e all'utilizzo di inibitori che agiscono su entrambe le isoforme di SphK. Neppure l'inibitore specifico per SphK1, VPC96091, aveva alcun effetto sulla proliferazione indotta da LPA, presumibilmente per la scarsa efficacia del composto in questo tipo cellulare o per possibili effetti *off-target* degli agenti farmacologici la cui specificità non è sempre ben stabilita.

Poiché in letteratura numerosi dati sono a favore di un importante ruolo dell'asse SphK1/S1P nella migrazione cellulare indotta da LPA (Mills et al., 2003; Shida et al., 2008), è stato esaminato il possibile coinvolgimento di entrambe le isoforme di SphK nell'effetto chemiotattico del lisofosfolipide, valutato tramite camere di Boyden e utilizzando approcci di natura farmacologica e genetica.

L'approccio farmacologico prevedeva l'incubazione in presenza di inibitori selettivi di SphK 30 minuti prima del trattamento con il lisofosfolipide.

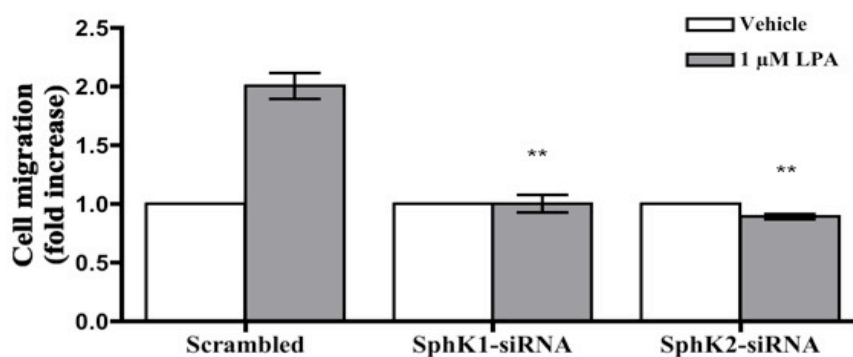
Come illustrato in figura 45, il trattamento delle cellule satelliti sia con l'inibitore specifico per SphK1, VPC96091, che con gli inibitori specifici per entrambe le isoforme della SphK, VPC96047 e SKI-2, ha annullato completamente la migrazione cellulare in risposta a LPA. Da questi risultati emerge un possibile coinvolgimento di entrambe le isoforme enzimatiche nel mediare l'azione chemiotattica del lisofosfolipide in questo tipo cellulare.



**Fig. 45. Effetto degli antagonisti di SphK sulla migrazione indotta da LPA.** La migrazione di cellule satelliti è stata misurata, dopo pre-trattamento per 30 min con VPC96091 1 μM, inibitore di SphK1, VPC96047 1 μM e SKI-2 1 μM, inibitori di entrambe le isoforme della SphK, in risposta a LPA 1 μM per 7 h mediante camere di Boyden. I risultati sono la media ± SEM di almeno tre esperimenti indipendenti eseguiti in triplicato e riportati come numero di volte rispetto al controllo, posto uguale a 1. L'effetto degli antagonisti è statisticamente significativo (\*p<0.05; \*\*p<0.01, Test t di Student).

In seguito, per studiare in dettaglio il ruolo di ciascuna isoforma di SphK nell'azione promigratoria di LPA in cellule satelliti, SphK1 e SphK2 sono state silenziate tramite l'impiego di specifici siRNA secondo il protocollo precedentemente descritto.

È stato così confermato il ruolo cruciale di SphK1 e SphK2 nel mediare l'effetto chemiotattico di LPA in cellule satelliti. Infatti il silenziamento di entrambe le isoforme enzimatiche annullava completamente la migrazione indotta da LPA dopo 7 h di incubazione (Fig. 46).



**Fig. 46. Effetto del silenziamento di SphK1 e SphK2 sulla migrazione cellulare LPA dipendente.** Cellule satelliti sono state trasfettate con scrambled siRNA o siRNA specifici per SphK1 e SphK2. La migrazione delle cellule satelliti trasfettate è stata misurata con camere di Boyden in risposta a LPA 1 μM dopo 7 h. La down-regolazione di SphK1 e SphK2 riduce significativamente la migrazione indotta da LPA (\*\*p < 0.01, Test t di Student).



## DISCUSSIONE I

Il muscolo scheletrico dei mammiferi è un tessuto relativamente stabile in condizioni fisiologiche che, in risposta ad un trauma o in seguito ad esercizio fisico intenso, è in grado di andare incontro ad eventi di riparazione-rigenerazione. Tale plasticità è assicurata dalle cellule satelliti, popolazione quiescente di precursori miogenici che costituisce il compartimento staminale del tessuto muscolare. Le peculiari proprietà biologiche delle cellule satelliti, quali la capacità di attivarsi in seguito a danno, proliferare, migrare nel sito della lesione, differenziarsi e fondersi con le fibre preesistenti sono state ben descritte, tuttavia i meccanismi molecolari alla base di questi processi sono stati solo in parte identificati. La comprensione dei segnali extracellulari e dei meccanismi molecolari alla base dell'azione di questi segnali sulla popolazione di cellule satelliti, è di notevole importanza per identificare nuovi bersagli per il miglioramento della risposta rigenerativa in seguito a danno muscolare dovuto a traumi o a patologie degenerative, quali le distrofie. Nel corso di questa tesi è stato inizialmente esaminato in dettaglio il ruolo biologico di S1P in cellule satelliti murine. I risultati ottenuti dimostrano chiaramente che S1P è un regolatore chiave della biologia delle cellule satelliti, in quanto promuove sia la proliferazione sia la migrazione cellulare. Pertanto questi risultati consolidano ulteriormente la rilevanza dello sfingolipide nel controllo della fisiologia del muscolo scheletrico.

Inoltre è stato determinato il profilo d'espressione, a livello di mRNA, dei S1PRs e particolare attenzione è stata rivolta al ruolo esercitato dai recettori per S1P nel meccanismo molecolare attraverso il quale lo sfingolipide è in grado di evocare le sue risposte biologiche in questo tipo cellulare. L'analisi tramite PCR quantitativa dei livelli relativi di mRNA dei vari sottotipi recettoriali in cellule satelliti ha dimostrato la presenza di tutti i recettori per S1P, ad eccezione di S1P<sub>5</sub>, e che S1P<sub>3</sub> è il sottotipo recettoriale maggiormente espresso in questa popolazione cellulare.

Per studiare il coinvolgimento specifico dei S1PRs nelle azioni biologiche indotte da S1P, sono stati impiegati sia agonisti e antagonisti specifici per i vari recettori, sia la tecnologia dell'interferenza a RNA. È da sottolineare che i risultati ottenuti utilizzando gli agonisti e antagonisti dei vari recettori sono stati in alcune circostanze opposti ai dati derivati da approcci genetici, a causa dei possibili effetti *off-target* degli agenti farmacologici la cui

specificità non è sempre ben stabilita (Salomone et al., 2011; Pyne et al., 2011). A questo proposito, Salomone e collaboratori (2008) hanno recentemente dimostrato che JTE-013, considerato un antagonista specifico per S1P<sub>2</sub>, in vasi murini isolati inibisce la vasocostrizione mediata da S1P, ma anche quella mediata dall'analogo prostanoidico U46619, da endotelina-1 e da un'elevata concentrazione di KCl.

In accordo con i risultati presentati in questa tesi, è stato dimostrato che S1P agisce come segnale mitogenico sia in cellule satelliti associate alle miofibre (Nagata et al., 2006) che in vari tipi di cellule staminali quali ad esempio le cellule staminali embrionali umane (Inniss et al., 2006), mesoangioblasti murini e umani (Donati et al., 2007) e cellule staminali derivate da midollo osseo umano e tessuto adiposo (He et al., 2010). Tuttavia è stato anche riportato che S1P, sia esogena e/o endogena, stimola il differenziamento miogenico dei mioblasti (Donati et al., 2005; Meacci et al., 2008), agisce come induttore dell'adipogenesi nelle cellule 3T3-L1 (Hashimoto et al., 2009) e provoca il differenziamento a muscolo liscio dei mesoangioblasti e delle cellule staminali derivate dal tessuto adiposo (Nincheri et al., 2009), supportando quindi l'idea che S1P agisca anche come segnale differenziativo nei precursori cellulari di origine mesenchimale.

L'effetto mitogenico di S1P riportato in questa tesi è in linea con un'ampia gamma di studi che sono stati effettuati su differenti tipi cellulari, dove il lipide bioattivo è in grado di promuovere la crescita cellulare con un meccanismo che richiede il legame dello sfingolipide ai suoi recettori (Donati et al., 2007; Ikeda et al., 2003; Rapizzi et al., 2008). Nonostante il recettore S1P<sub>1</sub> risulti espresso in cellule satelliti, è stato qui dimostrato che non è coinvolto nella proliferazione, in quanto né il trattamento con SEW2871, agonista specifico per il recettore S1P<sub>1</sub>, né il silenziamento esclusivo di questo sottotipo recettoriale inducono alterazioni dell'effetto mitogenico esercitato dallo sfingolipide. Questo dato rappresenta un'interessante differenza rispetto a quanto riscontrato in altri tipi cellulari in cui il recettore S1P<sub>1</sub> ha un ruolo cardine nella proliferazione indotta dal lipide bioattivo (Rapizzi et al., 2008; Ishii et al., 2004). Ad esempio nelle cellule *reserve* isolate da colture cellulari di C2C12 è stato dimostrato, tramite l'impiego di agonisti e antagonisti specifici per i S1PRs, il coinvolgimento di S1P<sub>1</sub> nell'effetto mitogenico svolto dallo sfingolipide in questo tipo cellulare (Rapizzi et al., 2008).

È stato invece osservato un coinvolgimento del recettore S1P<sub>2</sub> nella risposta mitogenica indotta da S1P nelle cellule satelliti, in quanto l'effetto proliferativo dello sfingolipide è notevolmente attenuato sia da JTE-013, antagonista specifico per S1P<sub>2</sub>, sia dalla sua down-regolazione. Un effetto inibitorio sulla proliferazione indotta dal lipide bioattivo è stato

ottenuto anche in seguito a trattamento di cellule satelliti con VPC23019, antagonista di S1P<sub>1/3</sub>, e al silenziamento del recettore S1P<sub>3</sub>, a favore quindi di un suo coinvolgimento nell'azione mitogenica mediata da S1P. L'associazione positiva tra la crescita cellulare e i recettori S1P<sub>2/3</sub> è stata riscontrata anche in alcuni progenitori mesenchimali quali i mesoangioblasti (Donati et al., 2007) e gli epatociti di ratto (Ikeda et al., 2003).

Questo risultato potrebbe avere importanti implicazioni per l'espansione *in vitro* di queste cellule per scopi terapeutici, sebbene agonisti selettivi per S1P<sub>2</sub> non siano stati ancora scoperti.

Il pre-trattamento con LY294002, inibitore di PKB/Akt, attenuava in maniera considerevole la proliferazione indotta da S1P, dimostrando un ruolo chiave della via di segnalazione PI3K/Akt nella risposta mitogenica evocata da S1P, al contrario con quanto osservato in precedenza nei cheratinociti dove l'asse S1P/S1P<sub>2</sub> è responsabile di un'azione anti-proliferativa esercitata tramite l'inibizione della fosforilazione di Akt (Schuppel et al., 2008). Questi risultati apparentemente contraddittori potrebbero essere conciliati considerando che l'azione biologica finale dello sfingolipide è strettamente dipendente dal profilo d'espressione recettoriale specifico di un dato tipo cellulare, considerata la molteplicità dei segnali trasmessi dai S1PRs che possono dare luogo ad effetti cellulari distinti e anche contrastanti.

In questa tesi è stato inoltre dimostrato per la prima volta che S1P regola la migrazione delle cellule satelliti, evento fondamentale per il corretto reclutamento di queste cellule nel sito di danno e quindi per riparare con successo il muscolo scheletrico leso (Le Grand F et al., 2007).

In accordo con studi effettuati in altri tipi cellulari tra cui mioblasti di topo, fibroblasti embrionali, cellule endoteliali vascolari e linfociti (Becciolini et al., 2006; Kimura et al., 2007; Goparaju et al., 2005; Paik et al., 2001; Sanna et al., 2004; Sugimoto et al., 2003), è stato dimostrato, impiegando agonisti ed antagonisti dei S1PRs ma anche con approcci genetici, che S1P<sub>1</sub> stimola la migrazione cellulare, mentre S1P<sub>2</sub> regola negativamente questo effetto biologico.

Un altro risultato importante emerso da questo studio è dato dal coinvolgimento di S1P<sub>4</sub> nella regolazione positiva della migrazione di cellule satelliti, sebbene il suo livello di espressione sia basso in questa popolazione cellulare. L'espressione di S1P<sub>4</sub> è comunemente considerata limitata al sistema linfoide dove regola la forma e la motilità cellulare (Graler et al., 2003; Wang et al., 2005). Recentemente è stata dimostrata la sua *up*-regolazione da parte di TGFβ in mioblasti C2C12 (Cencetti et al., 2010). Questi dati

supportano complessivamente il concetto che tale sottotipo recettoriale svolga un ruolo più ampio di quello inizialmente previsto. In quest'ottica Long e collaboratori (2010) hanno dimostrato che S1P<sub>4</sub> potrebbe svolgere un ruolo importante nella progressione del cancro alla mammella, in quanto è responsabile della transattivazione del recettore del fattore di crescita epidermico umano 2 (HER2) e della regolazione di ERK1/2 in cellule di carcinoma mammario MDA-MB-453.

Recentemente è stato dimostrato che S1P esercita un'azione anti-migratoria nei mioblasti C2C12, riducendo la motilità cellulare e inibendo la chemiotassi indotta dall'IGF-1 (Becciolini et al., 2006), uno dei maggiori induttori della motilità di cellule satelliti (Suzuki et al., 2000). In accordo con quanto osservato in altri tipi cellulari (Lepley et al., 2005), S1P<sub>2</sub> è il recettore coinvolto nell'azione anti-migratoria di S1P, con conseguente attivazione di RhoA necessario per la risposta biologica. Questi risultati sono apparentemente in contrasto con l'azione pro-migratoria di S1P in cellule satelliti qui dimostrata (Calise et al., 2012): in seguito ad un trauma muscolare, le cellule satelliti delle miofibre limitrofe vengono reclutate nel sito di danno. Raggiunto il sito lesionato, la motilità cellulare deve essere inibita al fine di favorire i contatti cellula-cellula che consentono la fusione cellulare necessaria per la guarigione del muscolo. A questo scopo, la duplice azione di S1P nel controllo della motilità di cellule satelliti e mioblasti sottolinea la sua azione pleiotropica, probabilmente legata al rimodellamento dell'espressione dei S1PRs durante il commissionamento miogenico e la rigenerazione del muscolo scheletrico. Diventa dunque particolarmente importante la comprensione degli stimoli extracellulari responsabili della regolazione trascrizionale dell'espressione dei S1PR nelle cellule staminali e progenitrici del muscolo e la modificazione del loro profilo di espressione in relazione a specifici momenti temporali della vita della cellula, al fine di garantire la riparazione del tessuto danneggiato.

È importante sottolineare che la biodisponibilità di S1P risulta essere sufficientemente garantita dalla sua concentrazione sub-micromolare nel sangue e dal suo rilascio cospicuo da parte di cellule critiche per il processo di riparazione del muscolo scheletrico, quali macrofagi e cellule endoteliali. Al momento non è noto se S1P è prodotta a livello intracellulare dalle cellule satelliti stesse in risposta a stimoli extracellulari. Saranno quindi necessari ulteriori studi per chiarire se S1P endogena partecipa alla regolazione delle proprietà biologiche delle cellule satelliti.

Complessivamente i risultati riportati in questa tesi forniscono una maggiore comprensione dei molteplici ruoli di S1P nella regolazione del destino cellulare, definendo le specifiche

azioni biologiche esercitate da questo sfingolipide nelle cellule staminali residenti del muscolo scheletrico.

## **DISCUSSIONE II**

I dati illustrati in questa tesi forniscono la prima evidenza sperimentale dell'importanza di LPA nella regolazione di processi biologici fondamentali delle cellule satelliti, ovvero delle cellule staminali adulte del muscolo scheletrico. Infatti abbiamo qui dimostrato che LPA promuove sia la proliferazione sia la migrazione di cellule satelliti murine mediante cross-talk con l'asse SphK/S1P.

Particolare attenzione è stata posta sul ruolo ricoperto dai specifici recettori del lisofosfolipide nel mediare queste risposte biologiche e sul meccanismo molecolare coinvolto.

I risultati di questa tesi evidenziano il coinvolgimento dei recettori LPA<sub>1/3</sub> nell'azione pro-mitogenica del lisofosfolipide, in quanto l'uso dell'antagonista specifico per LPA<sub>1/3</sub> (Ki16425) comportava una riduzione della proliferazione di cellule satelliti indotta dal lisofosfolipide.

Questi risultati sono in accordo con studi precedentemente effettuati in altri tipi cellulari, tra cui astrociti corticali (Shano et al., 2008) e fibroblasti (van Corven, 1989), in cui è stato dimostrato che il recettore LPA<sub>1</sub> stimola la proliferazione cellulare.

Una migliore caratterizzazione del ruolo dei singoli LPARs in questo effetto biologico, sarà oggetto di studi nel prossimo futuro, in cui verranno impiegati approcci genetici per confermare lo specifico coinvolgimento dei recettori LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub> nell'azione proliferativa di LPA.

Al fine di comprendere il meccanismo molecolare coinvolto nell'effetto mitogenico esercitato dal lisofosfolipide sono stati effettuati esperimenti volti a studiare l'eventuale coinvolgimento delle MAPK. I dati ottenuti in seguito a pre-incubazione con U0126 e LY294002, inibitori specifici delle chinasi a monte dell'attivazione di ERK1/2 e di PI3K/Akt, rispettivamente, hanno dimostrato che nessuna delle due vie di segnalazione è coinvolta nella mitogenesi. Saranno necessari ulteriori studi volti a chiarire la via di segnalazione, a valle dell'attivazione dei recettori LPA<sub>1/3</sub>, che culmina nell'evento finale di proliferazione cellulare.

I dati presentati in questo studio inoltre hanno messo in evidenza per la prima volta che LPA stimola la migrazione di cellule satelliti murine, in accordo con un'ampia gamma di studi che sono stati effettuati su tipi cellulari distinti, quali cellule di cancro alla mammella MDA-MB 231 (Du et al., 2010), cellule di cancro ovarico umano (Kim et al., 2011) e

cellule T (Zhang et al., 2012).

È stato riportato in questa tesi che anche l'effetto chemiotattico di LPA richiede il legame del lisofosfolipide ai suoi recettori: infatti è stato osservato un coinvolgimento nella risposta migratoria indotta dal lisofosfolipide dei recettori LPA<sub>1/3</sub> in quanto tale effetto biologico veniva attenuato a seguito del pre-trattamento con Ki16425. Al fine di meglio caratterizzare il ruolo dei singoli LPARs in questo effetto biologico, saranno necessari nel prossimo futuro studi in cui verranno impiegati approcci genetici per confermare lo specifico coinvolgimento dei recettori LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub> nell'azione motogenica di LPA.

La promozione della migrazione cellulare da parte del lisofosfolipide attraverso un meccanismo che richiede il legame ai recettori LPA<sub>1/3</sub> è in linea con i dati disponibili per gli astrociti di ratto (Sato et al., 2011), per le cellule di cancro del pancreas (Komachi et al., 2009), per i progenitori delle cellule della muscolatura liscia dei vasi (Subramanian et al., 2010), per le cellule muscolari lisce dell'aorta di ratto con conseguente attivazione della via di segnalazione Gi/p38 MAPK (Zhou et al., 2009).

Nel loro complesso, questi risultati dimostrano che LPA svolge un ruolo chiave nella proliferazione e nella migrazione delle cellule satelliti murine. Il meccanismo molecolare implicato in questi effetti biologici del lisofosfolipide appare assai complesso e pertanto, per poterlo definire saranno necessarie ulteriori indagini.

I risultati riportati in questa tesi inoltre dimostrano il coinvolgimento dell'asse SphK/S1P nella regolazione dell'effetto proliferativo e migratorio indotto da LPA in cellule satelliti murine.

Dati precedentemente riportati in letteratura sono a sostegno dell'esistenza di un cross-talk funzionale tra la via di segnalazione di LPA e quella di S1P in cellule cancerose (Ramachandran et al., 2010; Shida et al., 2008). In alcuni tipi cellulari LPA è in grado di regolare positivamente l'espressione di SphK1, enzima chiave nella produzione di S1P e, in accordo con il ruolo biologico esercitato dallo sfingolipide, regolare la migrazione e la crescita cellulare (Shida et al., 2008; Ramachandran et al., 2010).

Per verificare quindi un eventuale cross-talk funzionale tra LPA e l'asse SphK/S1P in cellule satelliti murine, è stata inizialmente analizzata la variazione dell'espressione di SphK1 e SphK2 a seguito del trattamento con LPA. Dai risultati ottenuti mediante Western Blotting è emerso che in cellule satelliti LPA è in grado di indurre l'espressione di SphK1 ma non quella di SphK2. Questo dato è in linea con lavori presenti in letteratura (Ramachandran et al., 2010; Shida et al., 2008).

È stato studiato successivamente attraverso quale meccanismo LPA inducesse l'aumento di

espressione di SphK1 in cellule satelliti murine. Il primo approccio sperimentale ha previsto l'utilizzo di Ki16425, antagonista specifico di LPA<sub>1/3</sub>. L'espressione di SphK1 indotta da LPA risulta completamente annullata dal trattamento con Ki16425, dimostrando il coinvolgimento dei recettori LPA<sub>1/3</sub> nell'up-regolazione di SphK1 da parte del lisofosfolipide, in accordo con numerosi studi riportati in letteratura (Ramachandran et al., 2010; Shida et al., 2008; Shida et al., 2004; Kishi et al., 2006). Infatti Shida e collaboratori (2008) hanno dimostrato che nelle cellule di cancro gastrointestinale MKN1, così come nelle cellule di cancro della mammella MDA-MB-231 e nelle cellule di cancro del colon DLD1, l'up-regolazione di SphK1 da parte di LPA dipende dall'attivazione del recettore LPA<sub>1</sub>. Nelle cellule di cancro gastrointestinale MKN1 è stato anche verificato che LPA induce l'aumento dell'espressione di SphK1 mediante attivazione trascrizionale da parte di ERK1, oltre al fattore di trascrizione C/EBP $\beta$  (CCAAT/enhancer-binding protein  $\beta$  transcription factor) attivato da ERK1 stessa (Ramachandran et al., 2010).

Poiché Ki16425 può interferire anche con le azioni mediate dal recettore LPA<sub>3</sub>, saranno necessari ulteriori esperimenti in cui verranno impiegati approcci genetici per confermare lo specifico coinvolgimento dei recettori LPA<sub>1</sub> e LPA<sub>3</sub> nell'incremento di SphK1 da parte di LPA.

Per mezzo dell'utilizzo dell'inibitore specifico per ERK1/2, U0126, è stato dimostrato che tale via è implicata nell'aumento dell'espressione di SphK1 ad opera di LPA, in accordo con quanto descritto precedentemente (Ramachandran et al., 2010). In conclusione ERK1/2 appare essere a monte della regolazione di SphK1 da parte del lipide bioattivo.

Un importante aspetto che non è stato studiato ma che sarà oggetto di studi nel prossimo futuro riguarda l'identificazione del meccanismo molecolare attraverso il quale LPA porta all'attivazione di ERK1/2, che successivamente si traduce in un aumento dell'espressione di SphK1. Ramachandran e collaboratori hanno dimostrato in cellule di cancro gastrointestinale MKN1 che l'attivazione di ERK1, responsabile dell'incremento dell'espressione di SphK1 da parte di LPA, dipende dal legame del lisofosfolipide al recettore LPA<sub>1</sub> e dalla transattivazione dell'EGFR da parte del lipide bioattivo.

Come già riportato nell'introduzione, SphK1 e SphK2 mostrano differenze circa la loro espressione durante lo sviluppo, la distribuzione nei tessuti dell'adulto e la loro localizzazione subcellulare. Tali diversità sono in linea con il concetto che, sebbene i due enzimi utilizzino lo stesso substrato e generino lo stesso prodotto, possono mediare effetti biologici differenti: SphK1 è associata all'induzione della sopravvivenza e alla proliferazione cellulare (Pyne et al., 2010) mentre SphK2 è correlata ad una diminuzione



della crescita e un aumento dell'apoptosi (Okada et al., 2005), a favore quindi di un ruolo opposto rispetto a quello svolto da SphK1. I risultati presentati in questa tesi sono in accordo con l'idea che le due isoforme di SphK possano avere funzioni opposte riguardo la crescita cellulare. I dati ottenuti in seguito a silenziamento di SphK1 e SphK2, dimostrano il coinvolgimento di entrambe le isoforme enzimatiche ma in senso opposto nella proliferazione indotta da LPA. Nello specifico, è stato messo in evidenza un ruolo negativo della SphK2 e un ruolo positivo di SphK1 nel mediare questo effetto biologico indotto dal lisofosfolipide, in quanto l'effetto mitogenico è aumentato quando i livelli di espressione di SphK2 sono regolati negativamente. Al contrario il silenziamento della SphK1 causava una riduzione della proliferazione indotta dal lipide bioattivo.

Il coinvolgimento della SphK1 nella proliferazione LPA-dipendente è in linea con ciò che emerge da esperimenti condotti su cellule di cancro gastrointestinale in cui la down-regolazione o l'inibizione di SphK1 sopprime la risposta mitogenica indotta dal lisofosfolipide (Ramachandran et al., 2010).

Il trattamento con gli inibitori farmacologici quali SKI-2 e VPC96047, che non distinguono tra le due isoforme di SphK, non determinava alcun effetto significativo sulla proliferazione indotta da LPA. Sulla base dei risultati ottenuti mediante interferenza a RNA si può supporre che il trattamento risultava inefficace a causa dei ruoli opposti dei due isoenzimi nella proliferazione delle cellule satelliti. Tuttavia la pre-incubazione con l'inibitore specifico per SphK1, VPC96091, non aveva alcun effetto sulla proliferazione mediata da LPA, presumibilmente a causa della scarsa efficacia dell'inibitore in questo contesto cellulare o per possibili effetti *off-target* degli agenti farmacologici la cui specificità non è sempre ben stabilita.

In questa tesi è stato accertato che LPA stimola la migrazione di cellule satelliti murine e che esiste un cross-talk funzionale con l'asse SphK/S1P nel mediare questo effetto biologico. Infatti sia il pre-trattamento delle cellule satelliti con gli inibitori specifici per entrambe le isoforme di SphK o per SphK1, sia la down-regolazione di SphK1 e SphK2 tramite tecnica dell'interferenza a RNA, annullano completamente la risposta chemiotattica al lisofosfolipide da parte di questo tipo cellulare. Abbiamo perciò evidenziato la correlazione che esiste tra le due isoforme di SphK e la chemiotassi indotta da LPA, provando in maniera chiara che entrambi gli enzimi sono fondamentali per l'effetto biologico indotto dal lisofosfolipide. I nostri dati sono supportati anche dalla recente pubblicazione in cui è stato dimostrato che LPA media la migrazione delle cellule di cancro gastrointestinale tramite up-regolazione di SphK1 (Shida et al., 2008). Risulta

molto interessante il fatto che non solo è stato dimostrato un effetto mitogenico e chemiotattico del lisofosfolipide, ma è stato anche identificato un ruolo chiave degli enzimi SphK1 e SphK2 nei processi biologici descritti e che la regolazione di SphK1 è dipendente dal legame del lisofosfolipide ai recettori LPA<sub>1/3</sub> e all'attivazione di ERK1/2.

I risultati derivanti da questa tesi hanno messo in risalto che LPA, oltre ad essere un regolatore chiave della biologia delle cellule satelliti in quanto ne promuove la proliferazione e la migrazione, richiede il coinvolgimento dell'asse SphK/S1P nel mediare i suoi effetti biologici. I presenti risultati gettano nuova luce sui ruoli biologici esercitati dal lisofosfolipide in queste cellule staminali e, molto probabilmente, ciò può essere esteso anche ad altre cellule unipotenti o multipotenti, responsabili della riparazione dei tessuti e del processo di rigenerazione. Poiché il meccanismo molecolare alla base della proliferazione e migrazione indotta da LPA implica la regolazione del metabolismo di S1P, è plausibile che questi effetti possano, in futuro, essere sfruttati in strategie volte a migliorare l'efficacia di terapie che propongono l'impiego di cellule satelliti.

## BIBLIOGRAFIA

- Alemany R, van Koppen CJ, Dannberg K, ter Braak M, zu Heringdorf Naunyn DM. *Schimiedeberg's Arch Pharmacol* (2007) **374**:413-428
- Allard J, Barron S, Diaz J, Lubetzki C, Zalc B, Schwartz JC, Sokoloff P. *Eur J Neurosci.* (1998) **10**(3):1045-53
- Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM. *J Cell Physiol.* (1995) **165**(2):307-12
- Allende ML, Dreier JL, Mandala S, Proia RL. *J Biol Chem* (2004) **279**(15):15396-401
- Alvarez SE, Harikumar KB, Hait NC, Allegood J, Strub GM, Kim EY, Maceyka M, Jiang H, Luo C, Kordula T, Milstien S, Spiegel S. *Nature* (2010) **465**(7301):1084-8
- An S, Bleu T, Zheng Y. *Mol Pharmacol* (1999) **55**(5):787-94
- An S, Zheng Y, Bleu T. *J Biol Chem* (2000) **275**(1):288-96
- Ancellin N, Colmont C, Su J, Li Q, Mittereder N, Chac SS, Stefansson S, Liau G, Hla T. *J Biol Chem* (2002) **280**:29462-9
- Anderson DJ, Gage FH, Weissman IL. *Nat Med* (2001) **7**(4):393-5
- Anliker B, Chun J. *J Biol Chem* (2004) **279**(20):20555-8
- Anliker B, Chun J. *Semin Cell Dev Biol* (2004) **15**(5):457-65
- Aoki J, Taira A, Takanezawa Y, Kishi Y, Hama K, Kishimoto T, Mizuno K, Saku K, Taguchi R, Arai H. *J Biol Chem* (2002) **277**(50):48737-44
- Aoki J. *Semin Cell Dev Biol* (2004) **15**:477-89
- Aoki S, Yatomi Y, Ohta M, Osada M, Kazama F, Satoh K, Nakahara K, Ozaki Y. *J Biochem* (2005) **138**(1):47-55
- Auwerx J. *Diabetologia* (1999) **42**(9):1033-49.
- Balazs L, Okolicany J, Ferrebee M, Tolley B, Tigyi G. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2001) **280**(2):R466-72
- Balazs L, Okolicany J, Ferrebee M, Tolley B, Tigyi G. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2001) **280**(2):R466-72
- Bandoh K, Aoki J, Hosono H, Kobayashi S, Kobayashi T, Murakami-Murofushi K, Tsujimoto M, Arai H, Inoue K. *J Biol Chem* (1999) **274**(39):27776-85
- Baranowski M, Charmas M, Dlugolecka B, Gorski J. *Acta Physiol (Oxf)* (2011) **203**(3):373-80
- Baumruker T, Prieschl EE. *Int Arch Allergy Immunol* (2000) **122**(2):85-90
- Becciolini L, Meacci E, Donati C, Cencetti F, Rapizzi E, Bruni P. *Biochim Biophys Acta* (2006) **1761**(1):43-51
- Bencini C, Squecco R, Piperio C, Formigli L, Meacci E, Nosi D, Tiribilli B, Vassalli M, Quercioli F, Bruni P, Zecchi Orlandini S, Francini F. *J Muscle Res Cell Motil* (2003) **24**, 539-554
- Berkes CA and Tapscott SJ. *Sem. Cell Dev. Biol* (2005) **16**, 585-595
- Bernacchioni C, Cencetti F, Blescia S, Donati C, Bruni P. *Skelet Muscle* (2012) **2**(1):15
- Bernacchioni C, Cencetti F, Kwon MJ, Gwak HS, Jeong SK, Bruni P, Donati C. *Int J Immunopathol Pharmacol* (2011) **24**(1):55-62
- Bischoff R, Heintz C. *Dev Dyn* (1994) (1):41-54
- Bischoff A, Czyborra P, Meyer Zu Heringdorf D, Jakobs KH, Michel MC. *Br J Pharmacol* (2000) **130**(8):1878-83
- Boucher J, Quilliot D, Praderes JP, Simon MF, Gres S, Guigne C, Prevot D, Ferry G, Boutin JA, Carpenne C, Valet P, Saulnier-Blache JS. *Diabetologia* (2005) **48**(3):569-77
- Brindley DN, Pilquil C, Sariahmetoglu M, Reue K. *Biochim Biophys Acta* (2009) **1791**(9):956-61

- Brinkmann V, Davis MD, Heise CE, Albert R, Cottens S, Hof R, Bruns C, Prieschl E, Baumruker T, Hiestand P, Foster CA, Zollinger M, Lynch KR. *J Biol Chem* (2002) **277**(24):21453-7
- Brinkmann V, Lynch KR. *Curr Opin Immunol* (2002) **14**(5):569-75
- Brinkmann V, Pinschewer DD, Feng L, Chen S. *Transplantation* (2001) **72**(5):764-9
- Bruni P, Donati C. *Cell Mol Life Sci* (2008) **65**(23):3725-36
- Burks TN, Cohn RD. *Skelet Muscle* (2011) **1**(1):19
- Cabello-Verrugio C, Cordova G, Vial C, Zuniga LM, Brandan E. *Cell Signal* (2011) **23**(2):449-57
- Calise S, Blescia S, Cencetti F, Bernacchioni C, Donati C, Bruni P. *Biochim Biophys Acta* (2012) **1823**(2):439-50
- Campbell DS, Holt CE. *Neuron* (2001) **32**(6):1013-26
- Carlson ME, Suetta C, Conboy MJ, Aagaard P, Mackey A, Kjaer M, Conboy I. *EMBO Mol Med* (2009) **1**:381-391
- Carosio S, Berardinelli MG, Aucello M, Musarò A. *Ageing Res Rev* (2011) **10**(1):35-42
- Cencetti F, Bernacchioni C, Nincheri P, Donati C, Bruni P. *Mol Biol Cell* (2010) **21**(6):1111-24
- Cervera P, Tirard M, Barron S, Allard J, Trottier S, Lacombe J, Daumas-Duport C, Sokoloff P. *Glia* (2002) **38**(2):126-36
- Chalfant CE, Spiegel S. *J Cell Sci* (2005) **118**(Pt 20):4605-12
- Chan LC, Peters W, Xu Y, Chun J, Farese RV Jr, Cases S. *J Leukoc Biol* (2007) **82**(5):1193-200
- Charge S, Rudnicki MA. *Cell* (2003) **113**:422-423
- Charge SB, Rudnicki MA. *Physiol Rev* (2004) **84**, 209-238
- Chen R, Roman J, Guo J, West E, McDyer J, Williams MA, Georas SN. *Stem Cells Dev* (2006) **15**(6):797-80
- Cheresch DA, Leng J, Klemke RL. *J Cell Biol* (1999) **146**(5):1107-16
- Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, Kataoka H, Kawaguchi T, Ohtsuki M, Hoshino Y. *J Immunol* (1998) **160**(10):5037-44
- Choi JW, Lee CW, Chun J. *Biochim Biophys Acta* (2008) **1781**(9):531-9
- Chopard A, Hillock S, Jasmin BJ. *J Cell Mol Med* (2009) **13**(9B):3032-50
- Chun J, Brinkmann V. *Discov Med* (2011) **12**(64):213-28
- Chun J, Goetzl EJ, Hla T, Igarashi Y, Lynch KR, Moolenaar W, Pyne S, Tigyi G. *Pharmacol Rev* (2002) **54**(2):265-9
- Ciciliot S, Schiaffino S. *Curr Pharm Des* (2010) **16**(8):906-14
- Clemmons DR. *Trends Endocrinol Metab* (2009) **20**:349-356.
- Cohn RD, van Erp C, Habashi JP, Soleimani AA, Klein EC, Lisi MT, Gamradt M, ap Rhys CM, Holm TM, Loeys BL, Ramirez F, Judge DP, Ward CW, Dietz HC. *Nat Med* (2007) **13**(2):204-10 Erratum in: *Nat Med* (2007) **13**(4):511
- Contos JJ, Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Chun J. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2000) **97**(24):13384-9
- Contos JJ, Ishii I, Chun J. *Mol Pharmacol* (2000) **58**(6):1188-96
- Contos JJ, Ishii I, Fukushima N, Kingsbury MA, Ye X, Kawamura S, Brown JH, Chun J. *Mol Cell Biol* (2002) **22**(19):6921-9
- Cornelison DD, Wold BJ. *Dev Biol* (1997) **191**(2):270-83
- Czifra G, Toth IB, Marincsak R, Juhasz I, Kovacs I, Acs P, Kovacs L, Blumberg PM, Biro T. *Cell Signal* (2006) **18**:1461-1472.
- Danieli-Betto D, Germinario E, Esposito A, Megighian A, Midrio M, Ravara B, Damiani E, Libera LD, Sabbadini RA, Betto R. *Am J Physiol Cell Physiol* (2005) **288**(6):C1367-73
- Davaille J, Gallois C, Habib A, Li L, Mallat A, Tao J, Levade T, Lotersztajn S. *J Biol Chem* (2000) **275**:34628-34633
- De Larichaudy J, Zufferli A, Serra F, Isidori AM, Naro F, Dessalle K, Desgeorges M, Piraud M, Cheillan D, Vidal H, Lefai E, Nemoz G. *Skelet Muscle* (2012) **2**(1):2

- De Sampaio ESTC, Choi JW, Gardell SE, Herr DR, Rehen SK, Gomes FC, Chun J. et al. *J Biol Chem* (2008) **283**:7470-79
- Demoyer JS, Skalak TC, Durieux ME. *Wound Repair Regen* (2000) **8**(6):530-7
- Deng W, Balazs L, Wang DA, Van Middlesworth L, Tigyi G, Johnson LR. *Gastroenterology* (2002) **123**(1):206-16
- Ding G, Sonoda H, Yu H, Kajimoto T, Goparaju SK, Jahangeer S, Okada T, Nakamura S. *J Biol Chem* (2007) **282**:27493-27502.
- Donati C, Cencetti F, Nincheri P, Bernacchioni C, Brunelli S, Clementi E, Cossu G, Bruni P. *Stem Cells* (2007) **25**(7):1713-9
- Donati C, Meacci E, Nuti F, Becciolini L, Farnararo M, Bruni P. *FASEB J* (2005) **19**(3):449-51
- Doumit ME, Cook DR, Merkel RAJ. *Cell Physiol* (1993) **157**:326-332
- Du J, Sun C, Hu Z, Yang Y, Zhu Y, Zheng D, Gu L, Lu X. *PLoS One* (2010) **5**(12):e15940
- Eichholtz T, Jalink K, Fahrenfort I, Moolenaar WH. *Biochem J* (1993) **291** ( Pt 3):677-80
- El-Shewy HM, Johnson KR, Lee MH, Jaffa AA, Obeid LM, Luttrell LM. *J Biol Chem* (2006) **281**(42):31399-407
- Endo A, Nagashima K, Kurose H, Mochizuki S, Matsuda M, Mochizuki N. *J Biol Chem* (2002) **277**(26):23747-54
- Estivill-Torrus G, Llebreg-Zayas P, Matas-Rico E, Santin L, Pedraza C, De Diego I, Del Arco I, Fernandez-Llebreg P, Chun J, De Fonseca FR. *Cereb Cortex* (2008) **18**(4):938-50
- Ferry G, Tellier E, Try A, Groes S, Naime I, Simon MF, Rodriguez M, Boucher J, Tack I, Gesta S, Chomarat P, Dieu M, Raes M, Galizzi JP, Valet P, Boutin JA, Saulnier-Blache JS. *J Biol Chem* (2003) **278**(20):18162-9
- Fiore F, Sebille A, Birnbaum D. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) **272**:138-143.
- Floss T, Arnold HH, Braun T. *Genes Dev* (1997) **11**:2040-2051
- Fourcade O, Simon MF, Viode C, Rugani N, Leballe F, Ragab A, Fournie B, Sarda L, Chap H. *Cell* (1995) **80**(6):919-27
- Frohnert PW, Stonecypher MS, Carroll SL. *J Neuropathol Exp Neurol* (2003) **62**(5):520-9
- Fujita R, Ma Y, Ueda H. *J Neurochem* (2008) **107**(1):152-60
- Fukushima N, Ishii I, Contos JJ, Weiner JA, Chun J. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* (2001) **41**:507-34
- Fukushima N, Kimura Y, Chun J. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1998) **95**(11):6151-6
- Fukushima N, Weiner JA, Chun J. *Dev Biol* (2000) **228**(1):6-18
- Fukushima N, Weiner JA, Kaushal D, Contos JJ, Rehen SK, Kingsbury MA, Kim KY, Chun J. *Mol Cell Neurosci* (2002) **20**(2):271-82
- Fyrst H, Saba JD. *Nature Chemical Biology* (2010) **6**:489-497
- Garcia JG, Liu F, Verin AD, Birukova A, Dechert MA, Gerthoffer WT, Bamberg JR, English D. *J Clin Invest* (2001) **108**(5):689-701
- Geeves MA, Holmes KC. *Annu Rev Biochem* (1999) **68**: 687–728
- Germinario E, Peron S, Toniolo L, Betto R, Cencetti F, Donati C, Bruni P, Danieli-Betto D. *J Appl Physiol* (2012) **113**(5):707-13
- Gobeil F Jr, Bernier SG, Vazquez-Tello A, Brault S, Beauchamp MH, Quiniou C, Marrache AM, Checchin D, Sennlaub F, Hou X, Nader M, Bkaily G, Ribeiro-da-Silva A, Goetzl EJ, Chemtob S. *J Biol Chem* (2003) **278**(40):38875-83
- Goetzl EJ, Kong Y, Mei B. *J Immunol* (1999) **162**(4):2049-56
- Goetzl EJ, Kong Y, Voice JK. *J Immunol* (2000) **164**(10):4996-9
- Gonda K, Okamoto H, Takuwa N, Yatomi Y, Okazaki H, Sakurai T, Kimura S, Sillard R, Harii K, Takuwa Y. *Biochem J* (1999) **337** ( Pt 1):67-75
- Goparaju SK, Jolly PS, Watterson KR, Bektas M, Alvarez S, Sarkar S, Mel L, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S. *Mol Cell Biol* (2005) **25**(10):4237-49
- Graeler M, Goetzl EJ. *FASEB J* (2002) **16**(14):1874-8
- Graeler M, Shankar G, Goetzl EJ. *J Immunol* (2002) **169**(8):4084-7
- Gräler MH, Bernhardt G, Lipp M. *Genomics* (1998) **53**:164-169

- Gräler MH, Grosse R, Kusch A, Kremmer E, Gudermann T, Lipp M. *J Cell Biochem* (2003) **89**(3):507-19
- Gros J, Manceau M, Thome V and Marcelle C. *Nature* (2005) **435**:954-958
- Hama K, Aoki J, Bandoh K, Inoue A, Endo T, Amano T, Suzuki H, Arai H. *Life Sci* (2006) **79**(18):1736-40
- Hama K, Aoki J, Fukaya M, Kishi Y, Sakai T, Suzuki R, Ohta H, Yamori T, Watanabe M, Chun J, Arai H. *J Biol Chem* (2004) **279**(17):17634-9
- Hannun YA, Obeid LM. *J Biol Chem* (2002) **277**(29):25847-50
- Harrison SM, Reavill C, Brown G, Brown JT, Cluderay JE, Crook B, Davies CH, Dawson LA, Grau E, Heidbreder C, Hemmati P, Hervieu G, Howarth A, Hughes ZA, Hunter AJ, Latcham J, Pickering S, Pugh P, Rogers DC, Shilliam CS, Maycox PR. *Mol Cell Neurosci* (2003) **24**(4):1170-9
- Hashimoto T, Igarashi J, Kosaka H. *J Lipid Res* (2009) **50**(4):602-10
- Hawke TJ, Garry DJ. *J Appl Physiol* (2001) **91**:534-551
- He X, H'ng SC, Leong DT, Hutmacher DW, Melendez AJ. *J Mol Cell Biol* (2010) **2**(4):199-208
- Hecht JH, Weiner JA, Post SR, Chun J. *J Cell Biol* (1996) **135**(4):1071-83
- Herr DR, Grillet N, Schwander M, Rivera R, Muller U, Chun J. *J Neurosci* (2007) **27**(6):1474-8
- Hilber K. *Curr Opin Pharmacol* (2008) **8**(3):327-32
- Hla T. *Prostaglandins* (2001) **64**(1-4):135-142
- Hla T. *Semin Cell Dev Biol* (2004) **15**(5):513-20
- Hobson JP, Rosenfeldt HM, Barak LS, Olivera A, Poulton S, Caron MG, Milstien S, Spiegel S. *Science* (2001) **291**(5509):1800-3
- Holtsberg FW, Steiner MR, Bruce-Keller AJ, Keller JN, Mattson MP, Moyers JC, Steiner SM. *J Neurosci Res* (1998) **53**(6):685-96
- Igarashi J, Bernier SG, Michel T. *J Biol Chem* (2001) **276**(15):12420-6
- Igarashi J, Michel T. *J Biol Chem* (2000) **275**(41):32363-70
- Igarashi N, Okada T, Hayashi S, Fujita T, Jahangeer S, Nakamura S. *J Biol Chem* (2003) **278**(47):46832-46839
- 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, Fujiwara K. *Gastroenterology* (2003) **124**(2):459-69
- Im DS, Heise CE, Harding MA, George SR, O'Dowd BF, Theodorescu D, Lynch KR. *Mol Pharmacol* (2000) **57**(4):753-9
- Inniss K, Moore H. *Stem Cells Dev* (2006) **15**(6):789-96
- Inoue M, Rashid MH, Fujita R, Contos JJ, Chun J, Ueda H. *Nat Med* (2004) **10**(7):712-8. Erratum in: *Nat Med* (2004) **7**(10):755
- Inoue M, Xie W, Matsushita Y, Chun J, Aoki J, Ueda H. *Neuroscience* (2008) **152**(2):296-8
- Inoue M, Yamaguchi A, Kawakami M, Chun J, Ueda H. *Mol Pain* (2006) **16**:2:25
- Ishii I, Contos JJ, Fukushima N, Chun J. *Mol Pharmacol* (2000) **58**(5):895-902
- Ishii I, Friedman B, Ye X, Kawamura S, McGiffert C, Contos JJ, Kingsbury MA, Zhang G, Brown JH, Chun J. *J Biol Chem* (2001) **276**(36):33697-704
- Ishii I, Fukushima N, Ye X, Chun J. *Annu Rev Biochem* (2004) **73**:321-54
- Ishii I, Ye X, Friedman B, Kawamura S, Contos JJ, Kingsbury MA, Yang AH, Zhang G, Brown JH, Chun J. *J Biol Chem* (2002) **277**(28):25152-9
- Janssen I, Heymsueld SB, Wang ZM, Ross R. *J Appl Physiol* (2000) **89**:81-88
- Jean-Baptiste G, Yang Z, Khoury C, Greenwood MT. *Biochem Biophys Res Commun* (2005) **335**(4):1155-62
- Ji Woong Choi, Chang-Wook Lee, Jerold Chun. *Biochim Biophys Acta* (2008) **1781**(9):531-539
- Jolly PS, Bektas M, Olivera A, Gonzalez-Espinosa C, Proia RL, Rivera J, Milstien S, Spiegel S. *J Exp Med* (2004) **199**(7):959-70

- Kanda H, Newton R, Klein R, Morita Y, Gunn MD, Rosen SD. *Nat Immunol* (2008) **9**(4):415-23
- Karin M, Liu Z, Zandi E. *Curr Opin Cell Biol* (1997) **9**(2):240-6
- Keisuke Yanagida, Kayo Masago, Hiroki Nakanishi, Yasuyuki Kihara, Fumie Hamano, Yoko Tajima, Ryo Taguchi, Takao Shimizu, Satoshi Ishii. *J Biol Chem* (2009) **284**(26): 17731-17741
- Keller JN, Steiner MR, Holtsberg FW, Mattson MP, Steiner SM. *J Neurochem* (1997) **69**(3):1073-84
- Kim EK, Park JM, Lim S, Choi JW, Kim HS, Seok H, Seo JK, Oh K, Lee DS, Kim KT, Ryu SH, Suh PG. *J Biol Chem* (2011) **286**(27):24036-45
- Kim J, Keys JR, Eckhart AD. *Cell Signal* (2006) **18**(10):1695-701
- Kim RH, Taksbe K, Milstien S, Spiegel S. *Biochim Biophys Acta* (2009) **1791**:692-696
- Kimura A, Ohmori T, Ohkawa R, Madoiwa S, Mimuro J, Murakami T, Kobayashi E, Hoshino Y, Yatomi Y, Sakata Y. *Stem Cells* (2007) **25**(1):115-24
- Kimura T, Watanabe T, Sato K, Kon J, Tomura H, Tamama K, Kuwabara A, Kanda T, Kobayashi I, Ohta H, Ui M, Okajima F. *Biochem J* (2000) **348** Pt 1:71-6
- Kingsbury MA, Rehen SK, Contos JJ, Higgins CM, Chun J. *Nat Neurosci* (2003) **6**(12):1292-9
- Kishi Y, Okudaira S, Tanaka M, Hama K, Shida D, Kitayama J, Yamori T, Aoki J, Fujimaki T, Arai H. *J Biol Chem* (2006) **281**(25):17492-500
- Kohno T, Matsuyuki H, Inagaki Y, Igarashi Y. *Genes Cells* (2003) **8**(8):685-97
- Komachi M, Tomura H, Malchinkhuu E, Tobo M, Mogi C, Yamada T, Kimura T, Kuwabara A, Ohta H, Im DS, Kurose H, Takeyoshi I, Sato K, Okajima F. *Carcinogenesis* (2009) **30**(3):457-65
- 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, Okajima F. *J Biol Chem* (1999) **274**(34):23940-7
- Kooijman EE, Chupin V, de Kruijff B, Burger KN. *Traffic* (2003) **4**(3):162-74
- Kotarsky K, Boketoft A, Bristulf J, Nilsson NE, Norberg A, Hansson S, Owman C, Sillard R, Leeb-Lundberg LM, Olde B. *J Pharmacol Exp Ther* (2006) **318**(2):619-28
- Kuang S, Gillespie MA, Rudnicki MA. *Cell Stem Cell* (2008) **2**:22-31
- Kwon YB, Kim CD, Youm JK, Gwak HS, Park BD, Lee SH, Jeon S, Kim BJ, Seo YJ, Park JK, Lee JH. *J Lipid Res* (2007) **48**(9):1936-43
- Lai YJ, Chen CS, Lin WC, Lin FT. *Mol Cell Biol* (2005) **25**(14):5859-68
- Lai YJ, Lin WC, Lin FT. *J Biol Chem* (2007) **282**(33):24381-7
- Lassar AB, Davis RL, Wright WE, Kadesch T, Murre C, Voronova A, Baltimore D, Weintraub H. *Cell* (1991) **66**:305-315
- Le Grand F, Rudnicki M. *Development* (2007) **134**(22):3953-7
- Le Stunff HL, Milstien S, Spiegel S. *J Cell Biochem* (2004) **92**:882-899
- Lee CW, Rivera R, Dubin AE, Chun J. *J Biol Chem* (2007) **282**(7):4310-7
- Lee CW, Rivera R, Gardell S, Dubin AE, Chun J. *J Biol Chem* (2006) **281**(33):23589-97
- Lee H, Goetzl EJ, An S. *Am J Physiol Cell Physiol* (2000) **278**(3):C612-8
- Lee HY, Bae GU, Jung ID, Lee JS, Kim YK, Noh SH, Stracke ML, Park CG, Lee HW, Han JW. *FEBS Lett.* (2002) **515**(1-3):137-40
- Lee MJ, Thangada S, Claffey KP, Ancellin N, Liu CH, Kluk M, Volpi M, Sha'afi RI, Hla T. *Cell* (1999) **99**(3):301-12
- Lee MJ, Thangada S, Paik JH, Sapkota GP, Ancellin N, Chae SS, Wu M, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Alessi DR, Hla T. *Mol Cell* (2001) **8**(3):693-704
- Lee MJ, Van Brocklyn JR, Thangada S, Liu CH, Hand AR, Menzeleev R, Spiegel S, Hla T. *Science* (1998) **279**(5356):1552-5
- Lee ML, Krutzsch HC, Unsworth EJ, Arestad A, Cioce V, Schiffmann E, Liotta LA. *J Biol Chem* (1992) **267**(4):2524-9
- Lee Z, Cheng CT, Zhang H, Subler MA, Wu J, Mukherjee A, Windle JJ, Chen CK, Fang X. *Mol Biol Cell* (2008) **19**(12):5435-45

- Lepley D, Paik JH, Hla T, Ferrer F. *Cancer Res* (2005) **65**(9):3788-95
- Li Y, Gonzalez MI, Meinkoth JL, Field J, Kazanietz MG, Tennekoon GI. *J Biol Chem* (2003) **278**(11):9585-91
- Li YP, Schwartz RJ. *FASEB J* (2001) **15**(8):1413-5
- Lin FT, Lai YJ. *Biochim Biophys Acta* (2008) **1781**(9):558-62
- Lin ME, Herr DR, Chun J. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2010) **91**(3-4):130-8
- Liu CH, Hla T. *Genomics* (1997) **43**(1):15-24
- Liu H, Chakravarty D, Maceyka M, Milstien S, Spiegel S. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (2002) **71**:493-511
- Liu H, Toman RE, Goparaju SK, Maceyka M, Nava VE, Sankala H, Payne SG, Bektas M, Ishii I, Chun J, Milstien S, Spiegel S. *J Biol Chem* (2003) **278**(41):40330-6
- Liu Y, Wada R, Yamashita T, Mi Y, Deng CX, Hobson JP, Rosenfeldt HM, Nava VE, Chae SS, Lee MJ, Liu CH, Hla T, Spiegel S, Proia RL. *J Clin Invest* (2000) **106**(8):951-61
- Long JS, Fujiwara Y, Edwards J, Tannahill CL, Tigyi G, Pyne S, Pyne NJ. *J Biol Chem* (2010) **285**(46):35957-66
- Lusis AJ. *Nature* (2000) **407**(6801):233-41
- Ma MM, Chen JL, Wang GG, Wang H, Lu Y, Li JF, Yi J, Yuan YJ, Zhang QW, Mi J, Wang LSh, Duan HF, Wu CT. *Diabetologia* (2007) **50**(4):891-900
- Maceyka M, Harikumar KB, Milstien S, Spiegel S. *Trends Cell Biol* (2012) **22**(1):50-60
- Maceyka M, Payne SG, Milstien S, Spiegel S. *Biochim Biophys Acta* (2002) **1585**:193-201
- Maceyka M, Sankala H, Hait NC, Le Stunff H, Liu H, Toman R, Collier C, Zhang M, Satin L, Merrill Jr. AH, Milstien S, Spiegel S. *J Biol Chem* (2005) **280**:37118-37129
- MacLennan AJ, Carney PR, Zhu WJ, Chaves AH, Garcia J, Grimes JR, Anderson KJ, Roper SN, Lee N. *Eur J Neurosci* (2001) **14**(2):203-9
- Mandala S, Hajdu R, Bergstrom J, Quackenbush E, Xie J, Milligan J, Thornton R, Shei GJ, Card D, Keohane C, Rosenbach M, Hale J, Lynch CL, Rupprecht K, Parsons W, Rosen H. *Science* (2002) **296**(5566):346-9
- Mann CJ, Perdiguero E, Kharraz Y, Aguilar S, Pessina P, Serrano AL, Munoz-Canoves P. *Skelet Muscle* (2011) **1**(1):21
- Manning TJ Jr, Sontheimer H. *Glia* (1997) **20**(2):163-72
- Mathes C, Fleig A, Penner R. *J Biol Chem* (1998) **273**:25020-25030
- Matloubian M, Lo CG, Cinamon G, Lesneski MJ, Xu Y, Brinkmann V, Allende ML, Proia RL, Cyster JG. *Nature* (2004) **427**(6972):355-60
- Matsumura K, Campbell KP. *Neuromuscul Disord* (1993) **3**(2):109-18
- Mattie M, Brooker G, Spiegel S. *J Biol Chem* (1994) **269**:3181-3188
- Mauro A. *J Biophys Biochem Cytol* (1961) **9**:493-495
- McIntyre TM, Pontsler AV, Silva AR, St Hilaire A, Xu Y, Hinshaw JC, Zimmerman GA, Hama K, Aoki J, Arai H, Prestwich GD. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) **100**(1):131-6. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A.* (2003) **100**(4):2163
- Meacci E, Cencetti F, Donati C, Nuti F, Becciolini L, Bruni P. *Biochem J* (2004) **381**:655-663
- Meacci E, Cencetti F, Donati C, Nuti F, Farnararo M, Kohno T, Igarashi Y, Bruni P. *Biochim Biophys Acta* (2003) **1633**(3):133-42
- Meacci E, Cencetti F, Formigli L, Squecco R, Donati C, Tiribilli B, Quercioli F, Zecchi Orlandini S, Francini F, Bruni P. *Biochem J* (2002) **362**(Pt 2):349-57
- Meacci E, Donati C, Cencetti F, Romiti E, Bruni P. *FEBS Lett* (2000) **482**(1-2):97-101
- Meacci E, Nuti F, Donati C, Cencetti F, Farnararo M, Bruni P. *J Cell Physiol* (2008) **214**(1):210-20
- Meacci E, Vasta V, Donati C, Farnararo M, Bruni P. *FEBS Lett.* (1999) **457**(2):184-8
- Meyer zu Heringdorf D, Lass H, Kuchar I, Alemany R, Guo Y, Schmidt M, Jakobs KH. *FEBS Lett* (1999) **461**(3):217-22
- Mills GB, Moolenaar WH. *Nat Rev Cancer* (2003) **3**:582-91
- Minetti GC, Feige JN, Rosenstiel A, Bombard F, Meier V, Werner A, Bassilana F, Sailer AW, Kahle P, Lambert C, Glass DJ, Fornaro M. *Sci Signal* (2011) **4**(201):ra80



- Mitra P, Oskeritzian CA, Payne SG, Beaven MA, Milstien S, Spiegel S. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* (2006) **103**:16394-16399
- Moller T, Contos JJ, Musante DB, Chun J, Ransom BR. *J Biol Chem* (2001) **276**(28):25946-52
- Morales-Ruiz M, Lee MJ, Zollner S, Gratton JP, Scotland R, Shiojima I, Walsh K, Hla T, Sessa WC. *J Biol Chem* (2001) **276**(22):19672-7
- Morgan JE, Partridge TA. *Int J Biochem Cell Biol* (2003) **35**:1151-1156
- Murakami M, Shiraishi A, Tabata K, Fujita N. *Biochem Biophys Res Commun* (2008) **371**(4):707-12
- Murata J, Lee HY, Clair T, Krutzsch HC, Arestad AA, Sobel ME, Liotta LA, Stracke ML. *J Biol Chem* (1994) **269**(48):30479-84
- Nagata Y, Partridge TA, Matsuda R, Zammit PS. *J Cell Biol* (2006) **174**:245-253
- Nam SW, Clair T, Kim YS, McMarlin A, Schiffmann E, Liotta LA, Stracke ML. *Cancer Res* (2001) **61**(18):6938-44
- Narici MV, de Boer MD. *Eur J Appl Physiol* (2011) **111**(3):403-20
- Neves SR, Ram PT, Lyengar R. *Science* (2002) **296**, 1636-1639
- Niedernberg A, Blaukat A, Schoneberg T, Kostenis E. *Br J Pharmacol* (2003) **138**:481-93
- Nincheri P, Bernacchioni C, Cencetti F, Donati C, Bruni P. *Cell Signal* (2010) **22**(11):1688-99
- Nincheri P, Luciani P, Squecco R, Donati C, Bernacchioni C, Borgognoni L, Luciani G, Benvenuti S, Francini F, Bruni P. *Cell Mol Life Sci* (2009) **66**(10):1741-54
- Noguchi K, Herr D, Mutoh T, Chun J. *Curr Opin Pharmacol* (2009) **9**(1):15-23
- Noguchi K, Ishii S, Shimizu T. *J Biol Chem* (2003) **278**(28):25600-6
- Oh DY, Yoon JM, Moon MJ, Hwang JI, Choe H, Lee JY, Kim JI, Kim S, Rhim H, O'Dell DK, Walker JM, Na HS, Lee MG, Kwon HB, Kim K, Seong JY. *J Biol Chem* (2008) **283**(30):21054-64
- Okada T, Ding G, Sonoda H, Kajimoto T, Haga Y, Khosrowbeygi A, Gao S, Miwa N, Jahangeer S, Nakamura S. *J Biol Chem* (2005) **280**(43):36318-25
- Okamoto H, Takuwa N, Gonda K, Okazaki H, Chang K, Yatomi Y, Shigematsu H, Takuwa Y. *J Biol Chem* (1998) **273**(42):27104-10
- Okamoto H, Takuwa N, Yokomizo T, Sugimoto N, Sakurada S, Shigematsu H, Takuwa Y. *Mol Cell Biol* (2000) **20**:9247-9261
- Olivera A, Kohama T, Edsall L, Nava V, Cuvillier O, Poulton S, Spiegel S. *J Cell Bio* (1999) **147**:545-558
- Olivera A, Rosenthal J, Spiegel S. *J cell Biochem* (1996) **60**:529-537
- Owens GK, Kumar MS, Wamhoff BR. *Physiol Rev* (2004) **84**(3):767-801
- Pages C, Daviaud D, An S, Krief S, Lafontan M, Valet P, Saulnier-Blache JS. *J Biol Chem* (2001) **276**(15):11599-605
- Paik JH, Chae Ss, Lee MJ, Thangada S, Hla T. *J Biol Chem* (2001) **276**(15):11830-7
- Pamuklar Z, Federico L, Liu S, Umezue-Goto M, Dong A, Panchatcharam M, Fulkerson Z, Berdyshev E, Natarajan V, Fang X, van Meeteren LA, Moolenaar WH, Mills GB, Morris AJ, Smyth SS. *J Biol Chem* (2009) **284**(11):7385-94. Erratum in: *J Biol Chem* (2009) **284**(31):21100
- Panchatcharam M, Miriyala S, Yang F, Rojas M, End C, Vallant C, Dong A, Lynch K, Chun J, Morris AJ, Smyth SS. *Circ Res* (2008) **103**(6):662-70
- Panther E, Idzko M, Corinti S, Ferrari D, Herouy Y, Mockenhaupt M, Dichmann S, Gebicke-Haerter P, Di Virgilio F, Girolomoni G, Norgauer J. *J Immunol* (2002) **169**(8):4129-35
- Pasternack SM, von Kugelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Ruschendorf F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nurnberg P, Nuthen MM, Betz RC. *Nat Genet* (2008) **40**(3):329-34
- Pebay A, Bonder CS, Pitson SM. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2007) **84**:83-97
- Peest U, Sensken SC, Andreani P, H $\sqrt$ Snel P, Van Veldhoven PP, Graler MH. *J Cell Biochem* (2008) **104**(3):756-72

- Pilpel Y, Segal M. *J Neurochem* (2006) **97**(5):1379-92
- Pilquill C, Dewald J, Cherney A, Gorshkova I, Tigyi G, English D, Natarajan V, Brindley DN. *J Biol Chem* (2006) **281**(50):38418-29
- Pitson SM, Moretti PA, Zebol JR, Lynn HE, Xia P, Vadas MA, Wattenberg BW. *EMBO J* (2003) **22**(20):5491-500
- Pitson SM. *Trends Biochem Sci* (2011) **36**(2):97-107
- Pyne NJ, Pyne S. *Front Pharmacol* (2011) **2**:26
- Pyne NJ, Pyne S. *Nat Rev Cancer* (2010) **10**:489-503
- Pyne S, Pyne NJ. *Biochem J* (2000) **349**(Pt 2):385-402
- Ramachandran S, Shida D, Nagahashi M, Fang X, Milstien S, Takabe K, Spiegel S. *FEBS Lett* (2010) **584**(18):4077-82
- Rao TS, Lariosa-Willingham KD, Lin FF, Palfreyman EL, Yu N, Chun J, Webb M. *Brain Res* (2003) **990**(1-2):182-94
- Rapizzi E, Donati C, Cencetti F, Nincheri P, Bruni P. *Mol Cell Biochem* (2008) **314**(1-2):193-9
- Rapizzi E, Taddei ML, Fiaschi T, Donati C, Bruni P, Chiarugi P. *Cell Mol Life Sci* (2009) **66**(19):3207-18
- Reutens AT, Begley CG. *Int J Biochem Cell Biol* (2002) **34**(10):1173-7
- Rhee HJ, Nam JS, Sun Y, Kim MJ, Choi HK, Han DH, Kim NH, Huh SO. *Neuroreport* (2006) **17**(5):523-6
- Romiti E, Meacci E, Tani M, Nuti F, Farnararo M, Ito M, Bruni P. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) **275**:746-75
- Rosen ED, Spiegelman BM. *J Biol Chem* (2001) **276**(41):37731-4
- Rosen H, Alfonso C, Surh CD, McHeyzer-Williams MG. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (2003) **100**(19):10907-12
- Rosen H, Goetzl EJ. *Nat Rev Immunol* (2005) **5**(7):560-70
- Rosenblatt JD, Lunt AI, Parry DJ, Partridge TA. *In vitro Cell Dev Biol An* (1995) **10**:773-779
- Rosenfeldt HM, Hobson JP, Milstien S, Spiegel S. *Biochem Soc Trans* (2001) **29**(Pt 6):836-9
- Rother E, Brandl R, Baker DL, Goyal P, Gebhard H, Tigyi G, Siess W. *Circulation* (2003) **108**(6):741-7
- Rubinfeld J, Guo J, Sookrung N, Chen R, Chaicumpa W, Casolaro V, Zhao Y, Natarajan V, Georas S. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* (2006) **290**(1):L66-74
- Salomone S, Potts EM, Tyndall S, Ip PC, Chun J, Brinkmann V, Waeber C. *Br J Pharmacol* (2008) **153**(1):140-7
- Salomone S, Waeber C. *Front Pharmacol* (2011) **2**:9
- Sandri M. *Physiology (Bethesda)* (2008) **23**:160-70
- Sanna MG, Liao J, Jo E, Alfonso C, Ahn MY, Peterson MS, Webb B, Lefebvre S, Chun J, Gray N, Rosen H. *J Biol Chem* (2004) **279**(14):13839-48
- Sano T, Baker D, Virag T, Wada A, Yatomi Y, Kobayashi T, Igarashi Y, Tigyi G. *J Biol Chem* (2002) **277**(24):21197-206
- Sassoli C, Formigli L, Bini F, Tani A, Squecco R, Battistini C, Zecchi-Orlandini S, Francini F, Meacci E. *J Cell Mol Med* (2011) **15**(11):2498-511
- Sato K, Horiuchi Y, Jin Y, Malchinkhuu E, Komachi M, Kondo T, Okajima F. *J Neurochem* (2011) **117**(1):164-74
- Schiaffino S, Reggiani C. *Physiol Rev* (2011) **91**:1447-1531
- Schiaffino S, Sandri M, Murgia M. *Physiology (Bethesda)* (2007) **22**:269-78
- Schilling T, Repp H, Richter H, Koschinski A, Heinemann U, Dreyer F, Eder C. *Neuroscience* (2002) **109**(4):827-35
- Schilling T, Stock C, Schwab A, Eder C. *Eur J Neurosci* (2004) **19**(6):1469-74
- Schmidt A, Wolde M, Thiele C, Fest W, Kratzin H, Podtelejnikov AV, Witke W, Huttner WB, Soling HD. *Nature* (1999) **401**(6749):133-41

- Schuppel M, Kurschner U, Kleuser U, Schafer-Korting M, Kleuser B. *J Invest Dermatol* (2008) **128**(7):1747-56
- Shano S, Moriyama R, Chun J, Fukushima N. *Neurochem Int* (2008) **52**(1-2):216-20
- Shi X, Garry DJ. *Genes & Dev* (2006) **20**:1692-1708
- Shida D, Fang X, Kordula T, Takabe K, Lopine S, Alvarez SE, Milstien S, Spiegel S. *Cancer Res* (2008) **68**(16):6569-77
- Shida D, Watanabe T, Aoki J, Hama K, Kitayama J, Sonoda H, Kishi Y, Yamaguchi H, Sasaki S, Sako A, Konishi T, Arai H, Nagawa H. *Lab Invest* (2004) **84**(10):1352-62
- Shimomura Y, Wajid M, Ishii Y, Shapiro L, Petukhova L, Gordon D, Christiano AM. *Nat Genet* (2008) **40**(3):335-9
- Siegel AL, Atchison K, Fisher KE, Davis GE, Cornelison DD. *Stem Cells* (2009) **27**(10):2527-38
- Siess W, Zangl KJ, Essler M, Bauer M, Brandl R, Corrinth C, Bittman R, Tigyi G, Aepfelbacher M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* (1999) **96**(12):6931-6
- Siess W. *Biochim Biophys Acta* (2002) **1582**(1-3):204-15
- Simon MF, Daviaud D, Pradere JP, Gres S, Guigne C, Wabitsch M, Chun J, Valet P, Saulnier-Blache JS. *J Biol Chem* (2005) **280**(15):14656-62
- Simpson CM, Itabe H, Reynolds CN, King WC, Glomset JA. *J Biol Chem* (1991) **266**(24):15902-9
- Sorensen SD, Nicole O, Peavy RD, Montoya LM, Lee CJ, Murphy TJ, Traynelis SF, Hepler JR. *Mol Pharmacol* (2003) **64**(5):1199-209
- Spiegel S, Merrill AH. *FASEB J* (1996) **10**:1388-1397.
- Spiegel S, Milstien S. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003) **4**:397-407.
- Stahelin RV, Hwang JH, Kim J, Park Z, Johnson KR, Obeid LM. *J Biol Chem* (2005) **280**(52):43030-43038
- Stankoff B, Barron S, Allard J, Barbin G, Noel F, Aigrot MS, Premont J, Sokoloff P, Zalc B, Lubetzki C. *Mol Cell Neurosci* (2002) **20**(3):415-28
- Sturm A, Dignass AU. *Biochim Biophys Acta* (2002) **1582**(1-3):282-8
- Subramanian P, Karshovska E, Reinhard P, Megens RT, Zhou Z, Akhtar S, Schumann U, Li X, van Zandvoort M, Ludin C, Weber C, Schober A. *Circ Res* (2010) **107**(1):96-105
- Sugimoto N, Takuwa N, Okamoto H, Sakurada S, Takuwa Y. *Mol Cell Biol* (2003) **23**(5):1534-45
- Sugiura T, Nakane S, Kishimoto S, Waku K, Yoshioka Y, Tokumura A, Hanahan DJ. *Biochim Biophys Acta* (1999) **1440**(2-3):194-204
- Suidan HS, Nobes CD, Hall A, Monard D. *Glia* (1997) **21**(2):244-52
- Suzuki J, Yamazaki Y, Li G, Kaziro Y, Koide H. *Mol Cell Biol* (2000) **20**(13):4658-65. Erratum in: *Mol Cell Biol* (2000) **20**(18):7049
- Svetlov SI, Ignatova TN, Wang KK, Hayes RL, English D, Kukekov VG. *Stem Cells Dev* (2004) **13**(6):685-93
- Swarthout JT, Walling HW. *Cell Mol Life Sci* (2000) **57**(13-14):1978-85
- Tabata K, Baba K, Shiraishi A, Ito M, Fujita N. *Biochem Biophys Res Commun* (2007) **363**(3):861-6
- Tager AM, LaCamera P, Shea BS, Campanella GS, Selman M, Zhao Z, Polosukhin V, Wain J, Karimi-Shah BA, Kim ND, Hart WK, Pardo A, Blackwell TS, Xu Y, Chun J, Luster AD. *Nat Med* (2008) **14**(1):45-54
- Taha TA, Hannun YA, Obeid LM. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology* (2006) **39**:113-131
- Tamama K, Kon J, Sato K, Tomura H, Kuwabara A, Kimura T, Kanda T, Ohta H, Ui M, Kobayashi I, Okajima F. *Biochem J* (2001) **353**(Pt 1):139-146
- Tham CS, Lin FF, Rao TS, Yu N, Webb M. *Int J Dev Neurosci* (2003) **21**(8):431-43
- Thomas M, Langley B, Berry C, Sharma M, Kirk S, Bass J, Kambadur R. *J Biol Chem* (2000) **275**:40235-40243.
- Tidball JG. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2005) **288**:R345-R353.

- Tokumura A, Majima E, Kariya Y, Tominaga K, Kogure K, Yasuda K, Fukuzawa K. *J Biol Chem* (2002) **277**(42):39436-42
- Trimbuch T, Beed P, Vogt J, Schuchmann S, Maier N, Kintscher M, Breustedt J, Schuelke M, Streu N, Kieselmann O, Brunk I, Laube G, Strauss U, Battefeld A, Wende H, Birchmeier C, Wiese S, Sendtner M, Kawabe H, Kishimoto-Suga M, Brose N, Baumgart J, Geist B, Aoki J, Savaskan NE, Brauer AU, Chun J, Ninnemann O, Schmitz D, Nitsch R. *Cell* (2009) **138**(6):1222-35. Erratum in: *Cell* (2011) **146**(6):1043
- Umezu-Goto M, Kishi Y, Taira A, Hama K, Dohmae N, Takio K, Yamori T, Mills GB, Inoue K, Aoki J, Arai H. *J Cell Biol* (2002) **158**(2):227-33
- Valet P, Pages C, Jeannoton O, Daviaud D, Barbe P, Record M, Saulnier-Blache JS, Lafontan M. *J Clin Invest* (1998) **101**(7):1431-8
- van Corven EJ, Groenink A, Jalink K, Eichholtz T, Moolenaar WH. *Cell* (1989) **59**(1):45-54
- Van Echten-Deckert G, Zschoche A, Bar T, Schmidt RR, Raths A, Heinemann T, Sandhoff K. *J Biol Chem* (1997) **272**:15825-15833
- van Meeteren LA, Ruurs P, Stortelers C, Bouwman P, van Rooijen MA, Pradere JP, Pettit TR, Wakelam MJ, Saulnier-Blache JS, Mummery CL, Moolenaar WH, Jonkers J. *Mol Cell Biol* (2006) **26**(13):5015-22
- Vancura A, Carroll MA, Haldar D. *Biochem Biophys Res Commun* (1991) **175**(1):339-43
- Vial C, Zuniga LM, Cabello-Verrugio C, Canon P, Fadic R, Brandan E. *J Cell Physiol* (2008) **215**(2):410-21
- Wang W, Graeler MH, Goetzl EJ. *FASEB J* (2005) **19**(12):1731-3
- Wang W, Huang MC, Marquez CP, Liao JJ, Goetzl EJ. *J Immunol* (2008)
- Waters C, Sambhi B, Kong KC, Thompson D, Pitson SM, Pyne S, Pyne NJ. *J Biol Chem* (2003) **278**(8):6282-90
- Wattenberg BW, Pitson SM, Raben DM. *J Lipid Res* (2006) **47**:1128-1139.
- Weiner JA, Chun J. *Proc Natl Acad Sci U S A*. (1999) **96**(9):5233-8
- Weiner JA, Fukushima N, Contos JJ, Scherer SS, Chun J. *J Neurosci* (2001) **21**(18):7069-78
- Weiner JA, Hecht JH, Chun J. *J Comp Neurol* (1998) **398**(4):587-98
- Westerblad H, Bruton JD, Katz A. *Exp Cell Res* (2010) **316**(18):3093-9
- Windh RT, Lee MJ, Hla T, An S, Barr AJ, Manning DR. *J Biol Chem* (1999) **274**:27351-27358
- Wu WT, Chen CN, Lin CI, Chen JH, Lee H. *Endocrinology* (2005) **146**(8):3387-400
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. *Science* (1995) **270**:1326-1331
- Xu YJ, Tappia PS, Goyal RK, Dhalla NS. *J Cell Mol Med* (2008) **12**(3):942-54
- Yablonka-Reuveni Z, Balestreri TM, Bowen-Pope DF. *J Cell Biol* (1990) **111**(4):1623-9
- Yagi H, Kamba R, Chiba K, Soga H, Yaguchi K, Nakamura M, Itoh T. *Eur J Immunol* (2000) **30**(5):1435-44
- Yanagida K, Ishii S, Hamano F, Noguchi K, Shimizu T. *J Biol Chem* (2007) **282**(8):5814-24
- Yanagida K, Masago K, Nakanishi H, Kihara Y, Hamano F, Tajima Y, Taguchi R, Shimizu T, Ishii S. *J Biol Chem* (2009) **284**(26):17731-41
- Yang L, Yatomi Y, Miura Y, Satoh K, Ozaki Y. *Br J Haematol* (1999) **107**:282-293.
- Yatomi Y, Ozaki Y, Ohmori T, Igarashi Y. *Prostaglandins* (2001) **64**(1-4):107-122
- Ye X, Hama K, Contos JJ, Anliker B, Inoue A, Skinner MK, Suzuki H, Amano T, Kennedy G, Arai H, Aoki J, Chun J. *Nature* (2005) **435**(7038):104-8
- Ye X. *Hum Reprod Update* (2008) **14**(5):519-36
- Yea K, Kim J, Lim S, Park HS, Park KS, Suh PG, Ryu SH. *J Mol Med (Berl)* (2008) **86**(2):211-20
- Yoshida N, Yoshida S, Koishi K, Masuda K, Nabeshima Y. *J Cell Sci* (1998) **111** ( Pt 6):769-79
- Yoshida S, Fujisawa-Sehara A, Taki T, Arai K, Nabeshima Y. *J Cell Biol* (1996) **132**(1-2):181-93

- 
- Yu N, Lariosa-Willingham KD, Lin FF, Webb M, Rao TS. *Glia* (2004) **45**(1):17-27
  - Yuan XB, Jin M, Xu X, Song YQ, Wu CP, Poo MM, Duan S. *Nat Cell Biol* (2003) **5**(1):38-45
  - Zanin M, Germinario E, Dalla Libera L, Sandonà D, Sabbadini RA, Betto R, Danieli-Betto D. *Am J Physiol Cell Physiol* (2008) **294**(1):C36-46
  - Zhang H, Desai NN, Olivera A, Seki T, Brooker G, Spiegel S. *J Cell Biol* (1991) **114**:155-167
  - Zhang Y, Chen YC, Krummel MF, Rosen SD. *J Immunol* (2012) **189**(8):3914-24
  - Zheng Y, Kong Y, Goetzl EJ. *J Immunol* (2001) **166**(4):2317-22
  - Zheng Y, Voice JK, Kong Y, Goetzl EJ. *FASEB J* (2000) **14**(15):2387-9
  - Zheng ZQ, Fang XJ, Qiao JT. *Sheng Li Xue Bao* (2004) **56**(2):163-71
  - Zhou ZB, Niu JP, Zhang ZJ. *Int J Mol Sci* (2009) **10**(7):3194-208